

**O TAMANHO FAZ DIFERENÇA?
O EFEITO DOS DIFERENTES MORFOTIPOS NA
ECOFISIOLOGIA DA CIANOBACTÉRIA FORMADORA
DE FLORAÇÕES *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

MARIANA MENDES E MELLO

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Mariana Mendes e Mello

**O TAMANHO FAZ DIFERENÇA?
O EFEITO DOS DIFERENTES MORFOTIPOS NA ECOFISIOLOGIA DA
CIANOBACTÉRIA FORMADORA DE FLORAÇÕES *MICROCYSTIS*
*AERUGINOSA***

JUIZ DE FORA

2017

Mariana Mendes e Mello

O tamanho faz diferença?

**O efeito dos diferentes morfotipos na ecofisiologia da cianobactéria formadora
de florações *Microcystis aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Roland

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Marinho

JUIZ DE FORA

MARÇO DE 2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes e Mello, Mariana.

O tamanho faz diferença? : O efeito dos diferentes morfotipos na ecofisiologia da cianobactéria formadora de florações *Microcystis aeruginosa* / Mariana Mendes e Mello. -- 2017.

145 p.

Orientador: Fabio Roland

Coorientador: Marcelo Marinho

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2017.

1. Cianobactéria. 2. Morfologia. 3. Colônia. 4. Ecofisiologia. 5. Manejo. I. Roland, Fabio, orient. II. Marinho, Marcelo, coorient. III. Título.

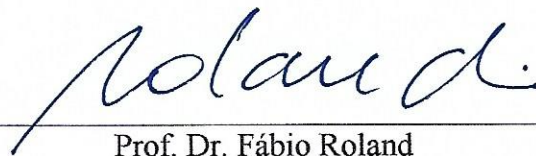
**“O TAMANHO FAZ DIFERENÇA? O EFEITO DOS DIFERENTES
MORFOTIPOS NA ECOFISIOLOGIA DA CIANOBACTÉRIA FORMADORA DE
FLORAÇÕES MICROCYSTIS AERUGINOSA”**

Mariana Mendes e Mello

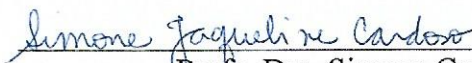
Orientador: Prof. Dr. Fábio Roland

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

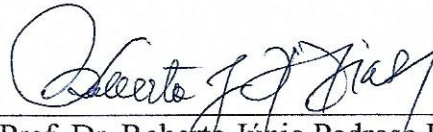
Aprovado em 09 de março de 2017.



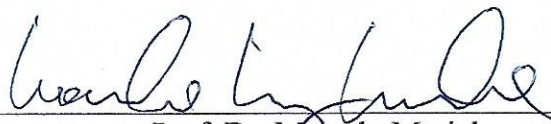
Prof. Dr. Fábio Roland
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dra. Simone Cardoso
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Roberto Júnio Pedrosa Dias
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Marcelo Marinho
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof. Dr. Natalia Noyma
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

A todas as mulheres cientistas

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos membros da banca, Dr. Roberto Dias, Dra. Natália Noyma, Dra. Simone Cardoso, Dr. Fabio Roland e Dr. Marcelo Marinho por terem aceitado o convite e pelas contribuições ao trabalho.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de doutorado e à Cooperação CAPES-NUFFIC pela bolsa de doutorado sanduíche. Graças a instituições como essa os cientistas brasileiros podem desenvolver seus trabalhos de forma minimamente digna.

Agradeço à Vera Huszar pelo exemplo e fonte de inspiração. Obrigada por ter sido a coordenadora dos projetos que me proporcionaram as melhores experiências profissionais e me permitiram conhecer pessoas incríveis. Além do claro e indiscutível sucesso acadêmico, agradeço à Vera por ter a sensibilidade e intuição inerente às mulheres fortes e por isso uma líder maravilhosa.

Agradeço aos amigos acadêmicos por tantas trocas frutíferas: Raquel, Nathan, Andréia, Vanessa, Ali, Maíra, Jamê, Frank, Els, Marcela, Felipe, Malafaia, Alessandro, Rafael Paiva, Rafael Almeida, Simone, Natália, Lu Rangel, Caique, Gladson, Lu Vidal e Lúcia.

Agradeço ao Fábio Roland, primeiro orientador, chefe e referência para toda vida, por ser responsável pelas incontáveis oportunidades.

Agradeço ao Marcelo Marinho pela generosidade de ter se colocado à disposição e ter sido o orientador que eu precisava na reta final.

Obrigada, Carol Soares, pela amizade e orientação no início do doutorado. Será sempre muito querida.

Thank you, Miquel, for being this great mind. It is not even possible to measure how grateful I'm to work with you.

Thank you Els, Wendy, John and Fritz for all technical and scientific support.

Obrigada, Maíra e lamê, por terem feito a vida em Wageningen muito mais divertida e por terem se tornado amigas do coração.

Obrigada aos amigos do peito por encherem minha vida de tanta alegria e por isso terem feito o processo de produção da tese muito mais suave: Gabriela, Fernando, Wagner, Jerônimo, Renata, Laura, Thalita, Júlia, Ana, Zé, Roberta, Pedro e Denylu.

Agradeço imensamente à minha família por sempre terem entendido e apoiado o caminho de carreira que escolhi. Vocês são todos maravilhosos!

Agradeço aos dois amores da minha vida, Maíra e Rafael, por fazerem parte de mim e por serem pessoas incríveis. Sem vocês eu sequer seria quem eu sou hoje e de nada valeria ser doutora em Ecologia.

Muito obrigada, Lucas, por me fazer sentir algo indescritível desde a primeira vez. Obrigada pela sua percepção, sensibilidade e por sua linda habilidade de lidar com as questões da vida. Você faz da minha vida uma jornada muito mais interessante. E o mais importante com relação ao tema desta tese: obrigada por dar tanto valor ao meu trabalho!

RESUMO

A capacidade da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* de formar colônias vem sendo apontada como importante característica frente a adversidades ambientais, como por exemplo proteção contra predação e a criação pela mucilagem de um microambiente favorável às células. Entretanto, a formação de colônias e seus mecanismos e vantagens ainda não são completamente compreendidos. Neste estudo o principal objetivo foi contribuir para a compreensão do papel de diferentes morfotipos (unicelular e colonial) na ecofisiologia de *M. aeruginosa*. Em ambientes naturais, florações de cianobactérias ocorrem predominantemente na forma colonial, entretanto, por questões técnicas, os experimentos são realizados tradicionalmente com culturas unicelulares. Portanto, a intenção desta tese foi contribuir para desenvolvimento de técnicas para o manejo de florações de cianobactérias utilizando uma abordagem ambientalmente mais realista através da realização de experimentos com culturas coloniais. Nossos resultados apontaram que a forma colonial de *M. aeruginosa* promoveu uma vantagem na proteção das células contra agentes químicos como peróxidos, de forma que a aplicação de doses mais altas pode ser necessária no caso de mitigação de florações com predominância de *Microcystis* colonial. Além disso, as doses de peróxido capazes de causar a liberação significativa de microcistinas (MC) pelo morfotipo unicelular não aumentaram a concentração de MC liberada pelo morfotipo colonial. Na avaliação dos efeitos dos antibióticos, o morfotipo colonial apresentou maior resistência ao antibiótico oxytetraciclina, enquanto que o antibiótico enrofloxacina afetou igualmente ambos os morfotipos. Além disso, o morfotipo unicelular desenvolveu resistência a oxytetracyclina mais rapidamente do que o morfotipo colonial. Desta forma, sugerimos que o rápido desenvolvimento de resistência ao antibiótico deve ser cuidadosamente levado em

consideração. Por fim, ao testar o método de *Flock & Sink*, a aplicação de lastro removeu significativamente a biomassa do morfotipo colonial enquanto o morfotipo unicelular demandou a aplicação de lastro e coagulante. A conclusão geral da tese é que os morfotipos de *M. aeruginosa* influenciam significativamente o efeito de diferentes substâncias químicas utilizadas com o objetivo de controlar o crescimento de cianobactérias. Enfatizamos que para o manejo de florações de cianobactérias é necessária uma cuidadosa análise sistêmica e da comunidade de cianobactérias antes da tomada de decisões para a aplicação de medidas de mitigação.

Palavras-chave: Colônia. Manejo. Mitigação. Peróxido. Antibiótico. Coagulante.

Lastro

ABSTRACT

The ability of *Microcystis aeruginosa* to form colonies has been identified as an important characteristic of the species to face environmental adversities, such as protection against predation and the creation by the mucilage of a microenvironment favourable to cells. However, the colony formation and their mechanisms and benefits are not yet fully understood. In this study, the main objective was to contribute to the knowledge of the role of different morphotypes (unicellular and colonial) in the ecophysiology of *M. aeruginosa*. In the environment, cyanobacterial blooms occur mainly as the colonial form but, due to technical issues, the experiments are traditionally carried out with unicellular cultures. Therefore, we intended to contribute to the development of techniques for cyanobacterial blooms management by using a more realistic environmental approach running experiments with colonial cultures. Our results pointed out that the colonial form of *M. aeruginosa* promoted an advantage in the protection of the cells against peroxides, so a higher dose application may be necessary for mitigating blooms in which the colonial form is predominant. Furthermore, the peroxide doses capable of causing significant release of microcystins (MC) by the unicellular morphotype did not increase the MC released by the colonial morphotype. Evaluating the effects of antibiotics, the colonial morphotype showed highest resistance to the antibiotic oxytetracycline, while the antibiotic enrofloxacin affected both morphotypes equally. In addition, the unicellular morphotype developed resistance to oxytetracycline more rapidly than the colonial morphotype. In this way, we suggest that the rapid development of antibiotic resistance should be carefully taken into consideration. Finally, when testing the Flock & Sink method, the application of ballast removed significantly the biomass of the colonial morphotype, while the unicellular morphotype required application of ballast and coagulant. The general

conclusion of the thesis is that the morphotypes of *M. aeruginosa* significantly influence the effect of different chemical substances used to control the growth of cyanobacteria. We emphasize that for the management of cyanobacterial blooms is mandatory a thoroughly analysis of the system and of the cyanobacterial community prior to the decision making for an application of mitigation measures.

Keywords: Colony. Management. Mitigation. Peroxide. Antibiotic. Coagulant. Ballast.

SUMÁRIO

Introdução Geral	13
Objetivos e estrutura da tese	17
Capítulo 1: OS EFEITOS DE PERÓXIDOS (PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PERÓXIDO DE CÁLCIO) EM DIFERENTES MORFOLOGIAS DA CIANOBACTÉRIA <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	20
1) Introdução	20
2) Material e métodos	23
3) Resultados	29
4) Discussão.....	44
Capítulo 2: O EFEITO DE ANTIBIÓTICOS (ENROFLOXACINA E OXYTETRACICLINA) NA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DOS MORFOTIPOS COLONIAL E UNICELULAR DA CIANOBACTÉRIA <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	50
1) Introdução	50
2) Material e métodos	52
3) Resultados	57
4) Discussão.....	67
Capítulo 3: O EFEITO DE COAGULANTES (QUITOSANA E CLORETO DE POLIALUMÍNIO) E LASTROS (BENTONITA MODIFICADA COM LANTÂNIO E SOLO VERMELHO) NA FLOCULAÇÃO E POSICIONAMENTO VERTICAL DE DIFERENTES MORFOLOGIAS DA CIANOBACTÉRIA <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	74
1) Introdução	74
2) Material e métodos	78

3) Resultados	84
4) Discussão.....	97
Conclusões gerais.....	105
Referências Bibliográficas.....	106
Anexos I e II.....	118

INTRODUÇÃO GERAL

1) Florações de cianobactérias como problema ambiental

A crescente proliferação de cianobactérias tem sido alvo de preocupação de governos e órgãos que manejam corpos d'água ao redor de todo o mundo. As florações estão intimamente associadas ao processo de eutrofização dos ambientes aquáticos, consequência de atividades antrópicas responsáveis pelo aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo nos corpos aquáticos. O processo de eutrofização ocorre predominantemente através do aumento da produção e utilização de fertilizantes, do aumento da queima de combustíveis fósseis e do descarte de efluentes residenciais e industriais em rios e lagos (Conley *et al.*, 2009).

Florações de cianobactérias podem causar o desequilíbrio ecológico do sistema em questão através do aumento da turbidez da água, insuficiência noturna de oxigênio para outros organismos e a diminuição da qualidade da água de forma generalizada, com consequente diminuição da água potável disponível (Paerl e Otten, 2013). Além disso, florações de cianobactérias representam uma grave ameaça para a saúde devido a sua capacidade de produzir toxinas capazes de afetar o fígado, o sistema nervoso central e causar problemas dermatológicos (Codd *et al.*, 2005; Dittmann e Wiegand, 2006) acarretando em sérios problemas de saúde pública (Chorus *et al.*, 2000). Consequentemente, florações de cianobactérias impedem o uso dos sistemas aquáticos para recreação, pesca, aquicultura, abastecimento público, causando grande impacto econômico (Steffensen, 2008). Assim, desde que o controle de cianobactérias entrou em vigor na legislação brasileira e em diversos países, um maior número de estudos visando melhor compreender a ecologia e fisiologia de

cianobactérias vem sendo conduzido, bem como o desenvolvimento de técnicas para o controle e manejo de florações de cianobactérias.

A diminuição do aporte externo de fósforo nos corpos d'água ou mesmo a retirada do fósforo presente na coluna d'água vem sendo apontada como consenso no manejo de cianobactérias (Paerl e Otten, 2013). Entretanto, o resultado de ações para a redução do aporte de fósforo algumas vezes só pode ser percebido após alguns anos de redução (Jeppesen *et al.*, 1991), enquanto que ações imediatas comumente são requeridas pela população e órgãos públicos, por exemplo. Além disso, em alguns sistemas aquáticos, a diminuição no aporte de nutrientes não é possível ou efetiva no controle de florações devido a características das espécies de cianobactéria presentes, da bacia ou por ser uma medida de alto custo financeiro (Cooke *et al.*, 2016). Por esse motivo, vêm-se promovendo o desenvolvimento de diferentes técnicas de baixo custo, resultados rápidos e que retorne a água a níveis de qualidade desejáveis e seguros (Jancula e Marsalek, 2011).

2) *Microcystis aeruginosa* como objeto de estudo

No Brasil e no mundo *Microcystis* está entre os gêneros de cianobactérias formadores de florações mais comuns (Huszar e Da Silva, 1999; De Figueiredo *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2013). *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing é uma cianobactéria colonial capaz de formar colônias flutuantes, usualmente microscópicas, apresentando fina camada de mucilagem e alta densidade de células (Komarek *et al.*, 2002). A espécie existe principalmente sob forma colonial em condições naturais e como células isoladas quando cultivada sob condições controladas em laboratório (Bolch e Blackburn, 1996). Essa mudança na morfologia sugere que fatores responsáveis pela forma colonial típica estão ausentes nos meios de cultura e presentes em ambientes naturais.

M. aeruginosa é uma espécie potencialmente tóxica, capaz de produzir microcistinas (MCs). As MCs são as toxinas mais estudadas entre o grupo das cianotoxinas, e podem causar sérios prejuízos ao fígado, além de causar a morte de animais e seres humanos (Azevedo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009).

3) Função da forma colonial em *Microcystis aeruginosa*

Segundo estudos recentes, a forma colonial de *M. aeruginosa* apresenta grande vantagem competitiva contra predação (Yang e Kong, 2012), proteção contra foto-oxidação (Wu *et al.*, 2011), contaminantes químicos (Li *et al.*, 2015), potenciais algicidas (Wang *et al.*, 2013), além de já ter sido registrada como capaz de apresentar um sistema fotossintético mais eficiente e possuir maior afinidade a baixos níveis de fósforo do que o morfotipo unicelular (Shen e Song, 2007; Wu e Song, 2008).

Apesar da morfologia de *M. aeruginosa* ser uma importante variável a ser considerada, a formação de colônias em *M. aeruginosa* e seus mecanismos e vantagens ainda não são completamente compreendidos. A grande maioria dos estudos sobre o papel das diferentes morfotipos de *Microcystis* são realizados com diferentes linhagens representando cada morfotipo. Desta forma, as diferenças fisiológicas inerentes de cada linhagem não podem ser excluídas, dificultando a compreensão das diferenças estritamente relacionadas aos morfotipos. Em nosso trabalho, diferentes condições de crescimento nos permitiram obter os morfotipos colonial e unicelular na mesma linhagem. Duas linhagens com essas características foram isoladas do Reservatório do Funil (RJ), LEA12 e LEA13 (Figuras 01 e 02; Tabela 01) e foram objetos de estudo nos subsequentes capítulos desta tese.

Tabela 1 – Caracterização do crescimento e de parâmetros morfológicos das linhagens LEA12 e LEA13 de *M. aeruginosa* cultivadas nas condições padrão dos experimentos desta tese.

Linhagens	Taxa de crescimento	Diâmetro das células (μm)	Diâmetro das colônias (μm)
LEA12	0.49 ± 0.02	6.71 ± 0.69 (n = 30)	1006 ± 216 (n = 30)
LEA13	0.47 ± 0.02	6.87 ± 0.8 (n=30)	3599 ± 402 (n = 30)

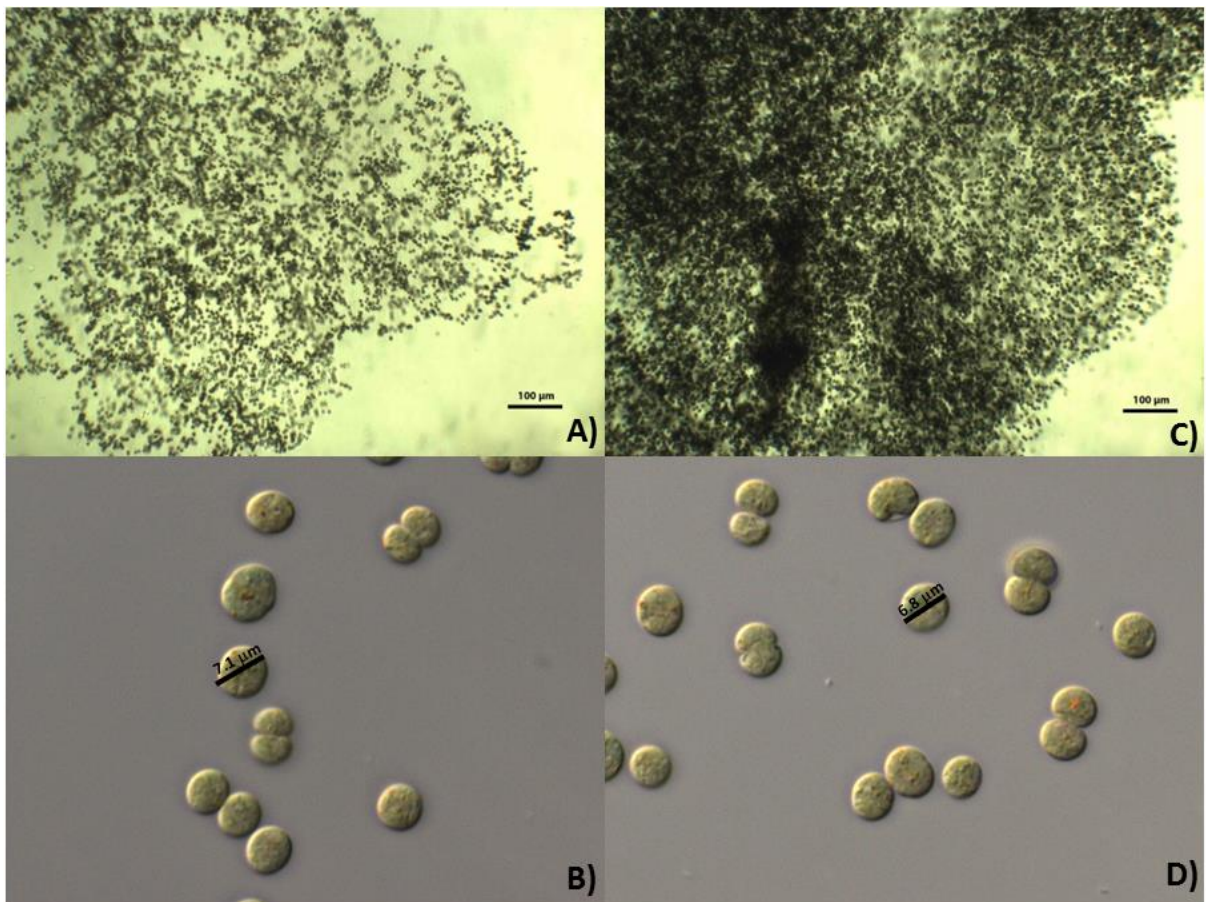


Figura 01: Linhagens de *M. aeruginosa* utilizadas neste estudo: morfotipo colonial de LEA12 (A), morfotipo unicelular de LEA12 (B), morfotipo colonial de LEA13 (C) e morfotipo unicelular de LEA13 (D).

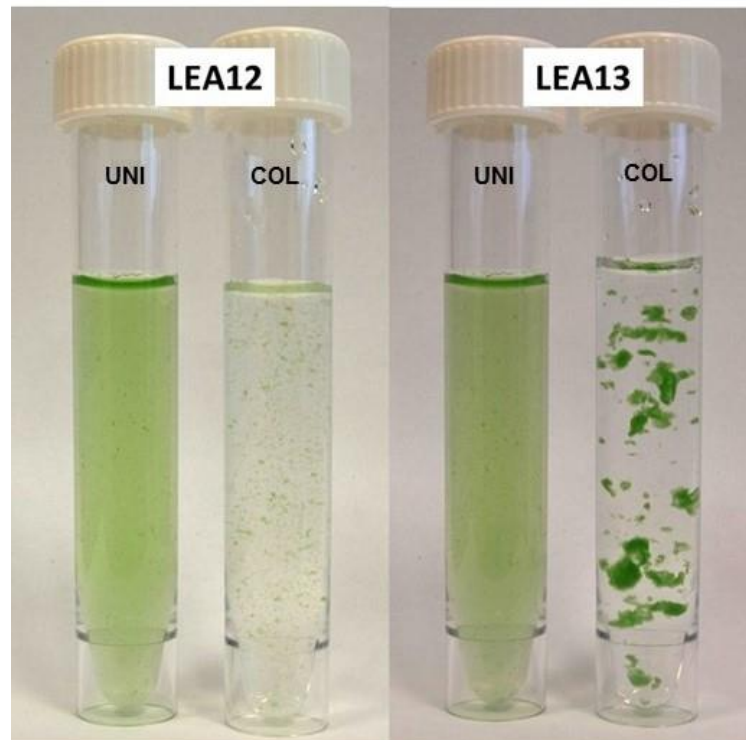


Figura 02: Aparência das culturas unicelulares e coloniais de LEA12 e LEA13.

OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

Essa tese teve como principal objetivo contribuir para a compreensão do papel de diferentes morfologias na ecofisiologia de *M. aeruginosa*. Além disso, a intenção desse estudo foi contribuir para desenvolvimento de técnicas para o manejo de florações de cianobactérias utilizando uma abordagem ambientalmente mais realista através da realização de experimentos com culturas coloniais, uma vez que tradicionalmente os experimentos são realizados com culturas unicelulares. Nossa hipótese é de que a formação de colônias em *M. aeruginosa* seja uma resposta fenotípica do morfotipo unicelular frente a condições ambientais adversas.

Todos os experimentos dos três capítulos foram realizados durante o período de doutoramento sanduíche, no âmbito do projeto de cooperação internacional CAPES (Brasil) – NUFFIC (Holanda) “Cyanobacterial Blooms in a Changing World”, na Wageningen University, sob orientação do Dr. Miquel Lürling. Nos três capítulos,

buscou-se compreender o efeito de compostos químicos e métodos propostos para o manejo de florações de cianobactéria sob a ótica de diferentes morfotipos de *M. aeruginosa*, utilizando a eficiência fotossintética e o conteúdo e liberação de microcistinas como parâmetros indicativos dos efeitos nos morfotipos. Espera-se gerar com esta tese três artigos científicos publicados em periódicos internacionais indexados.

Objetivos específicos:

- 1- Avaliar o efeito do peróxido de hidrogênio e do peróxido de cálcio sobre a atividade fotossintética e liberação de cianotoxinas nos morfotipos unicelular e colonial de *M. aeruginosa*.
- 2- Avaliar a capacidade do peróxido de hidrogênio em degradar microcistina (MC) e estabelecer dinâmica de degradação dos peróxidos nas condições experimentais utilizadas.
- 3- Avaliar o efeito de dois antibióticos, Oxytetraciclina e Enrofloxacina, sobre a eficiência fotossintética de duas linhagens de *M. aeruginosa* levando em consideração uma abordagem morfológica
- 4- Avaliar a capacidade dos morfotipos unicelular e colonial de desenvolverem resistência ao antibiótico Oxytetraciclina.
- 5- Avaliar a eficácia de coagulantes (quitosana e cloreto de polialumínio) combinados com lastro (solo vermelho e bentonita modificada com lantânio - Phoslock®) na remoção da biomassa de diferentes morfotipos da cianobactéria *M. aeruginosa*.

Paralelamente, foram publicados dois artigos não relacionados à tese durante o período do doutorado, a saber:

1 – SOARES, M. C. S.; HUSZAR, V. L. M.; MIRANDA, M. N.; **MELLO, M. M.**; ROLAND, F.; LÜRLING, M. (2013) “Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences” In *Hydrobiologia (The Hague. Print)*, v. 717, p. 1-12.

(ANEXO I)

2 – FAASSEN, E. J.; GARCÍA-ALTARES, **MENDES E MELLO, M.**; LÜRLING, M. (2015) “Trans generational effects of the neurotoxin BMAA on the aquatic grazer *Daphnia magna*” In *Aquatic Toxicology*, v. 168, p. 98-107.

(ANEXO II)

CAPÍTULO 1: OS EFEITOS DE PERÓXIDOS (PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PERÓXIDO DE CÁLCIO) EM DIFERENTES MORFOLOGIAS DA CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

1) INTRODUÇÃO

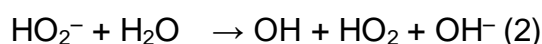
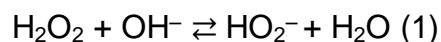
A aplicação de compostos à base de cobre é um dos métodos mais utilizados para controlar o crescimento excessivo de cianobactérias. A preferência para a utilização do cobre baseia-se em sua eficácia, facilidade de aplicação e os custos baixos (Jancula e Marsalek, 2011; Matthijs *et al.*, 2016). Entretanto, atualmente, seu uso não é aconselhado devido à sua toxicidade para outros organismos e por promover a liberação de cianotoxinas devido ao rompimento das células (Griffiths e Saker, 2003). Como uma alternativa ao uso de compostos de cobre, a utilização de peróxidos tem se mostrado efetiva no manejo cianobactérias quando utilizado isoladamente (Matthijs *et al.*, 2012; Barrington, Ghadouani, *et al.*, 2013) ou em conjunto com outras técnicas (Drabkova, Admiraal, *et al.*, 2007; Noyma *et al.*, 2016).

A utilização de peróxidos é apontada como uma alternativa não-tóxica pois este é um sub-produto da fotossíntese, respiração e outros processos metabólicos que ocorrem naturalmente na coluna d'água (Cooper e Zika, 1983). Além disso, peróxidos podem ser naturalmente degradados pelas condições naturais dos ambientes aquáticos, resultando em água e oxigênio. Outra vantagem da utilização de peróxidos é sua ação com efeitos seletivos sobre cianobactérias (Matthijs *et al.*, 2012). Comparadas a organismos eucariontes, cianobactérias possuem menos mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A ineficiência ou ausência

desses mecanismos em cianobactérias acarretam no maior efeito dos peróxidos sobre as células (Drabkova, Admiraal, *et al.*, 2007).

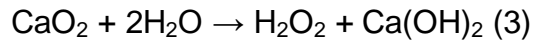
Apesar da utilização de peróxidos ser considerada uma alternativa não-tóxica para o manejo de cianobactérias, a tomada de decisões para medidas de mitigação também deve levar em consideração, além da biomassa, a produção de cianotoxinas (Codd, 2000) e os estudos sobre esse tópico ainda são inconclusivos. Lüring e colaboradores (2014) testaram uma linhagem de *Microcystis aeruginosa* em laboratório e encontraram que as doses efetivas de peróxidos acarretaram em substancial liberação de microcistina (MC) e não foram capazes de degradá-las completamente. Por outro lado, quando a aplicação de peróxidos foi testada em campo, com a presença de fatores naturais como bactérias heterotróficas, a liberação de MC na água também foi apontada, porém mais de 90% desta foi degradada após três dias (Matthijs *et al.*, 2012).

Dentre os peróxidos mais comumente testados para o controle de florações de cianobactérias estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peróxido de cálcio (CaO_2). O peróxido de hidrogênio é um potente agente oxidante que atua através da formação de radicais superóxidos (HO_2) e hidroxila (OH), tóxicos para as células de cianobactéria, através das reações.



O CaO_2 permite a manipulação do H_2O_2 em sua forma sólida, apresentando algumas vantagens em comparação ao H_2O_2 na forma líquida. Em reação com a água, o CaO_2 se decompõe em moléculas de H_2O_2 e carbonatos (geralmente valores

de pH mais baixos levam a formação de maior quantidade de H₂O₂ em detrimento de carbonatos), através da reação:



O CaO₂ possui maior estabilidade em comparação a outros peróxidos, liberando moléculas de H₂O₂ lentamente e por um longo período de tempo, consequentemente causando efeito prolongado de inativação das células (Novotortsev *et al.*, 2012).

No presente estudo, o objetivo foi avaliar o efeito do peróxido de hidrogênio e do peróxido de cálcio sobre a atividade fotossintética e liberação de cianotoxinas nos morfotipos unicelular e colonial de *Microcystis aeruginosa*, excluindo as diferenças entre linhagens. Também foi avaliada a capacidade do peróxido de hidrogênio em degradar microcistina (MC) e a dinâmica de degradação dos peróxidos nas condições experimentais utilizadas. Até onde se conhece, esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito de peróxidos levando em consideração as diferenças morfológicas de *M. aeruginosa*. A maioria dos estudos sobre os efeitos dos peróxidos em *M. aeruginosa* se baseia em testes com culturas unicelulares (Qian *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2012; Mikula *et al.*, 2012; Lüring *et al.*, 2014). No campo, entretanto, principalmente durante florações, a forma colonial é predominantemente encontrada. Devido a condições controladas de laboratório, culturas de *M. aeruginosa* tendem a se tornar unicelulares, dificultando os testes com colônias. Para este estudo, nós fomos capazes de manter a mesma linhagem de *M. aeruginosa* com as duas morfologias ao mesmo tempo. Assim, podemos fornecer uma visão mais realista do efeito de peróxidos em *M. aeruginosa*.

2) MATERIAL E MÉTODOS

Organismos

As linhagens da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, LEA12 e LEA13, foram isoladas do Reservatório do Funil (RJ - Brasil) em 2013 no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora. As culturas foram mantidas no *Plankton Laboratory* da Universidade de Wageningen (Holanda) a 25°C, 5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14:10 horas (claro:escuro), em meio de cultura WC modificado (Lürling e Beekman, 1999). No momento do isolamento ambas linhagens se encontravam em forma colonial. De maneira geral, quando isoladas e cultivadas sob condições controladas em laboratório, as colônias se desfazem e as linhagens passam a existir predominantemente como unicélulas após algumas gerações (Bolch e Blackburn, 1996). A manutenção das culturas sob condições de baixa intensidade luminosa possibilitou um crescimento lento mantendo o morfotipo colonial. Para a realização dos experimentos e para o crescimento prévio das culturas, as condições foram de 25°C, 55 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas, em meio de cultura WC. Durante o período de crescimento prévio aos experimentos, culturas compostas pelo morfotipo unicelular foram obtidas através da separação manual e cultivo das células que eventualmente se separaram das colônias. Nesse estudo, as culturas em colônias se encontravam com 95% e 100% do total das células em colônias em LEA 12 e LEA 13, respectivamente. As culturas unicelulares se encontravam com 95% das células em unicélulas ou bi-células, em ambas as linhagens. A manutenção das culturas e todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”).

Dinâmica de degradação e liberação de peróxidos nas condições experimentais utilizadas

Com o objetivo de avaliar a dinâmica de degradação dos peróxidos no meio de cultura nas condições experimentais, a concentração inicial de 4 mg L⁻¹ de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, 1.07209.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e de 7 mg L⁻¹ de peróxido de cálcio (CaO₂ 65%, 78403.22.2, Aldrich Chemistry) foram adicionadas em triplicadas, perfazendo três tratamentos: (1) degradação dos peróxidos em culturas do morfotipo colonial, (2) degradação dos peróxidos em culturas do morfotipo unicelular, (3) degradação dos peróxidos em meio de cultura sem cianobactéria. As concentrações iniciais de peróxidos testadas neste experimento foram definidas a partir das concentrações mais altas utilizadas nos experimentos seguintes. A concentração de peróxidos no meio foi avaliada em 0, 12 e 24 horas após a adição de H₂O₂ e em 0, 1, 2, 4, 5, 12 e 24 horas após a adição de CaO₂, com o auxílio de fitas colorimétricas Quantofix (Macherey Merck, Darmstadt, Germany). O CaO₂ é uma forma sólida de peróxido, mais estável do que o H₂O₂, e cuja reação com a água acarreta em sua degradação, liberando H₂O₂ ao longo de sua decomposição (Novotortsev *et al.*, 2012). Por esse motivo, com base na literatura e em experimentos pilotos, a avaliação da dinâmica de CaO₂ no meio foi realizada em um maior número de medições, com intervalos de tempo menores entre elas.

Efeito do H₂O₂ na degradação de microcistinas (MCs)

Visando avaliar a capacidade de H₂O₂ em degradar MC nas condições experimentais utilizadas, 100 µg L⁻¹ de MC foram adicionados em triplicadas em meio

de cultura contendo 0 (controle), 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de H₂O₂. A concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de MC foi definida de acordo com a concentração média de MC particulada no inóculo (40 µg L⁻¹ de clorofila ou 10⁵ céls mL⁻¹ das culturas para os experimentos sobre os efeitos dos peróxidos nos diferentes morfotipos.

Para acessar concentração de MC dissolvida no meio após 24 horas da adição de H₂O₂, 8 mL de cada cultura foram filtrados através de filtros de borosilicato (Whatman GF/C, Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido) e armazenados no escuro em tubos de vidro para posterior análise.

Efeito de H₂O₂ na eficiência fotossintética e no conteúdo e liberação de microcistinas dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Esse experimento teve o objetivo de avaliar o efeito do H₂O₂ na eficiência fotossintética e no conteúdo e liberação de MC de diferentes morfotipos de *M. aeruginosa*, bem como avaliar se a densidade de uma floração de *M. aeruginosa* pode influenciar no efeito do H₂O. Suspensões de culturas de *M. aeruginosa* nos morfotipos unicelular e colonial foram adicionadas em: 15 Erlenmeyers de 125 mL para LEA12 unicelular, 15 Erlenmeyers para LEA12 colonial, 15 Erlenmeyers de 125 mL para LEA13 unicelular e 15 Erlenmeyers para LEA13 colonial. Cada Erlenmeyer continha 50 mL de meio com uma concentração inicial de clorofila-a de 40 µg.L⁻¹, o que foi correspondente à aproximadamente 10⁵ céls.mL⁻¹. O H₂O₂ foi adicionado em triplicatas nas concentrações de 0 (controle), 1, 2, 3 e 4 mg L⁻¹ para colônias e unicélulas de LEA12, e em 0 (controle), 1, 1.5, 2 e 4 mg L⁻¹ para unicélulas de LEA13, e em 0 (controle), 2, 3, 4, e 8 mg L⁻¹ para colônias de LEA13. As séries de concentrações de H₂O₂ foram determinadas a partir de experimentos piloto e

experimentos realizados com a mesma espécie reportados na literatura. Os experimentos piloto auxiliaram a determinação da série de H_2O_2 que melhor gerasse uma curva de dose-resposta gradual. Assim, devido à maior resistência de LEA 13 ao H_2O_2 observada nos experimentos piloto, uma série de concentrações mais altas de H_2O_2 foi determinada para o morfotipo colonial e uma série com intervalos menores entre as concentrações foi determinada para o morfotipo unicelular.

Amostras para análise da eficiência fotossintética ($\Phi PSII$, rendimento quântico do transporte de elétrons do fotossistema II) foram retiradas de todos os Erlenmeyers em 0, 3, 6 e 24 horas após a adição de peróxido e imediatamente analisadas.

Para as análises de MC, 30 mL de cultura foram retirados de todos os erlenmeyers em 0 e 24 horas de experimento e filtrados através de filtros de borosilicato (Whatman GF/C, Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido). Os filtros de borosilicato foram dobrados suavemente e armazenados no escuro em tubos de vidro para posterior análise do conteúdo de MC dentro das células (particulado). Dos 30 mL filtrados de cada erlenmeyer, 8 mL foram separados em tubos de vidro para posterior análise da concentração de MC dissolvida no meio.

Com a finalidade avaliar quanto a densidade de uma floração de *M. aeruginosa* pode influenciar no efeito do H_2O_2 , um teste extra foi realizado com culturas unicelulares de LEA13 três vezes mais densas do que no teste anterior. A concentração de foi adicionada em triplicatas em Erlenmeyers contendo culturas unicelulares com aproximadamente 3×10^5 céls mL^{-1} . A dose de $2 \text{ mg } L^{-1}$ de H_2O_2 foi escolhida para ser testada por ter sido a menor concentração capaz de reduzir próximo a zero a eficiência fotossintética de unicélulas. A eficiência fotossintética das células neste teste foi avaliada em 0 e 24 horas após a adição do peróxido.

Efeito de CaO₂ na eficiência fotossintética de colônias e unicélulas de *Microcystis aeruginosa*

Esse experimento visou avaliar a ação do CaO₂ na eficiência fotossintética de diferentes morfotipos da linhagem LEA13. LEA13 foi escolhida para ser exposta a diferentes concentrações de CaO₂ por ter apresentado no experimento anterior maior diferença nas eficiências fotossintéticas dos morfotipos colonial e unicelular. Desta forma, suspensões de *M. aeruginosa* foram adicionadas em 15 Erlenmeyers de 125 mL para o morfotipo unicelular, e 15 Erlenmeyers de 125 mL para o morfotipo colonial. Cada erlenmeyer continha 50 mL de meio com uma concentração inicial de clorofila-a de 35 µg.L⁻¹, o que foi correspondente a aproximadamente 10⁵ céls.mL⁻¹. O CaO₂ foi adicionado aos erlenmeyers nas concentrações de 0 (controle), 2, 2.5, 3.5 e 7 mg L⁻¹ para o morfotipo unicelular e de 0 (controle), 4.5, 13, 17.5 e 22 mg L⁻¹ para o morfotipo colonial. As séries de concentrações de CaO₂ foram determinadas a partir de experimentos piloto em que, assim como para H₂O₂, foi observada maior resistência do morfotipo colonial ao CaO₂. Assim, séries de diferentes concentrações de CaO₂ foram determinadas para os diferentes morfotipos afim de gerar uma melhor curva de dose-resposta gradual.

Amostras para análise da eficiência fotossintética das culturas foram retiradas de todos os erlenmeyers em 0, 3, 6 e 24 horas após a adição de CaO₂ e avaliadas imediatamente. Uma vez que a liberação de H₂O₂ pelo CaO₂ é dependente do pH do meio, avaliamos o pH das culturas em todos os tratamentos no início e ao final do experimento.

Análise de toxinas

Tanto os filtrados para análise de MC dissolvida no meio quanto os filtros para análise de MC particulada foram secos em Speedvac (Savant SPD121P Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Após secos, os filtros foram extraídos três vezes a 60°C em 2,5 mL de 75% de metanol - 25% de água Millipore (v/v). Os extratos obtidos foram secos em Speedvac e posteriormente reconstituídos em 900 µL de metanol, assim como para os filtrados secos. As amostras reconstituídas foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL com filtro de celulose-acetato (0,2 µm, Grace Davison Ciências Descoberta, Deerfield, IL, EUA) e centrifugadas durante 5 min a 16000 × g (VWR Galaxy 16DH, VWR International, Buffalo Grove, IL, EUA). Os filtrados foram transferidos para frascos de vidro âmbar para análise por LC-MS / MS.

As amostras foram analisadas para oito variantes de MC (dm-7-MC-RR, MC-RR, MC-YR, dm-7-MC-LR, MC-LR, MC-LY, MC-LW e MC-LF) e para nodularina (NOD) através de LC-MS/MS, como descrito em Lürling e Faassen (2013).

Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética (rendimento quântico máximo do fotossistema II) foi determinada com o auxílio de PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) e calculada de acordo com Genty e colaboradores (1989):

$$\Phi_{PSII} = (F_m - F_0)/F_m$$

Em que F_0 e F_m são a fluorescência mínima e máxima, respectivamente.

A eficiência fotossintética é usada como um indicador de estresse do aparato fotossintético (Parkhill *et al.*, 2001), e encontra ampla aplicação na determinação do efeito de peróxidos sobre cianobactérias (Matthijs *et al.*, 2012). A eficiência fotossintética do tratamento controle, sem H_2O_2 , foi utilizada como valor de referência.

Análises estatísticas

Neste estudo o EC50 foi definido como a concentração (ou dose) de peróxido capaz de causar 50% de redução na eficiência fotossintética das culturas expostas aos peróxidos quando comparadas aos seus respectivos controles. O cálculo do EC50 foi realizado no programa SigmaPlot (versão 12.5) ao plotarmos as eficiências fotossintéticas medidas contra os valores nominais dos peróxidos, através de regressão não-linear usando modelo padrão de resposta logística de quatro parâmetros.

As dinâmicas dos peróxidos nas culturas de morfotipo unicelular, colonial e sem cianobactéria foram comparadas entre si por análise de medidas repetidas ANOVA através do pacote de análises SPSS (versão 2.0, IBM *statistics*). As concentrações de MC nas culturas de *M. aeruginosa*, tanto dissolvidas no meio quanto particuladas, bem como a degradação das mesmas ao serem expostas a diferentes concentrações de H₂O₂ foram comparadas entre si e com os respectivos tratamentos controle através de análises de variância one-way ANOVA, também realizadas através do programa SPSS. Quando pertinente, sub-grupos homogêneos foram definidos através de análise *post hoc* de Tukey, considerando $p < 0.05$.

A normalidade de todos os dados foi testada através do teste Shapiro-Wilk através do software SPSS.

3) RESULTADOS

Dinâmica de degradação e liberação dos peróxidos nas condições experimentais utilizadas

Afim de compreender a dinâmica de degradação do H_2O_2 e do CaO_2 nas condições experimentais, a concentração de peróxidos no meio de cultura contendo os morfotipos unicelular, colonial ou na ausência de cianobactéria foi avaliada.

Os resultados apontaram que, tanto para H_2O_2 quanto para CaO_2 , a redução na concentração de peróxidos no meio foi maior nas culturas com morfotipo unicelular do que colonial, e menor no meio de cultura sem cianobactéria. Ao final de 24 horas, culturas unicelulares apresentaram 6% da concentração inicial de H_2O_2 (0.25 mg L^{-1}), enquanto culturas coloniais apresentaram 12.5% (0.5 mg L^{-1}) e o meio de cultura sem cianobactéria apresentou 25% (1 mg L^{-1}) da concentração inicial de H_2O_2 adicionada (Figura 1). O resultado encontrado no meio de cultura sem cianobactéria indica uma degradação natural de 75% da quantidade inicial de H_2O_2 após 24 horas nas condições experimentais utilizadas.

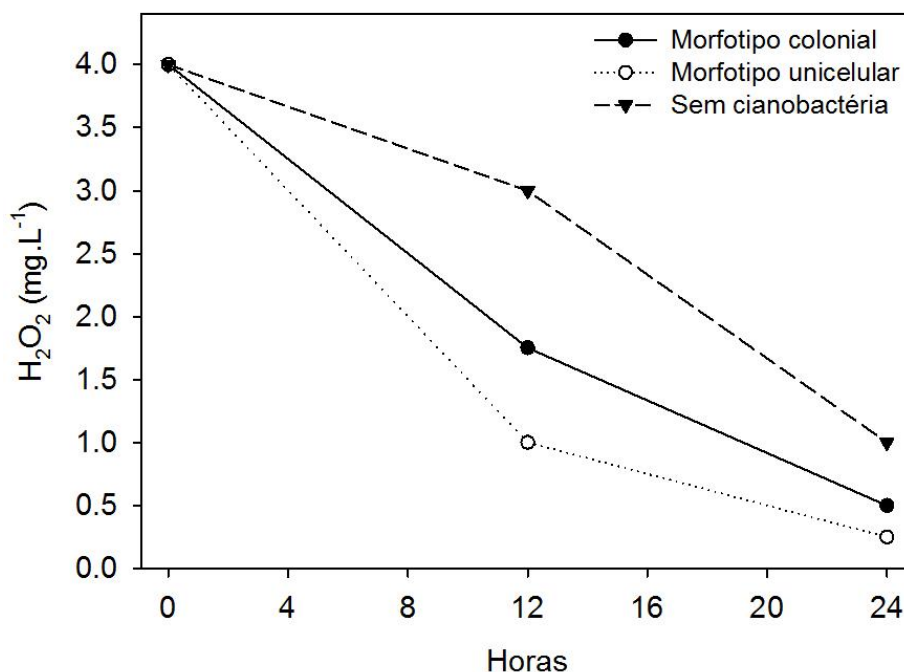


Figura 1: Dinâmica do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao longo de 24 horas em meio de cultura contendo os morfotipos colonial, unicelular e meio de cultura sem cianobactérias.

Diferente do observado para H_2O_2 , CaO_2 apresentou uma dinâmica inicial de liberação de peróxidos, sendo observada a diminuição na concentração de peróxido somente nas culturas com cianobactéria em 12 e 24h (Figura 2). Tanto as culturas com morfotipo colonial, quanto unicelular e o meio sem cianobactéria apresentaram uma concentração inicial de 21% da concentração adicionada. Ou seja, apesar de terem sido adicionados 7 mg L^{-1} de CaO_2 , a concentração inicial em todas as culturas foi de 1.5 mg L^{-1} . Em 1h sob as condições experimentais utilizadas, houve a liberação de peróxidos, elevando a concentração de 21 para 28.5% (2 mg L^{-1}) em todos os três tratamentos. Nas primeiras 2 horas de experimento, a concentração de peróxidos no meio sem cianobactéria aumentou para 43% (3 mg L^{-1}) da concentração adicionada inicialmente, permanecendo assim até o final das 24 horas de avaliação. Em 12h após o início do experimento, culturas unicelulares apresentaram 0.7% (0.05 mg L^{-1}) da concentração inicial, enquanto que culturas coloniais apresentaram 14% (1 mg L^{-1}). Ao final do período de observação, a concentração de peróxidos nas culturas com cianobactérias (tanto o morfotipo unicelular quanto colonial) foi zero.

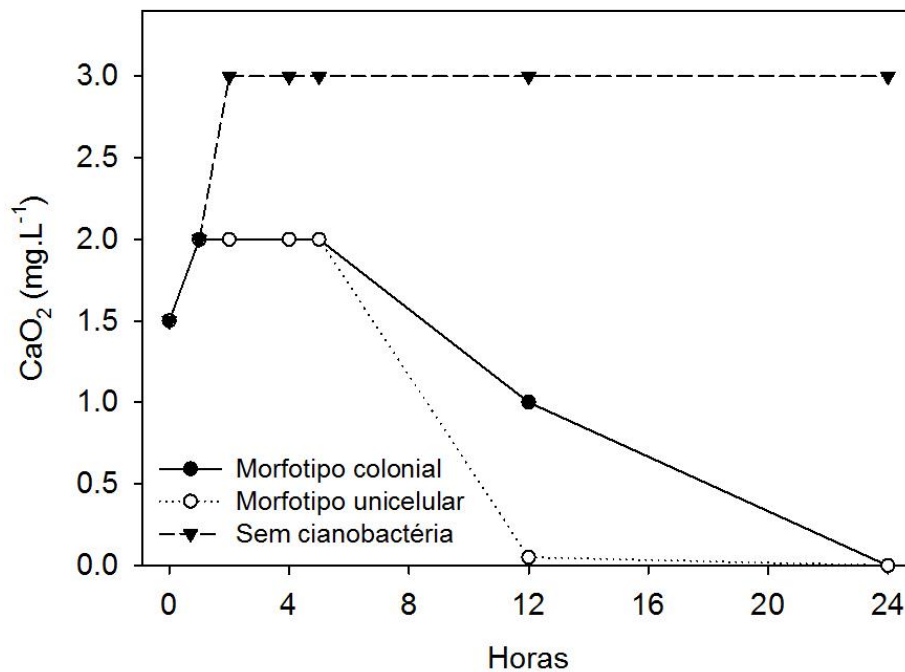


Figura 2: Dinâmica do peróxido cálcio (CaO₂) ao longo de 24 horas em meio de cultura contendo os morfotipos colonial, unicelular e meio de cultura sem cianobactérias.

Efeito do H₂O₂ na degradação de microcistina

Para testar o potencial de degradação de H₂O₂, as concentrações de 0, 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de H₂O₂ foram adicionadas em meios de cultura contendo 100 µg L⁻¹ de MC dissolvida, que foi avaliada após 24 horas. Os resultados apontaram que somente 8 mg L⁻¹ de H₂O₂ foi capaz de degradar significativamente ($F_{4,10} = 7.7$; $p = 0.005$) a MC total dissolvida (Figura 3). O tratamento com 8 mg L⁻¹ reduziu em 12% (aproximadamente 12 µg MC L⁻¹) a concentração de MC com relação ao tratamento que não foi exposto ao H₂O₂.

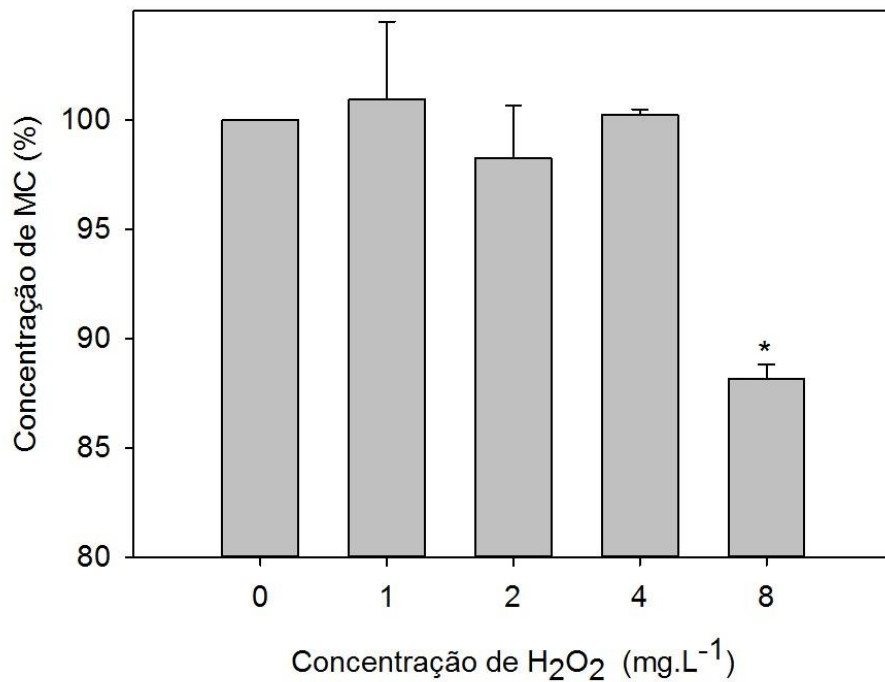


Figura 3: Percentual da concentração de microcistina (MC) em relação ao controle (0 mg) após 24 horas em meio de cultura com as concentrações de H₂O₂ testadas (0, 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹). O asterisco sobre a barra representa diferença estatística significativa quando comparado com o controle. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

Efeito de H₂O₂ na eficiência fotossintética e no conteúdo e liberação de microcistinas dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

O cálculo das doses efetivas (EC₅₀) de H₂O₂ para os morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa* revelou que, tanto para LEA12 quanto para LEA13, colônias requerem uma dose mais alta de H₂O₂ para que 50% de sua eficiência fotossintética seja reduzida (Figuras 4 e 5, respectivamente). Esse resultado indica maior resistência de colônias às doses de H₂O₂ quando comparadas com o morfotipo unicelular. O EC₅₀ para o morfotipo colonial de LEA12 foi de 1.3 mg L⁻¹, enquanto que para o morfotipo unicelular foi de 0.76 mg L⁻¹. Para a linhagem LEA13 (que possuem

colônias maiores do que LEA12), o EC50 para colônias foi de 3.7 mg L⁻¹, enquanto que para o morfotipo unicelular foi de 1.1 mg L⁻¹. Foi realizado também um teste extra para que avaliar se a densidade das culturas poderia influenciar no EC50. A concentração de 2 mg L⁻¹ foi adicionada em culturas unicelulares três vezes mais densas do que as culturas previamente testadas. Os resultados encontrados apontaram que enquanto 2 mg L⁻¹ de H₂O₂ não foi capaz de afetar a eficiência fotossintética de colônias em nenhum grau, reduziu em 94.5% a eficiência fotossintética de culturas unicelulares com a mesma densidade das culturas coloniais, e reduziu em 50% a eficiência fotossintética de culturas unicelulares três vezes mais densas (Figura 5).

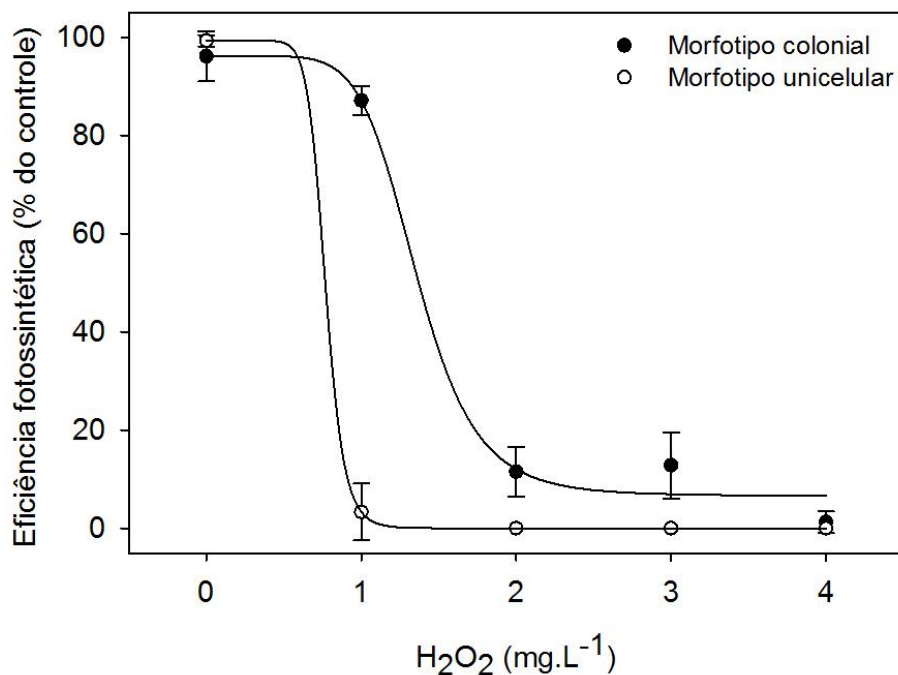


Figura 4: Eficiências fotossintéticas (em percentual relativo aos controles) dos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 após 24h de exposição às cinco concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0, 1, 2, 3 e 4 mg L⁻¹). Linhas representam as regressões não-lineares usadas para o cálculo dos EC50s. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

Com relação às concentrações de MC nas culturas coloniais e unicelulares quando expostas a H_2O_2 , tanto para LEA12 quanto para LEA13, os resultados mostraram que as doses efetivas (EC50) (0.76 mg L^{-1} para o morfotipo unicelular e 1.3 mg L^{-1} para o morfotipo colonial de LEA12; 1.1 mg L^{-1} para o morfotipo unicelular e 3.7 mg L^{-1} para o morfotipo colonial de LEA13) encontradas não aumentaram significativamente a quantidade de MC dissolvida ou particulada. Apesar dos valores não serem significativos, observou-se uma relação diretamente proporcional da concentração de MC dissolvida no meio com as concentrações de H_2O_2 testadas. Ou seja, quanto mais alta a concentração de H_2O_2 usada, maior a concentração de MC detectada no meio. O aumento de MC dissolvida no meio foi acompanhado pela diminuição de MC no interior das células e pela diminuição da eficiência fotossintética das culturas, apontando um possível rompimento das células e liberação de MC nas culturas expostas a doses mais altas de H_2O_2 (Figuras 6 e 7).

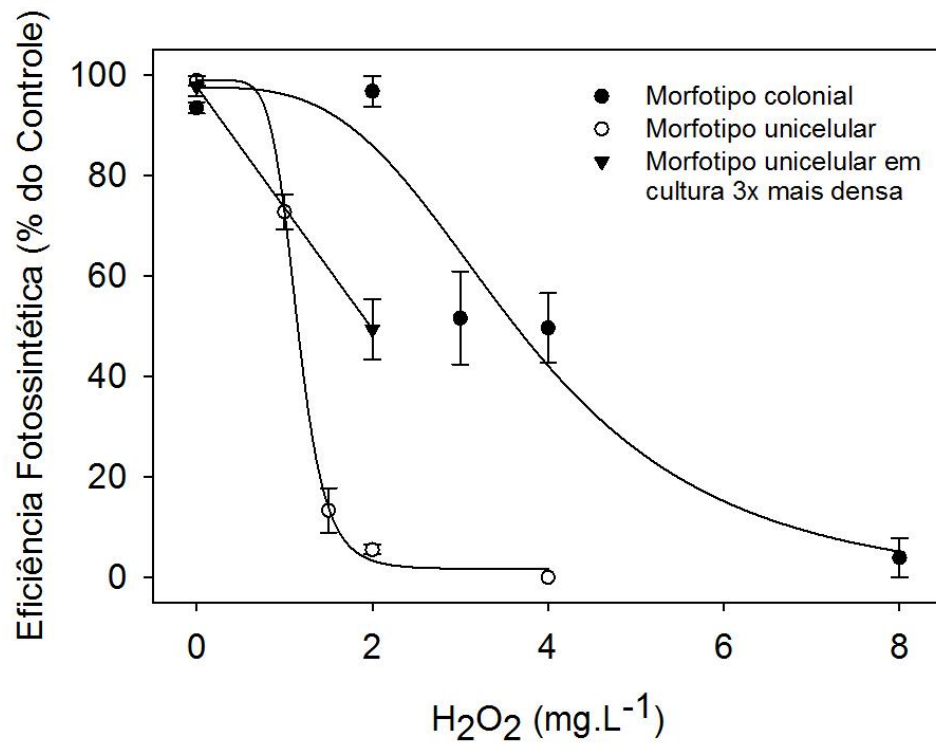


Figura 5: Eficiências fotossintéticas (em porcentual relativo aos controles) de LEA13 em culturas coloniais e unicelulares com a mesma densidade inicial e em culturas unicelulares três vezes mais densas do que as demais culturas, após 24h de exposição a 0, 1, 1.5, 2 e 4 $mg L^{-1}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para o morfotipo unicelular; 0, 2, 3, 4, e 8 $mg H_2O_2 L^{-1}$ de para o morfotipo colonial e de 2 $mg H_2O_2 L^{-1}$ para culturas unicelulares três vezes mais densas. Linhas representam as regressões não-lineares usadas para o cálculo dos EC_{50} s. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n=3$).

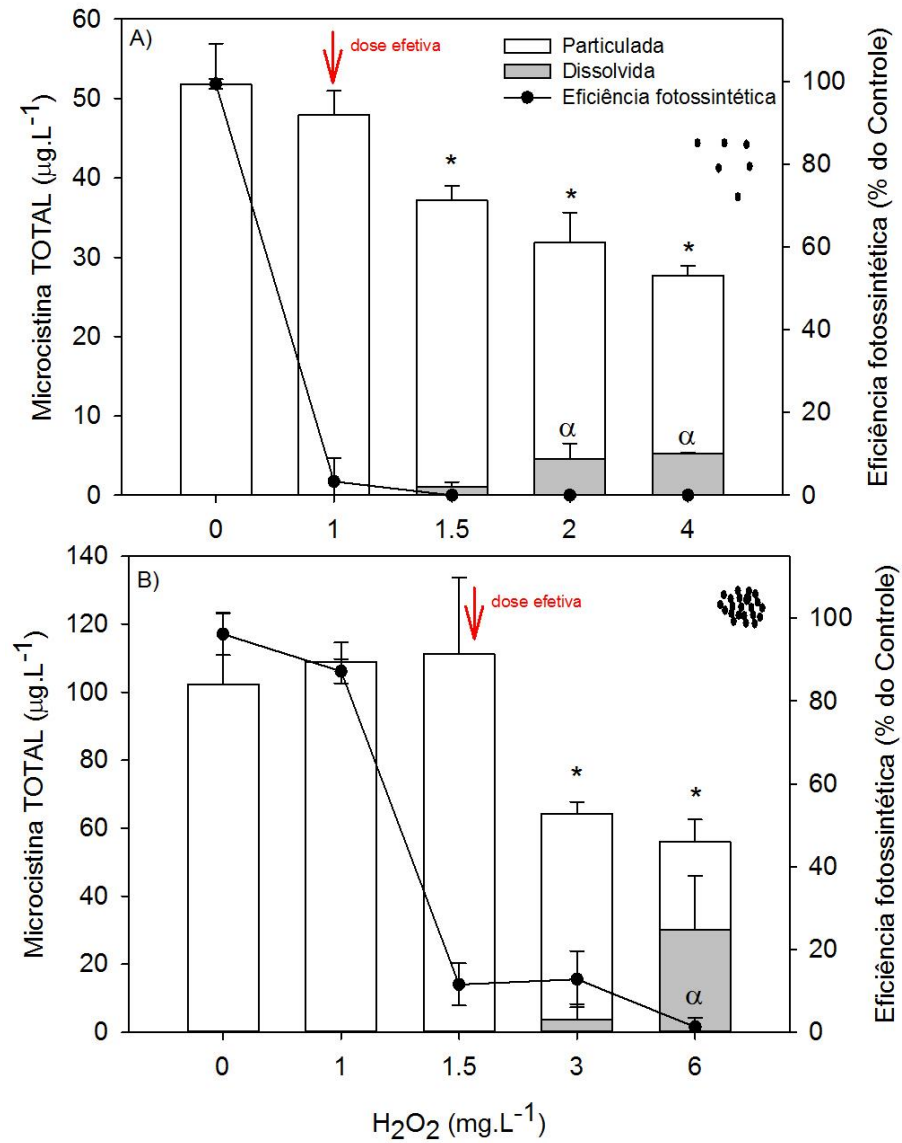


Figura 6: Concentração de microcistina (MC) particulada (barras brancas) e dissolvida (barras cinzas) em porcentagem relativa ao controle (0 mg) de LEA12 após 24 horas da adição das concentrações de 0, 1, 1.5, 2 e 4 $mg H_2O_2 L^{-1}$ para o morfotipo unicelular (A), e 0, 1, 1.5, 3 e 6 $mg H_2O_2 L^{-1}$ para o morfotipo colonial (B). Os símbolos de asterisco sobre as barras representam diferença estatística significativa da concentração de MC particulada quando comparada com o controle. Os símbolos alfa sobre as barras representam diferença estatística significativa da concentração de MC dissolvida quando comparada com o controle. As setas vermelhas indicam a concentração de H_2O_2 mais próxima da dose efetiva (EC50) calculada. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

De maneira geral, as doses de H_2O_2 capazes de causar a liberação significativa de MC para o meio no morfotipo unicelular, não aumentaram a concentração de MC dissolvida no meio das culturas do morfotipo colonial. Em LEA12, a concentração de 2 mg L^{-1} de H_2O_2 causou liberação significativa de MC para o meio em culturas unicelulares, enquanto que a liberação significativa de MC para o meio somente foi observada para o morfotipo colonial na concentração de 6 mg L^{-1} (Figura 6). Dinâmica semelhante foi observada para LEA 13, em que culturas unicelulares expostas a 2 mg L^{-1} de H_2O_2 apresentaram concentração significativa de MC dissolvida no meio, enquanto que culturas coloniais expostas à mesma concentração de H_2O_2 não apresentaram liberação de MC (Figura 7).

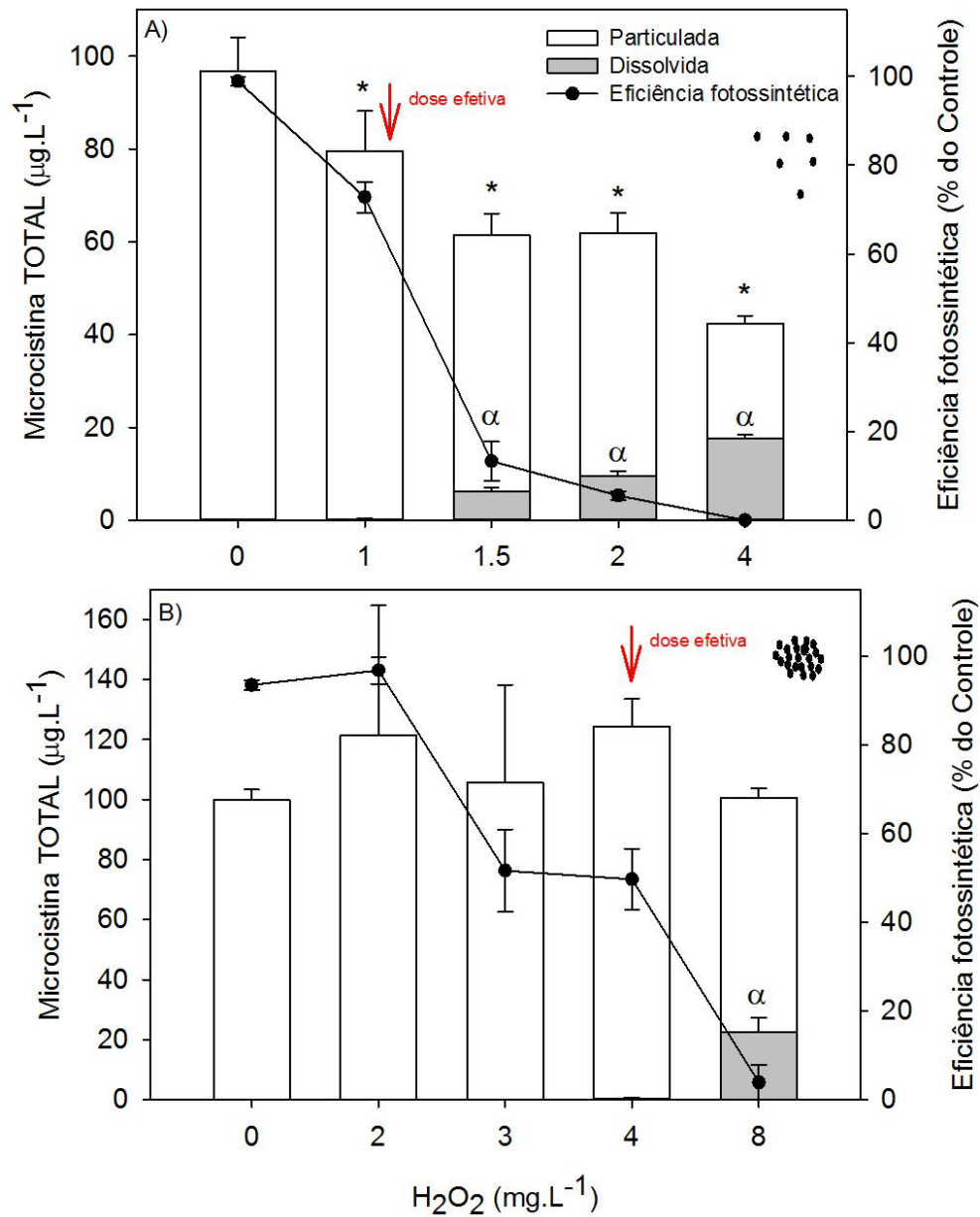


Figura 7: Concentração de microcistina (MC) particulada (barras brancas) e dissolvida (barras cinzas) em porcentagem relativa ao controle (0 mg) de LEA13 após 24 horas da adição das concentrações de 0, 1, 1.5, 2 e 4 mg H₂O₂ L⁻¹ para o morfotipo unicelular (A), e 0, 1, 1.5, 3 e 6 mg H₂O₂ L⁻¹ para o morfotipo colonial (B). Os símbolos de asterisco sobre as barras representam diferença estatística significativa da concentração de MC particulada quando comparada com o controle. Os símbolos alfa sobre as barras representam diferença estatística significativa da concentração de MC dissolvida quando comparada com o controle. As setas vermelhas indicam a concentração de H₂O₂ mais próxima da dose efetiva (EC50) calculada. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

A análise de variantes de MC particulada e dissolvida no meio apontou pouca diferença entre os morfotipos e entre as concentrações de H₂O₂ testadas. A variante YR foi a mais abundante em todos os casos, apresentando valores de 48% a 75% do total de MC no interior das células e dissolvida no meio. Em LEA12, colônias apresentaram conteúdo de aproximadamente 10% a mais da variante RR, 10% a menos da variante YR, e uma variante a mais de MC do que as culturas unicelulares, a variante LR (Figura 8). Na linhagem LEA13, as diferenças entre as variantes de MC encontradas foram ainda menores do que em LEA12. Entretanto, semelhante a LEA12, culturas coloniais de LEA13 também apresentaram maior proporção da variante LR particulada (Figura 9).

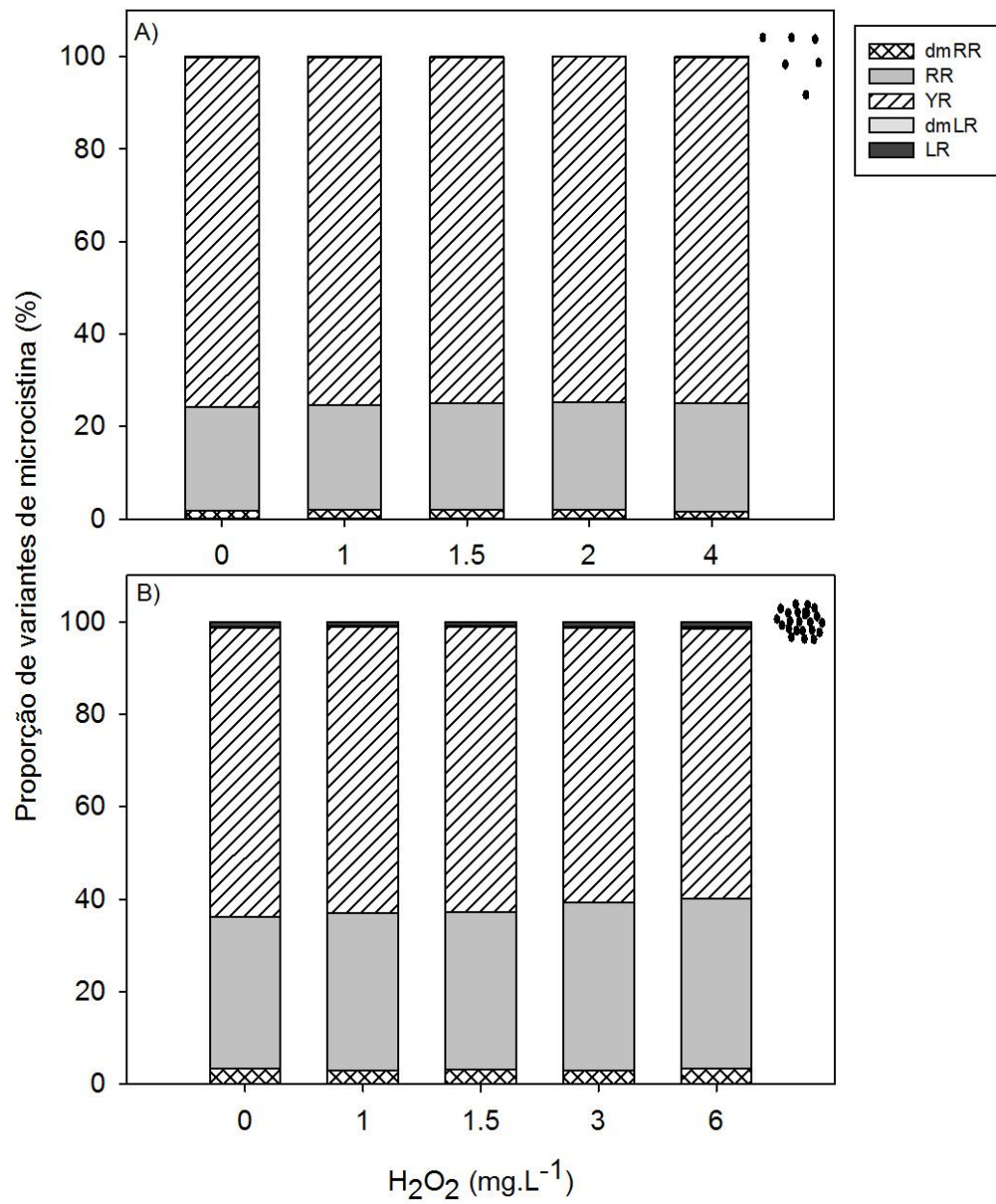


Figura 8. Proporção das cinco variantes de microcistina (MC) particuladas de LEA12 em porcentagem relativa ao controle (0 mg) após 24 horas da adição das concentrações de 0, 1, 1.5, 2 e 4 mg H₂O₂ L⁻¹ em unicélulas (A), e 0, 1, 1.5, 3 e 6 mg H₂O₂ L⁻¹ em colônias (B).

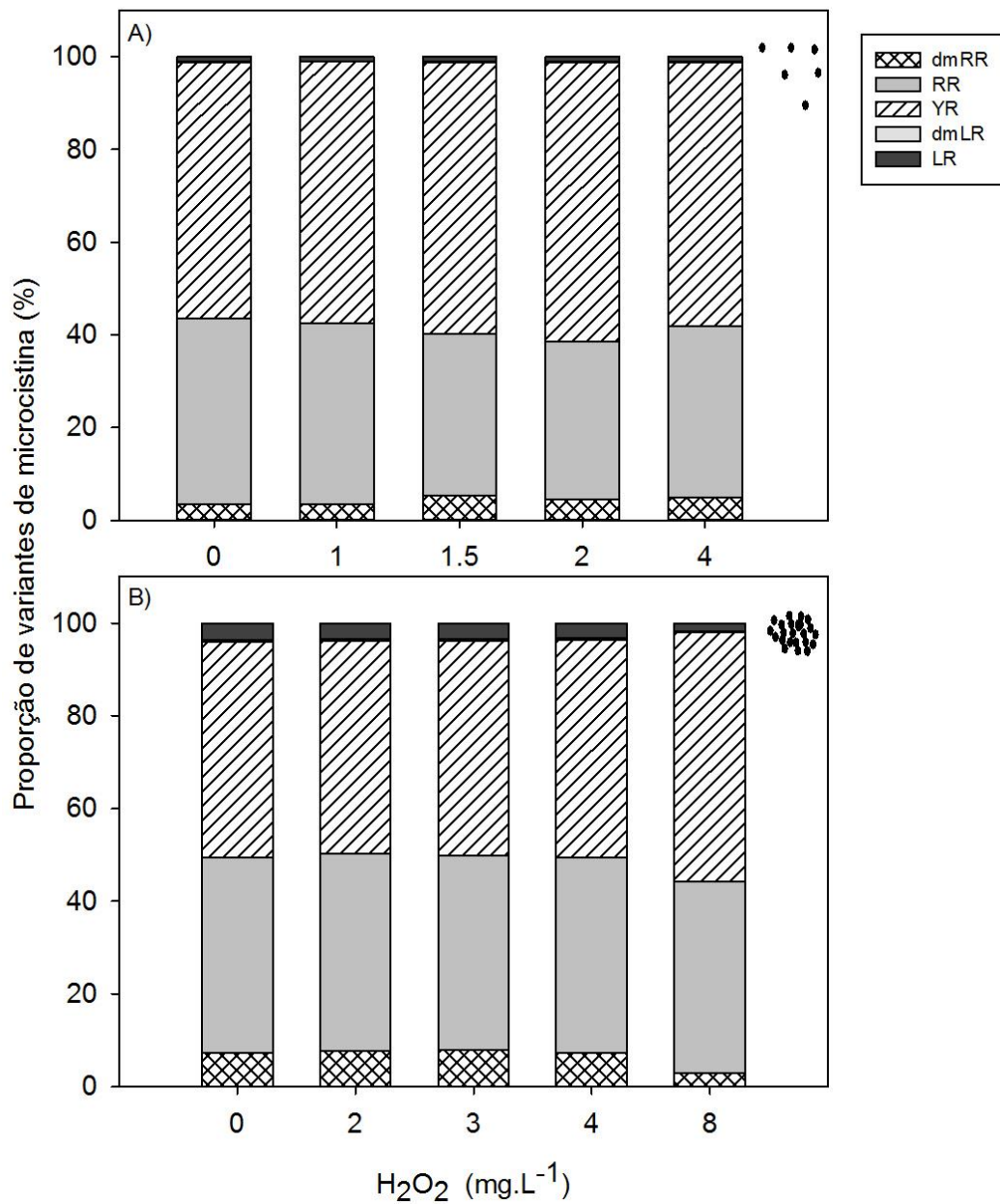


Figura 9. Proporção das cinco variantes de microcistina (MC) particuladas de LEA13 em porcentagem relativa ao controle (0 mg) após 24 horas da adição das concentrações de 0, 1, 1.5, 2 e 4 mg H₂O₂ L⁻¹ em unicélulas (A), e 0, 2, 3, 4 e 8 mg H₂O₂ L⁻¹ em colônias (B).

Efeito de CaO₂ na eficiência fotossintética de colônias e unicélulas de *Microcystis aeruginosa*

O efeito de CaO₂ foi testado somente na linhagem LEA13. Assim como nos testes com H₂O₂, culturas coloniais também foram menos afetadas do que

unicelulares quando expostas a CaO_2 . A dose efetiva para diminuir em 50% a eficiência fotossintética do morfotipo unicelular foi de 2.2 mg L^{-1} , enquanto que para colônias o EC50 foi de 5.8 mg L^{-1} (Figura 10). O pH nas culturas logo após a adição de CaO_2 aumentou de 7.7 nos tratamentos controle sem adição de CaO_2 para 8.5 na concentração mais alta utilizada para culturas unicelulares (7 mg L^{-1}) e para 9.6 na concentração mais alta utilizada para culturas coloniais (22 mg L^{-1}). Ao final de 24 horas de experimento, os valores de pH diminuíram de forma geral, passando de 7.7 para 7.4 nos tratamentos controle, de 7.9 para 7.5 na concentração mais próxima da dose efetiva para o morfotipo unicelular (2 mg L^{-1}), e de 8.2 para 7.7 na concentração mais próxima da dose efetiva para colônias (4.5 mg L^{-1}).

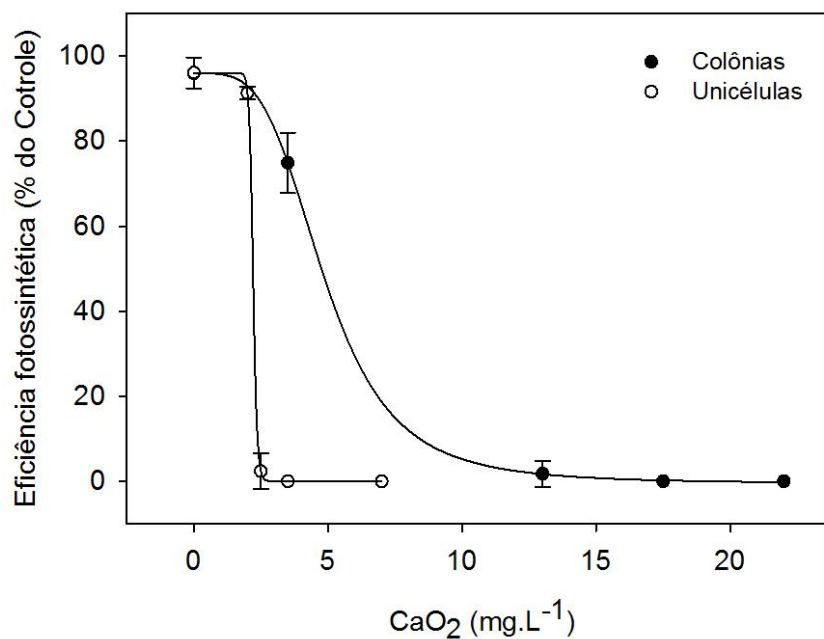


Figura 10: Eficiências fotossintéticas (em porcentual relativo aos controles) dos morfotipos coloniais e unicelulares de LEA13 após 24h de exposição a 0, 1, 2, 2.5, 3.5 e 7 mg L^{-1} de peróxido de cálcio (CaO_2) para o morfotipo unicelular e 0, 4.5, 13, 17.5 e $22 \text{ mg CaO}_2 \text{ L}^{-1}$ para o morfotipo colonial. Linhas representam as regressões não-lineares usadas para o cálculo dos EC50s. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

4) DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos de peróxidos na eficiência fotossintética e no conteúdo e liberação de MC de dois morfotipos de *M. aeruginosa*. Os resultados apontaram a necessidade da utilização de maior dose de peróxidos afim de diminuir a atividade fotossintética do morfotipo colonial quando comparado com o unicelular. Além disso, mostramos que uma maior dose de H₂O₂ é necessária para afetar culturas unicelulares mais densas. Entretanto, culturas unicelulares três vezes mais densas do que as culturas coloniais foram mais afetadas pelo H₂O₂, ou seja, sugerindo que o papel da morfologia na proteção das células é mais efetivo do que a densidade das culturas nas condições testadas.

Uma das hipóteses para explicar a maior sensibilidade de cianobactérias aos efeitos dos peróxidos quando comparadas com outras microalgas (Drabkova, Matthijs, *et al.*, 2007; Barrington e Ghadouani, 2008) está relacionada ao fato de serem organismos procariontes. Em cianobactérias o aparato fotossintético está mais exposto a agentes externos, enquanto que em algas eucariontes se encontra mais protegido dentro dos cloroplastos. A diferença de sensibilidade aos peróxidos entre os morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa* não havia sido avaliada até o presente estudo. Nossa hipótese para explicar o menor efeito dos peróxidos em colônias está relacionada ao arranjo estrutural das células. Uma vez que a ação dos peróxidos está relacionada, dentre outros motivos, a barreiras físicas, células no interior de colônias parecem estar mais protegidas de eventuais agentes adicionados externamente.

Essa hipótese também está de acordo com os resultados encontrados nos experimentos em que testamos a adsorção de peróxido. Nestes experimentos foi

observado uma maior adsorção de peróxido nas culturas unicelulares, tanto para H_2O_2 quanto para CaO_2 . Uma vez que as culturas coloniais e unicelulares apresentavam a mesma densidade, é possível que células do interior das colônias não tenham entrando em contato com os peróxidos, adsorvendo conseqüentemente menor quantidade deste. Desta forma, apontamos que a forma colonial pode ser um mecanismo de proteção às células contra a ação dos peróxidos de hidrogênio e de cálcio.

Ao testarem o efeito do sulfato de cobre no controle do crescimento de culturas coloniais e unicelulares de *M. aeruginosa*, Wu e colaboradores (2007) encontraram através de parâmetros fotossintéticos e de produção enzimática que linhagens coloniais possuem mais resistência aos efeitos do cobre do que linhagens unicelulares. Li e colaboradores (2015) também observaram que a formação de colônias em *M. aeruginosa* pode ser uma estratégia em resposta ao estresse químico. Além disso, eles sugerem que maior concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS), comumente encontrado em maior concentração no morfotipo colonial, pode fornecer maior proteção às células devido à capacidade dos EPS em absorver compostos orgânicos e inorgânicos.

Com relação às cianotoxinas, apesar das quantidade não serem significativas, as doses efetivas (EC50) de H_2O_2 causaram maior liberação de MC para o meio em culturas unicelulares do que em culturas coloniais. Segundo os dados de eficiência fotossintética, as células nas colônias foram menos afetadas do que as células nas culturas unicelulares, apresentando menor número de células rompidas, conseqüentemente menor liberação de MC para o meio. Nossos resultados apontaram que é necessária uma concentração de H_2O_2 pelo menos três vezes mais alta para causar a liberação significativa de MC em culturas coloniais quando

comparadas com culturas unicelulares. Qian e colaboradores (2010) mostraram que o H_2O_2 é capaz de regular negativamente a transcrição do gene *mcyD*, indicando uma diminuição na concentração de MC nas células. Em nosso estudo, ao final de 24 horas de exposição ao H_2O_2 , a diminuição do conteúdo de MC nas células foi dose-dependente em culturas unicelulares. Entretanto, a diminuição do conteúdo de MC nas células foi acompanhada pelo aumento de MC dissolvida no meio e pela redução da eficiência fotossintética. Desta forma, é mais provável que a diminuição do conteúdo de MC nas culturas unicelulares tenha sido devido à ruptura das células e não devido à diminuição no nível de MC produzida. O mesmo não foi observado para culturas coloniais, em que a diminuição do conteúdo de MC nas células não apresentou dose-dependência tão clara como nas culturas unicelulares.

As doses efetivas de H_2O_2 capazes de diminuir em 50% a eficiência fotossintética tanto do morfotipo colonial quanto unicelular não alteraram as concentrações de MC, seja dentro das células ou dissolvida no meio. No experimento com a linhagem LEA12, com EC_{50} de 0.76 mg L^{-1} para culturas unicelulares e 1.3 mg L^{-1} para culturas coloniais, as doses de 2, 4 mg L^{-1} (no teste com o morfotipo unicelular) e 6 mg L^{-1} (no teste com o morfotipo colonial) acarretaram no aumento significativo de 8%, 10% e 30%, respectivamente, de MC dissolvida no meio a mais que o tratamento sem adição de H_2O_2 . De forma semelhante, em LEA13, com EC_{50} de 1.1 mg L^{-1} para culturas unicelulares e 3.7 mg L^{-1} para culturas coloniais, as doses de 1.5, 2, 4 mg L^{-1} (no teste com o morfotipo unicelular) e 8 mg L^{-1} (no teste com o morfotipo colonial) acarretaram no aumento significativo de 6%, 10%, 16% e 21%, respectivamente, de MC dissolvida no meio a mais que o tratamento sem adição de H_2O_2 . No teste em que avaliamos a capacidade de H_2O_2 em degradar MCs em 24 horas nas condições experimentais testadas, apontamos que somente a concentração de 8 mg L^{-1} foi capaz

de degradar significativamente a MC dissolvida no meio. Ainda assim, essa degradação foi de apenas 12% do total de MC comparado com o tratamento controle sem adição de H_2O_2 . Como 8 mg L^{-1} de H_2O_2 é mais que o dobro da maioria dos EC_{50} s encontrados neste estudo, a utilização de H_2O_2 para a degradação de MCs é desaconselhada uma vez que altas doses podem afetar componentes do zooplâncton e outros organismos (Matthijs *et al.*, 2012; Barrington, Reichwaldt, *et al.*, 2013) . Ao testarem o efeito de 10.2, 51 e 102 mg L^{-1} de H_2O_2 , Fan e colaboradores (2014) não observaram aumento na concentração de MC dissolvida ao final de 5 dias de experimento. Os autores apontaram a degradação como possível responsável pela queda de MC abaixo dos níveis de detecção. Por outro lado, assim como em nosso estudo, Lüring e colaboradores (2014) observaram significativa liberação de MC na água após a aplicação de 4 e 8 mg L^{-1} em culturas de *M. aeruginosa*

Com relação às doses efetivas utilizadas em trabalhos com aplicações de H_2O_2 em lagos, a presença de *M. aeruginosa* em uma estação de tratamento de efluentes foi suprimida com a utilização de 0.003 g (aproximadamente 100 mg L^{-1}) de H_2O_2 por $\mu\text{g chl-}a$ fitoplanctônica dentro de 48h após a aplicação (Barrington e Ghadouani, 2008). Wang e colaboradores (2012) testaram o efeito de H_2O_2 na eficiência fotossintética de amostras de campo com predominância de colônias de *M. aeruginosa* e encontraram dose efetiva mínima de 60 mg L^{-1} para a inativação de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila. Em laboratório, estudos registraram valores de EC_{50} s para H_2O_2 de 0.27 mg L^{-1} , baseado no rendimento fotossintético de *M. aeruginosa* (Drabkova, Admiraal, *et al.*, 2007), a 102 mg L^{-1} , baseado na integridade da membrada celular (Fan *et al.*, 2013).

O CaO_2 é comumente utilizado no tratamento para oxigenação de sedimentos, sendo seu uso para o controle de cianobactérias mais raro do que o de H_2O_2 . Levando

em consideração os valores de EC50 calculados nesse estudo, a escolha do H₂O₂ em detrimento do CaO₂ para o manejo de cianobactérias seria mais lógica uma vez que os EC50s de CaO₂ foram mais altos para ambos os morfotipos. Entretanto, a maior estabilidade do CaO₂ e a liberação mais lenta de peróxidos, prologando o efeito sobre as células de cianobactérias, deve ser levada em conta. Nossos resultados sobre a liberação de peróxidos para o meio estão de acordo com a ação prolongada proposta em estudos anteriores. Ao final das 24 horas de experimento, enquanto a concentração de H₂O₂ no meio reduziu em 75%, passando de 4 mg L⁻¹ para 1mg L⁻¹, a concentração de CaO₂ aumentou em 100%, passando de 1.5 mg L⁻¹ para 3 mg L⁻¹. Além disso, devido ao estado sólido do CaO₂, seu armazenamento e transporte são facilitados se comparados com o H₂O₂ em estado líquido. Além do efeito direto nas células de cianobactérias através da liberação de H₂O₂, o CaO₂ também foi descrito como capaz de reduzir a concentração de fósforo na água e agir como coagulante das células de cianobactérias, influenciando de forma indireta no controle de florações (Cho e Lee, 2002; Hanh *et al.*, 2005). Por outro lado, a aplicação do CaO₂ requer maior controle sobre a taxa de liberação de H₂O₂ no meio, bem como o controle do pH (Novotortsev *et al.*, 2012). Estudos de maior duração avaliando a dinâmica de liberação de H₂O₂ por CaO₂ no ambiente são necessários para guiar a escolha do melhor método para o controle de cianobactérias.

Cho e Lee (2002) sugeriram a capacidade do CaO₂ em inibir o crescimento e diminuir o conteúdo de clorofila de uma linhagem de *M. aeruginosa*. Em uma abordagem mais aplicada, Noyma e colaboradores (2016) utilizaram o CaO₂ juntamente com a técnica de *Flock&Sink*, com o objetivo de realizar a inativação das células de cianobactérias no sedimento evitando conseqüentemente a liberação de toxinas na coluna d'água. Neste estudo, a aplicação de 1, 2 e 4 mg L⁻¹ de CaO₂ em

densas amostras de cianobactéria trazidas do (com predominância de *M. aeruginosa*) foram capazes de reduzir parcialmente a eficiência fotossintética das células, enquanto que doses de 8, 16 e 32 mg L⁻¹ causaram drástica redução.

Como conclusão, este estudo aponta que a dose efetiva de peróxidos (H₂O₂ e CaO₂) para o manejo de florações de *M. aeruginosa* pode variar de acordo com a morfologia predominante. A forma colonial de *M. aeruginosa* parece ser uma vantagem adicional na proteção das células contra agentes químicos como peróxidos, de forma que a aplicação de doses mais altas pode ser necessária no caso de mitigação de florações com predominância de *Microcystis* colonial. Além disso, mostramos que a dose efetiva pode ser linhagem-dependente, bem como dependente da densidade inicial da floração. As doses efetivas de H₂O₂ calculadas neste estudo não afetaram o conteúdo e a liberação de MC. Entretanto, a dose de 4 mg L⁻¹ sugerida para o manejo de cianobactérias (Matthijs *et al.*, 2012) causou significativa liberação de MC para o meio quando realizamos o teste em culturas unicelulares. O mesmo não ocorreu para culturas coloniais. Nossos resultados também confirmaram que o CaO₂ possui liberação de peróxidos mais lenta do que o H₂O₂, sendo mais indicado para a utilização em ambientes que requerem um tempo de processamento maior. Embora os resultados sejam promissores, o uso de peróxidos em ambientes aquáticos deve ser cuidadosamente avaliado. Apesar de estudos apontarem que a ação dos peróxidos ocorre principalmente em cianobactérias, uma análise detalhada sobre seu efeito em outros organismos como bactérias, zooplâncton e peixes é necessária.

CAPÍTULO 2 – O EFEITO DE ANTIBIÓTICOS (ENROFLOXACINA E OXYTETRACICLINA) NA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DOS MORFOTIPOS COLONIAL E UNICELULAR DA CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

1) INTRODUÇÃO

Os efeitos de fatores bióticos como predação (Yang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Van Wichelen *et al.*, 2010) e competição com outros componentes do fitoplâncton (Li e Li, 2012; Mello *et al.*, 2012) vêm sendo investigados para *Microcystis aeruginosa*. Fatores abióticos, como o aumento da temperatura (Bouchard e Purdie, 2011), aumento nos níveis de radiação ultravioleta (Zhang *et al.*, 2013) e o efeito de algicidas (Greenfield *et al.*, 2014; Lüring *et al.*, 2014) na regulação de florações de *M. aeruginosa* também vêm sendo investigados. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito de poluentes encontrados na água no crescimento e desenvolvimento de cianobactérias em geral. Dentre os diversos poluentes presentes na água, antibióticos têm chamado atenção na última década devido ao uso indiscriminado e a contínua descarga dos mesmos em ambientes aquáticos em todo o mundo (Kümmerer, 2009; Zhang *et al.*, 2014; Quadra *et al.*, 2017).

Dentre os antibióticos comumente encontrados em sistemas aquáticos, as tetraciclina pertencem a um dos grupos mais prescritos (Borghi e Palma, 2014; Kolar *et al.*, 2014) juntamente com as fluoroquinolonas, como é o caso da enrofloxacina (Rico *et al.*, 2013). As tetraciclina são muito utilizadas devido ao seu amplo espectro de ação e eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. As tetraciclina têm a capacidade de se ligar à subunidade ribossomal 30S, impedindo a associação do aminoacil-tRNA aos ribossomos

bacterianos, inibindo portanto a síntese de proteínas (Van Der Grinten *et al.*, 2010; González-Pleiter *et al.*, 2013). A enrofloxacina é uma fluoroquinolona também de amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e negativas e têm como alvo as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, essenciais para a duplicação e transcrição do DNA nas bactérias (Speltini *et al.*, 2010).

Um estudo recente avaliou o efeito de nove antibióticos (amoxicilina, ceftazidima, ceftriaxona, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim, ácido nalidixico, norfloxacino) em quatro espécies de cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon gracile*, *Chroococcum bergii*, *Planktothrix agradhii*). Os resultados mostraram efeitos como a redução da densidade populacional ou diminuição da capacidade fotossintética de algumas espécies, além de apontar que algumas espécies podem ser sensíveis a alguns antibióticos porém resistentes a outros (Dias *et al.* 2015). Outros estudos também evidenciaram uma grande variação nos valores de doses efetivas (EC50) de antibióticos em cianobactérias. Por exemplo, valores de EC50 de tetraciclina para *M. aeruginosa* variam entre 400 µg/L (Dias *et al.* 2010) e 90 µg/L (Halling-Sorensen *et al.* 2000). Estes resultados demonstram a necessidade de mais estudos a fim de elucidar o efeito de antibióticos em cianobactérias.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar o efeito de dois representantes de duas classes de antibióticos, a Oxytetraciclina e a Enrofloxacina, sobre a eficiência fotossintética de duas linhagens de *M. aeruginosa* levando em consideração uma abordagem morfológica. Para tanto, os morfotipos colonial e unicelular da mesma linhagem foram expostos a diferentes concentrações dos antibióticos. Além disso, a capacidade dos morfotipos unicelular e colonial de desenvolverem resistência ao antibiótico Oxytetraciclina foi avaliada.

2) MATERIAL E MÉTODOS

Organismos

As linhagens da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, LEA12 e LEA13, foram isoladas do Reservatório do Funil (RJ - Brasil) em 2013 pelo Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora. As culturas foram mantidas no *Plankton Laboratory* da Universidade de Wageningen (Holanda) a 25°C, 5 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14:10 horas (claro:escuro), em meio de cultura WC (Lüring e Beekman, 1999). No momento do isolameanto ambas linhagens se encontravam em forma colonial. De maneira geral, quando isoladas e cultivadas sob condições controladas em laboratório, as colônias se desfazem e as linhagens passam a existir predominantemente como unicélulas após algumas gerações (Bolch e Blackburn, 1996). A manutenção das culturas sob condições de baixa intensidade luminosa possibilitou um crescimento lento mantendo o morfotipo colonial. Para a realização dos experimentos e para o crescimento prévio das culturas, as condições foram de 25°C, 55 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas, em meio de cultura WC. Durante o período de crescimento prévio aos experimentos, culturas compostas pelo morfotipo unicelular foram obtidas através da separação manual e cultivo das células que eventualmente se separaram das colônias. Nesse estudo, as culturas em colônias se encontravam com 95% do total das células em colônias em ambas as linhagens, enquanto que as culturas unicelulares se encontravam com 100% das células em células isoladas ou bi-células, também em ambas as linhagens.

Antibióticos

Os testes de toxicidade foram realizados com dois antibióticos de uso comercial comumente utilizados na aquacultura (Rico *et al.*, 2014): o OXYBAC 50

(oxytetraciclina-HCl 50%, daqui em diante referida como OXYT) e o EnFlocin (enrofloxacina-HCl 20%, daqui em diante referida como ENRO). A oxytetraciclina foi escolhida para ser testada no presente estudo em detrimento de outras tetraciclinas devido a sua melhor solubilidade na água. Soluções de 100 mg L⁻¹ de ambos antibióticos foram preparadas em meio WC-modificado no dia anterior aos experimentos, mantidas em frasco âmbar para evitar possível fotodegradação e armazenadas em geladeira (temperatura de 6 e 10°C). Na tabela 1 encontram-se os dados dos antibióticos de estudo.

Tabela 1: Dados sobre os antibióticos utilizados

Antibiótico	Família	CAS	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Molecular
Oxytetraciclina	Tetraciclinas	2058-46-0	496,89	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₉
Enrofloxacina	Fluoroquinolonas	93106-60-6	359,40	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃

Efeito de Enrofloxacina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Afim de testar a toxicidade do antibiótico enrofloxacina (ENRO) sobre os morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa*, cinco concentrações do mesmo foram utilizadas e a eficiência fotossintética (Φ PSII, rendimento quântico do transporte de elétrons do fotossistema II) das culturas foi avaliada. Os morfotipos colonial e unicelular de LEA12 e LEA13 foram cultivados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL de meio de cultura com uma concentração inicial de 30 μ g clorofila-a L⁻¹, o que foi correspondente à uma densidade inicial de aproximadamente 10⁵ céls mL⁻¹. As

culturas foram expostas uma única vez ao ENRO nas seguintes doses: 0, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações de antibióticos utilizadas neste experimento, bem como no experimento com a oxytetraciclina, foram definidas em experimentos pilotos em que uma maior variação de concentrações foi testada de forma que no presente experimento fosse obtida uma curva de efeito-dose mais gradual. Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”) em triplicatas. Amostras de 2 mL para análise da eficiência fotossintética de dois morfotipos colonial e unicelular foram retiradas após 3, 6 e 24 horas de exposição ao antibiótico. A eficiência fotossintética é um indicador do bom funcionamento do aparato fotossintético de cianobactérias e, conseqüentemente, um indicador rápido do efeito do ENRO em sua fisiologia. A eficiência fotossintética foi medida com auxílio do PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) e calculada de acordo com Genty e colaboradores (1989):

$$\Phi\text{PSII} = (F_m - F_0)/F_m$$

Em que F_0 e F_m são a fluorescência mínima e máxima, respectivamente. A eficiência fotossintética do tratamento controle, sem ENRO, foi utilizada como valor de referência.

Neste estudo o EC50 foi definido como a dose de antibiótico capaz de causar 50% de redução na eficiência fotossintética máxima das culturas. O EC50 foi estimado após 24h de exposição aos antibióticos. As eficiências fotossintéticas medidas foram plotadas contra os valores nominais dos antibióticos e ajustadas, através de regressão não-linear, ao modelo padrão de resposta logarítmica de quatro parâmetros, com auxílio do programa SigmaPlot (versão 12.5).

Efeito de Oxytetraciclina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Afim de testar a toxicidade de um segundo antibiótico nos morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa*, cinco concentrações de Oxytetraciclina (OXYT) foram utilizadas e a eficiência fotossintética *M. aeruginosa* foi avaliada. Os morfotipos colonial e unicelular de LEA12 e LEA13 foram cultivadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL de meio de cultura a uma concentração inicial de 25 μg clorofila-a L^{-1} , o que foi correspondente à uma densidade inicial de aproximadamente 10^5 céls mL^{-1} . As culturas foram expostas uma única vez ao antibiótico OXYT nas seguintes doses: 0, 1000, 2000, 4000 e 8000 μg L^{-1} . Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”), em triplicatas. A análise da eficiência fotossintética e o cálculo do EC50 de culturas coloniais e unicelulares foram realizados como descrito no experimento com ENRO.

Efeito da re-exposição de Oxytetraciclina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

O objetivo desse experimento foi testar se os morfotipos colonial e unicelular cultivados em uma dose correspondente à metade do EC50 (determinado no experimento anterior) têm capacidade de desenvolver resistência ao antibiótico quando expostos uma segunda vez à uma dose efetiva de OXYT. Esse experimento foi realizado somente com LEA12. Os morfotipos colonial e unicelular foram cultivadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL de meio de cultura a uma concentração inicial de 40 μg clorofila-a L^{-1} , o que foi correspondente à uma densidade inicial de aproximadamente 10^5 céls mL^{-1} . Primeiramente, as culturas foram expostas a OXYT por 10 dias a uma concentração inicial de 500 μg L^{-1} e na ausência do antibiótico.

Após 10 dias, uma dose de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de OXYT foi adicionada às culturas perfazendo os seguintes tratamentos:

- Culturas ingênuas: morfotipos colonial e unicelular cultivados por 10 dias sem OXYT e então expostos a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- Culturas não-ingênuas: morfotipos colonial e unicelular cultivados por 10 dias a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e então expostos a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- Culturas controle: culturas dos morfotipos colonial e unicelular que nunca foram expostas a OXYT cultivadas por 10 dias, e então adicionado meio WC sem antibiótico na mesma proporção que os tratamentos anteriores.

A eficiência fotossintética das culturas ingênuas, não-ingênuas e controle foram avaliadas 24h após a adição da dose efetiva de antibiótico (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) em solução de WC ou de somente meio WC. O experimento foi realizado em cultivo fechado (tipo “batch”), em triplicatas. A análise da eficiência fotossintética das culturas coloniais e unicelulares foram realizados como descrito no experimento com ENRO.

Análises estatísticas

As eficiências fotossintéticas das culturas expostas às diferentes doses de antibióticos foram comparadas ao longo do tempo entre si e com os respectivos tratamentos controle por análise de variância de medidas repetidas ANOVA, e comparadas entre si em cada ponto no tempo avaliado por análise de variância unidirecional ANOVA. Sub-grupos homogêneos foram definidos através de análise *post hoc* de Tukey, considerando $p < 0.05$. As curvas geradas para o cálculo dos EC50s dos morfotipos colonial e unicelular foram comparadas entre si por análise de variância de medidas repetidas ANOVA.

No experimento de reexposição à oxytetraciclina, as diferenças entre as eficiências fotossintéticas finais e iniciais foram chamadas de *fold-change*. O *fold-change* foi calculado após a reexposição ao antibiótico e estatisticamente comparado por análise de variância uni-direcional ANOVA seguido por teste *post hoc* de Tukey (quando $p < 0,05$).

A normalidade de todos os dados foi testada através do teste Shapiro-Wilk. Todos os testes foram realizados através do pacote de análises SPSS (versão 2.0, IBM Statistics).

3) RESULTADOS

Efeito de Oxytetraciclina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Todas as doses de ENRO testadas resultaram em redução da eficiência fotossintética dos morfotipos colonial e unicelular das duas linhagens de *M. aeruginosa* ao longo das 24h de exposição (Figuras 1 e 2). Após 3h de exposição ao antibiótico, observou-se através da diminuição na eficiência fotossintética uma tendência do morfotipo colonial sendo menos afetado do que o unicelular, para ambas as linhagens através. Com 3h de exposição, as concentrações de 300, 600 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ afetaram significativamente LEA12 unicelular ($p < 0.05$) enquanto que as mesmas concentrações não afetaram LEA12 colonial ($p = 0.26$). Nas culturas de LEA13, após 3h de exposição ao ENRO, as concentrações de 600 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ afetaram significativamente o morfotipo unicelular ($p < 0.05$) enquanto que nenhuma concentração afetou significativamente o morfotipo colonial ($p = 0.58$). Entretanto, ao final de 24h de exposição, a tendência de colônias sendo menos afetadas do que o morfotipo unicelular não foi observada. A dose efetiva (EC50) de ENRO foi de

132.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (intervalo de confiança - IC = 99%) para o morfotipo unicelular e 135.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 93%) para o morfotipo colonial da linhagem LEA12. Para LEA13, os EC50s de ENRO foram de 103.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 99%) para o morfotipo unicelular e 100.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 98%) para colônias. A comparação das curvas geradas para calcular o EC50 de ambas as linhagens (Figura 3) apontou que as doses efetivas para os morfotipos colonial e unicelular não são diferentes ($p = 0.19$ e $p = 0.3$ para LEA12 e LEA13, respectivamente).

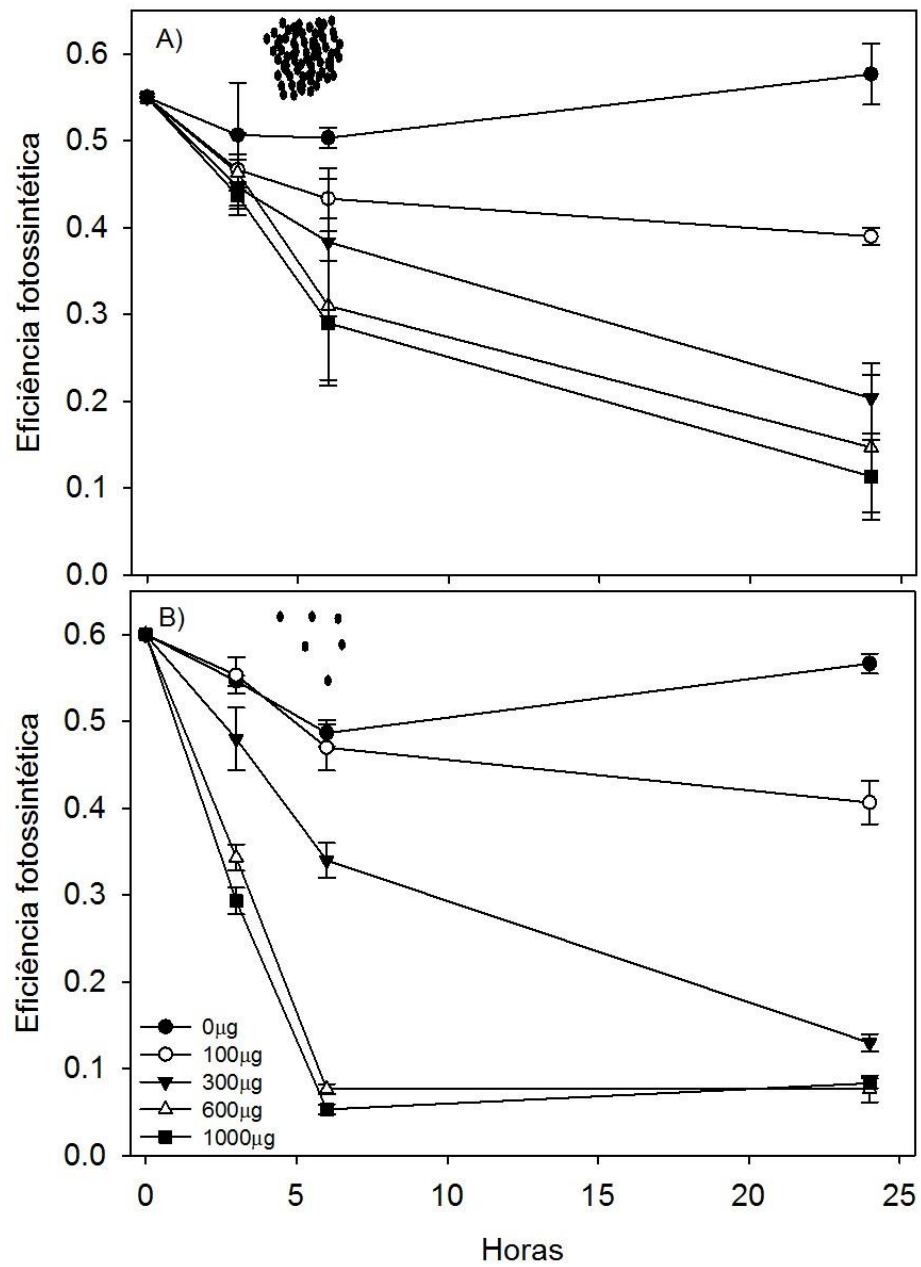


Figura 1: Eficiências fotossintéticas do morfotipo colonial (A) e unicelular (B) de LEA12 ao longo de 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico enrofloxacina (0, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

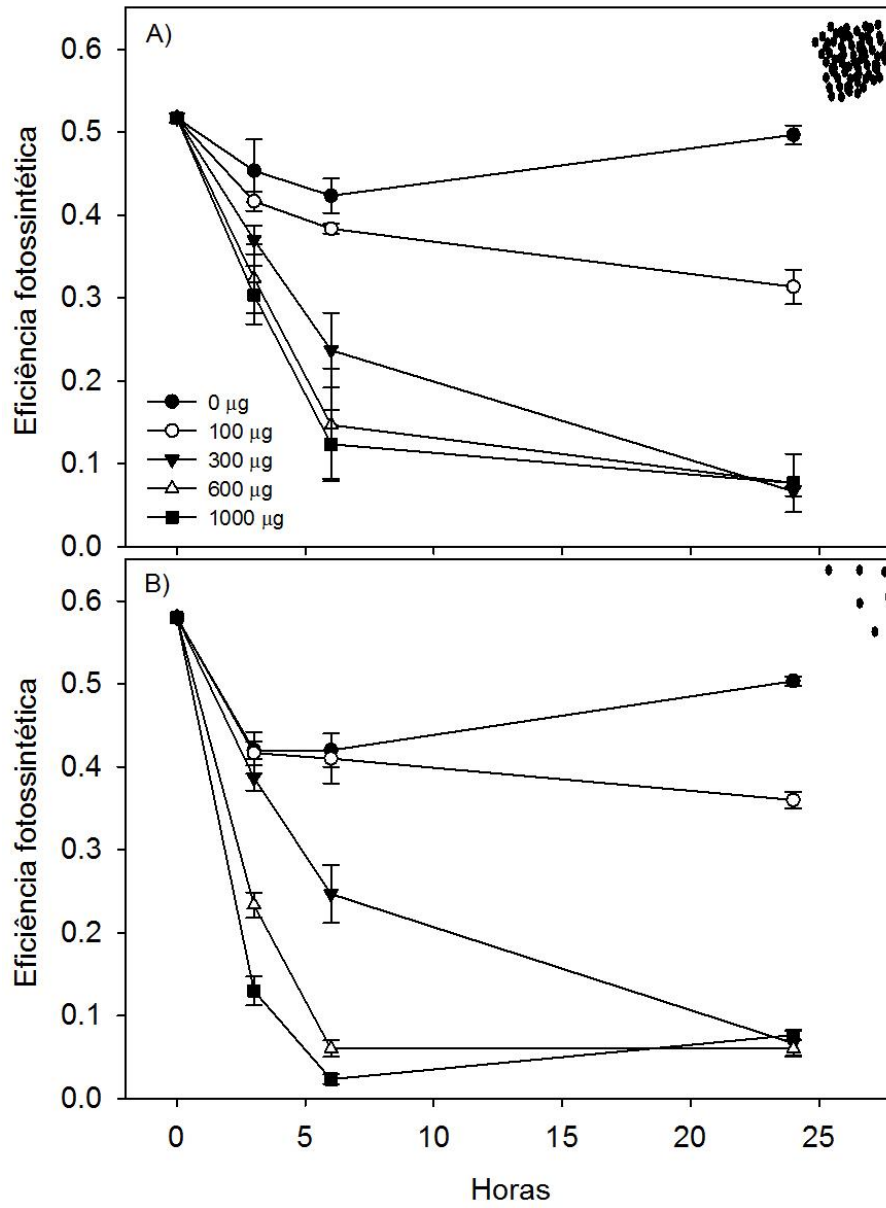


Figura 2: Eficiências fotossintéticas dos morfotipos colonial (A) e unicelular (B) de LEA13 ao longo de 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico enrofloxacina (0, 100, 300, 600 e 1000 µg L⁻¹). As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$)

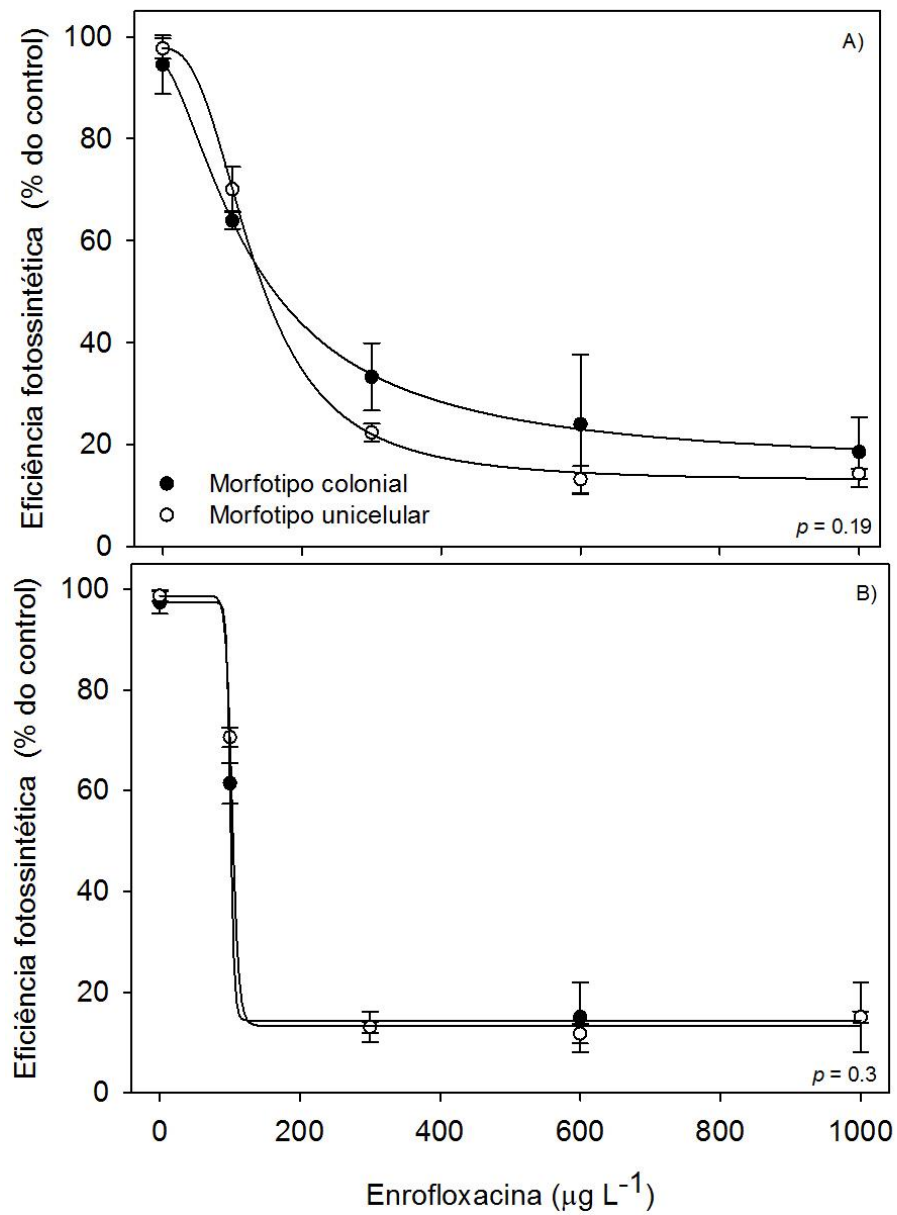


Figura 3: Eficiências fotossintéticas (porcentual relativo aos controles) dos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 (A) e LEA 13 (B) após 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico enrofloxacina (0, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Linhas representam as regressões não-lineares usadas para o cálculo dos EC50s. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

Efeito de Oxytetraciclina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Assim como nos testes feitos com ENRO, todas as concentrações de OXYT testadas resultaram em redução da eficiência fotossintética dos morfotipos colonial e unicelular das duas linhagens de *M. aeruginosa* em ao longo das 24h de exposição (Figuras 4 e 5). Entretanto, diferente do que foi observado para ENRO, após 3h de exposição à OXYT não há uma tendência de colônias sendo menos afetadas do que o morfotipo unicelular e vice-versa. Esse padrão foi observado somente após 6h de exposição ao antibiótico e confirmado com o cálculo do EC50. O EC50 de OXYT foi de 940 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 99%) para o morfotipo unicelular e 980 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 87%) para o morfotipo colonial da linhagem LEA12. Para LEA13, os EC50 foram de 950 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 99%) para o morfotipo unicelular e 970 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CI = 95%) para colônias. A comparação das curvas geradas para calcular o EC50 (Figura 6) apontaram que a dose efetiva para o morfotipo colonial é significativamente maior do que para o morfotipo unicelular ($p = 0.03$ e $p = 0.04$ para LEA12 e LEA13, respectivamente).

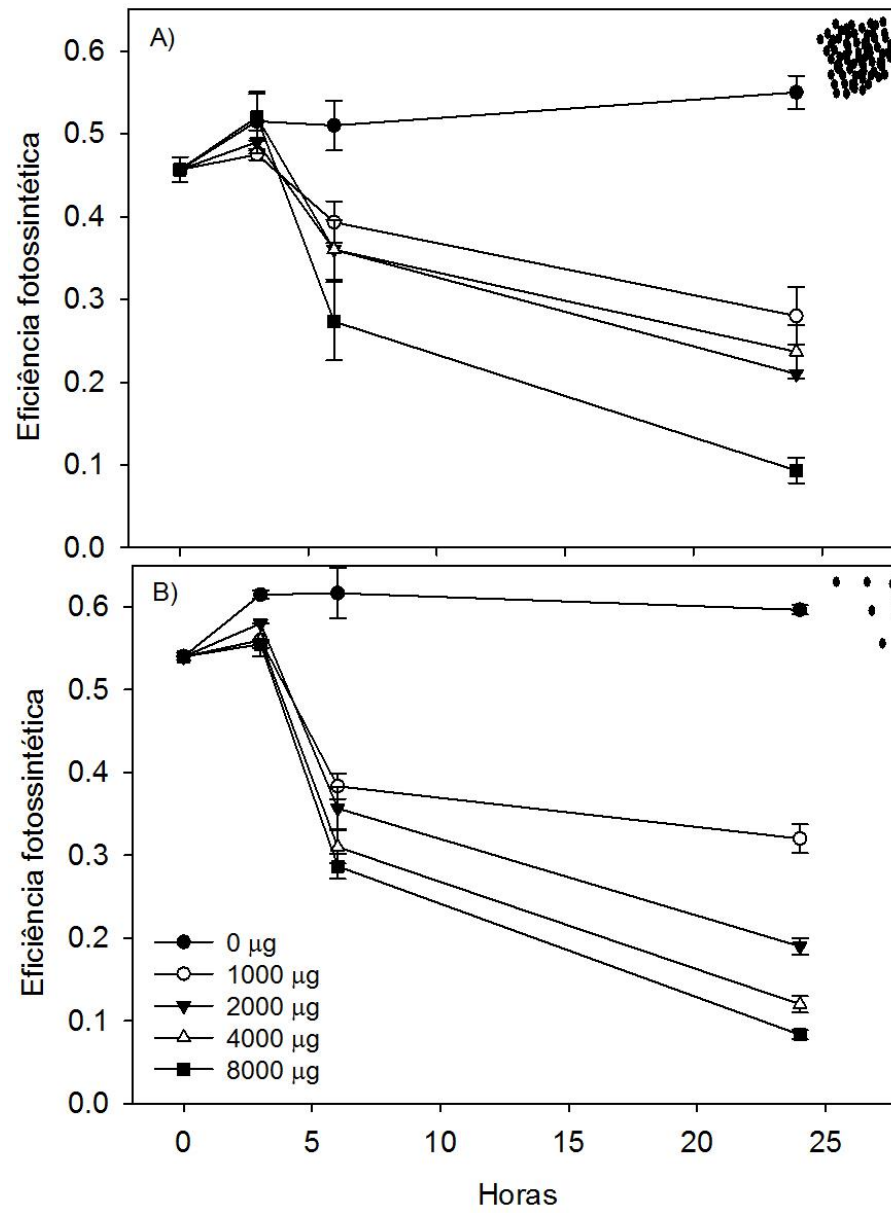


Figura 4: Eficiências fotossintéticas do morfotipo colonial (A) e unicelular (B) de LEA12 ao longo de 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico oxytetraciclina (0, 1000, 2000, 4000 e 8000 µg L⁻¹). As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

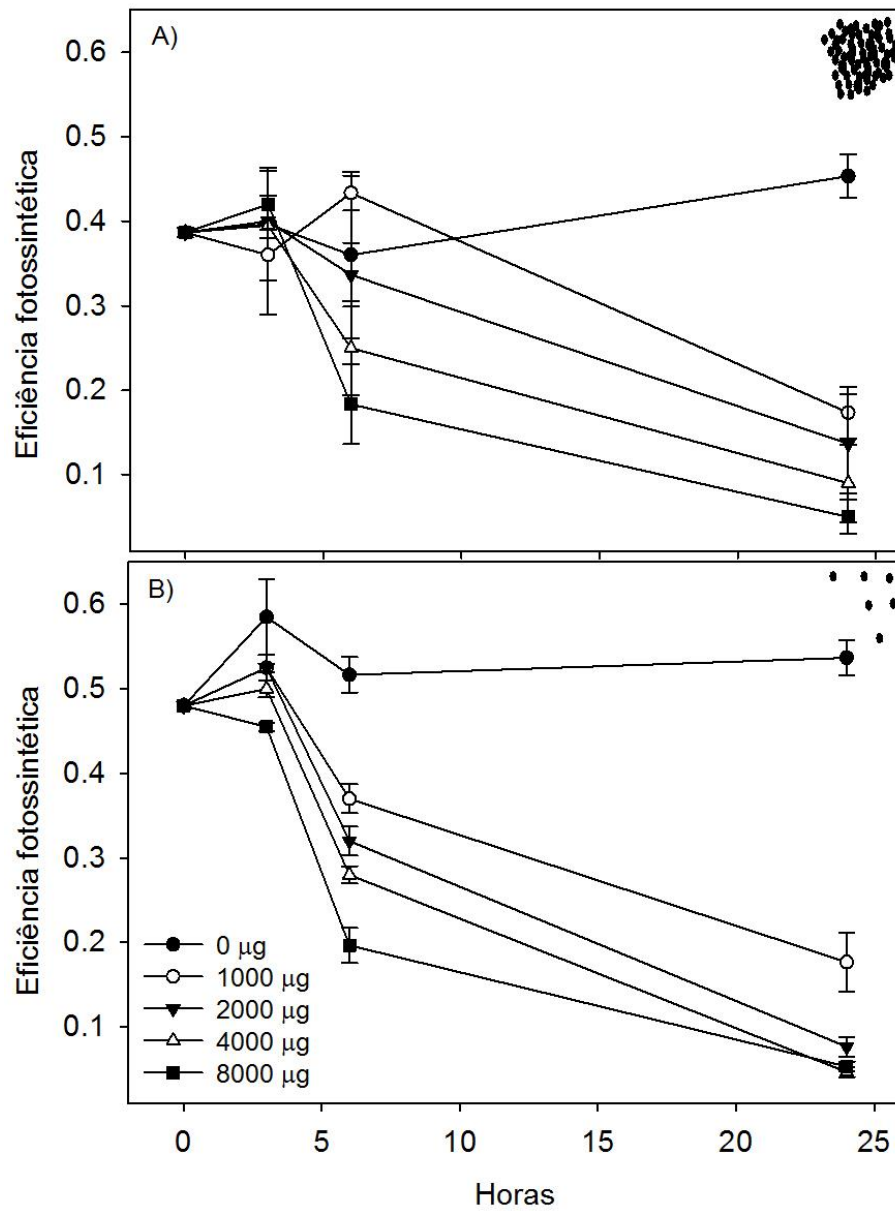


Figura 5: Eficiências fotossintéticas dos morfotipos colonial (A) e unicelular (B) de LEA13 ao longo de 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico oxytetraciclina (0, 1000, 2000, 4000 e 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

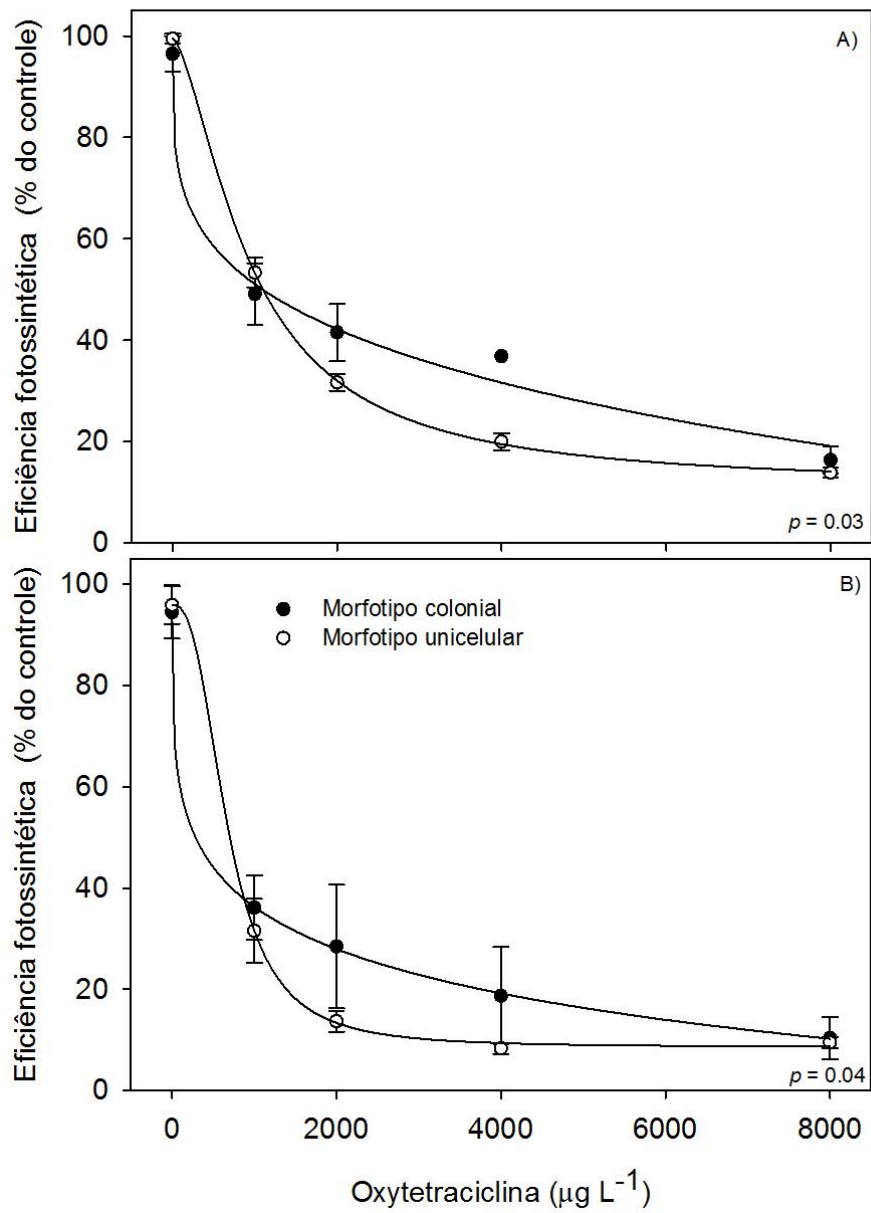


Figura 6: Eficiências fotossintéticas (percentual relativo aos controles) dos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 (A) e LEA 13 (B) após 24h de exposição às cinco concentrações do antibiótico oxytetraciclina (0, 1000, 2000, 4000 e 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Linhas representam as regressões não-lineares que deram origem aos cálculos dos EC50. As barras de erros indicam os desvios padrões ($n = 3$).

Efeito da re-exposição de Oxytetraciclina nos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

A capacidade dos morfotipos unicelular e colonial de desenvolverem resistência ao antibiótico OXYR foi avaliada neste experimento. A eficiência fotossintética de todas as culturas expostas a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ do antibiótico (morfotipos unicelular, colonial, ingênuas e não-ingênuas) foram afetadas quando comparadas com seus respectivos controles (Figura 7). Entretanto, culturas unicelulares não-ingênuas apresentaram menor redução da eficiência fotossintética do que culturas unicelulares ingênuas. As eficiências fotossintéticas de culturas unicelulares não-ingênuas reduziram em média 3 vezes comparadas ao controle, enquanto que culturas unicelulares ingênuas reduziram em média 6 vezes comparadas ao controle. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre respostas de culturas coloniais não-ingênuas e ingênuas ($p = 0.23$).

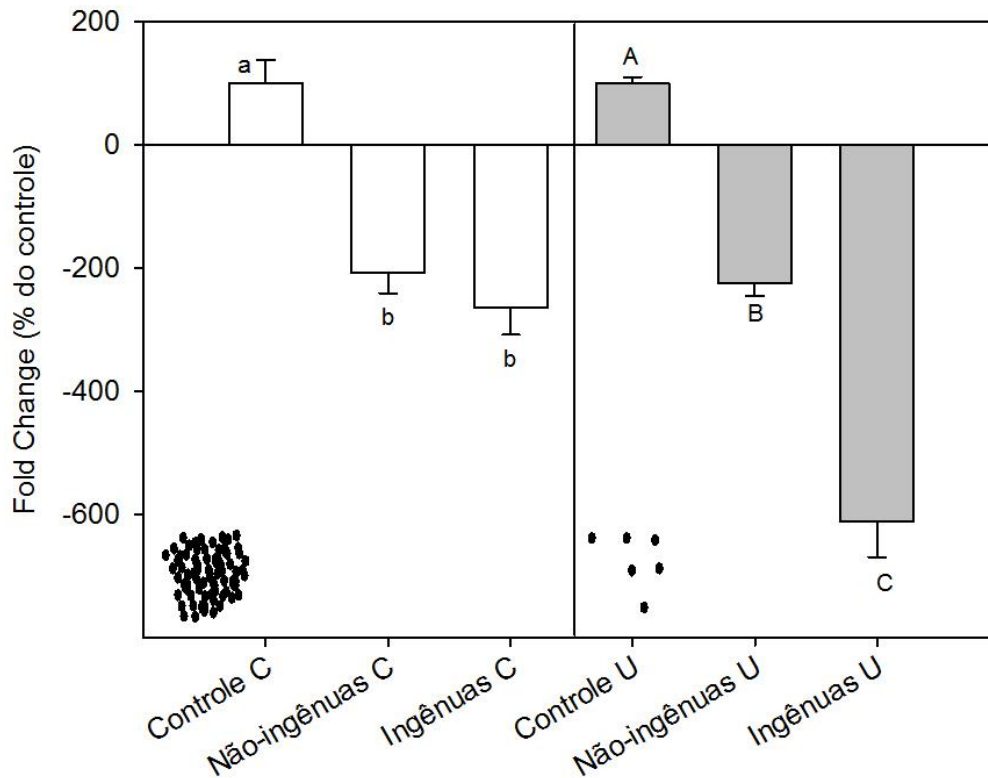


Figura 7: Diferenças entre as eficiências fotossintéticas finais e iniciais (*fold change*) (porcentual relativo aos controles) dos morfotipos colonial e unicelular 24h após a exposição a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de oxytetraciclina, e seus respectivos controles. Culturas não-ingênuas foram previamente expostas a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de oxytetraciclina. As letras minúsculas perto das barras representam o resultado da comparação estatística para o morfotipo colonial, enquanto que as letras maiúsculas representam o resultado da comparação estatística para o morfotipo unicelular. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $n=3$).

4) DISCUSSÃO

O efeito de dois antibióticos de diferentes classes, a Oxytetraciclina e a Enrofloxacin, na eficiência fotossintética de diferentes morfotipos (colonial e unicelular) de duas linhagens de *M. aeruginosa* foi avaliado. Os resultados demonstraram que ambos antibióticos afetaram significativamente ambas linhagens e morfotipos em todas as concentrações testadas. ENRO foi mais tóxico para *M.*

aeruginosa do que OXYT e, apesar de nos tempos iniciais o morfotipo unicelular ter sido mais afetado do que o morfotipo colonial, ao final do experimento as doses efetivas de ENRO foram estatisticamente iguais para ambos os morfotipos. Por outro lado, a dose efetiva de OXYT foi significativamente mais alta para colônias. Além disso, os dados apontaram que culturas unicelulares que tiveram contato prévio com OXYT, consideradas não-ingênuas, tiveram sua eficiência fotossintética menos afetada do que culturas unicelulares ingênuas, que nunca haviam sido expostas a OXYT. O mesmo não foi observado para colônias, em que culturas coloniais não-ingênuas e ingênuas foram igualmente afetadas pela dose efetiva de OXYT.

Devido ao fato de todos os trabalhos encontrados na literatura terem testado o efeito de antibióticos em linhagens unicelulares de *M. aeruginosa*, primeiramente fundamentaremos nossa discussão e comparação com outros trabalhos usando estritamente nossos resultados de culturas unicelulares.

Dentre os trabalhos que avaliaram os efeitos de ENRO em cianobactérias, somente Robinson e colaboradores (2005) testaram o efeito em *M. aeruginosa*. Esse estudo apresentou um EC50 de 49 $\mu\text{g L}^{-1}$ para culturas unicelulares de *M. aeruginosa* após cinco dias de exposição ao antibiótico. O valor de EC50 encontrado por Robinson e colaboradores foi pelo menos duas vezes menor do que o encontrado em nosso estudo. Entretanto, o parâmetro utilizado para o cálculo do EC50 foi a clorofila-a, enquanto que no presente estudo o parâmetro foi a eficiência fotossintética. Ebert e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de ENRO na densidade celular de uma espécie filamentosa de cianobactéria, *Anabaena flos-aquae*, e encontraram um EC50 de 172 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em ambos os estudos as diferenças metodológicas foram o fator determinante da divergência entre os valores de EC50 encontrados.

Com relação aos efeitos de OXYT no morfotipos unicelular de *M. aeruginosa*, dois estudos encontraram valores de EC50s menores (Lützhøft *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2007) ($206 \mu\text{g L}^{-1}$ e $230 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) e um estudo (Van Der Grinten *et al.*, 2010) encontrou um EC50 maior ($5400 \mu\text{g L}^{-1}$) do que os calculados em nosso estudo ($945 \pm 5 \mu\text{g L}^{-1}$). Entretanto, Ando e colaboradores e Lützhøft e colaboradores realizaram o cálculo do EC50 com base na densidade ótica e na densidade celular, respectivamente. Desta forma, como observado para ENRO, as diferenças metodológicas no cálculo dos EC50s para OXYT também foram o fator determinante da diferença entre valores de EC50 relatados na literatura e em nosso estudo. Por outro lado, Van Der Grinten e colaboradores, assim como em nosso estudo, realizaram o cálculo do EC50 com base na eficiência fotossintética, e encontraram um valor aproximadamente cinco vezes maior do que os EC50s encontrados em nosso estudo.

Levando em consideração as diferenças metodológicas para o cálculo do EC50 encontradas na literatura e em nosso estudo, apontamos que parâmetros relacionados ao crescimento (como por exemplo a densidade de células) podem ser mais sensíveis ao efeito dos antibióticos do que a eficiência fotossintética. Essa proposição se deve aos valores mais baixos encontrados quando o cálculo do EC50 foi baseado em parâmetros do crescimento de *M. aeruginosa*. Tanto ENRO quanto OXYT não foram desenvolvidos para afetar especificamente a fotossíntese dos organismos, de forma que a menor sensibilidade do aparato fotossintético quando comparado com outros parâmetros é esperada.

A relação da eficiência fotossintética com a crescimento celular tem sido estabelecida há anos na compreensão de efeitos toxicológicos em organismos fotoautotróficos (Snel *et al.*, 1998; Juneau *et al.*, 2001). A eficiência fotossintética tem

sido usada como indicadora de estresse em organismos aquáticos expostos a poluentes, promovendo uma melhor compreensão dos impactos fisiológicos nas células (Ralph *et al.*, 2007). Enquanto a concentração de clorofila, densidade celular, e densidade ótica indicam o efeito estrutural do antibiótico na biomassa de cianobactérias, a eficiência fotossintética indica o funcionamento do processo metabólico primário, a fotossíntese. Testes em cianobactérias utilizando a eficiência fotossintética como indicativo de toxicidade de poluentes vem sendo realizados pois fornecem os resultados mais rapidamente. A rapidez da resposta da eficiência fotossintética evita a influência da possível variação de outros parâmetros nos resultados, como a fotodegradação dos poluentes por exemplo, permitindo uma extrapolação mais realística do efeito dos poluentes nas células (Schmitt-Jansen e Altenburger, 2007).

Nossos resultados apontaram diferentes EC50s de ENRO para linhagens da mesma espécie (132 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LEA12 unicelular e 103 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LEA13 unicelular), sugerindo que o EC50 seja linhagem-dependente neste caso. É importante salientar que a comparação de um valor tão específico deve ser feita de forma cautelosa e levando-se em consideração a já apontada variedade intra e interespecífica de cianobactérias (Burkholder e Glibert, 2006; Marinho *et al.*, 2013).

Os EC50s apontaram que doses mais baixas de ENRO são necessárias para afetar 50% da eficiência fotossintética de *M. aeruginosa*, tanto para o morfotipo colonial quanto unicelular, quando comparados com OXYT. Em nossos estudos o EC50 de ENRO variou de 101 a 135 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto o EC50 de OXYT variou de 940 a 980 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, conclui-se que ENRO é mais tóxico para os morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa* do que OXYT. A maior toxicidade de ENRO está de acordo com os nossos resultados relacionados à morfologia. Uma vez que ENRO é

mais tóxico, a proteção que colônias podem prover às células contra OXYT não é efetiva contra a ação de ENRO. Algumas possíveis explicações podem ser apontadas para explicar a diferença de toxicidade dos dois antibióticos. O mecanismo de penetração nas células de *M. aeruginosa* deve ser descartado uma vez que ambos atuam de forma semelhante na passagem pela membrana celular. Entretanto, o modo de ação dos antibióticos dentro das células é distinto. Ao final do processo ambos afetarão a síntese proteica, essencial para o funcionamento celular. Contudo, o alvo de ENRO são as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, essenciais para a duplicação e transcrição do DNA, que participam do início do processo de síntese proteica. O OXYT impede a associação do aminoacil-tRNA aos ribossomos bacterianos, processo mais ao final da síntese de proteína. A degradação dos dois antibióticos também é diferente. De forma geral, fluoroquinolonas, classe à qual ENRO pertence, tendem a sofrer menos hidrólises quando comparadas com a antibióticos da classe de tetraciclinas (Kümmerer, 2009). Assim, a degradação de ENRO é mais lenta, permanecendo por mais tempo no meio de cultura e acarretando maior toxicidade às células. Avaliando o risco ecológico da poluição aquática por ENRO e OXYT, Rico e colaboradores (2014) concluíram que em doses ambientalmente relevantes ambos apresentam risco insignificante para produtores primários.

No que tange às diferenças observadas entre os morfotipos colonial e unicelular, ENRO afetou igualmente ambos os morfotipos ao final do experimento, enquanto OXYT afetou as culturas unicelulares significativamente mais do que a culturas coloniais. A maior toxicidade de OXYT no morfotipo unicelular do que no colonial pode ser explicada pelo o fato da mucilagem de colônias de *M. aeruginosa* naturalmente possuir bactérias heterotróficas anexadas (Shen *et al.*, 2011). Desta forma, o efeito do antibiótico pode estar ocorrendo nas bactérias heterotróficas das

mucilagens em detrimento de agirem nas células de *M. aeruginosa*. Sabe-se que bactérias heterotróficas se beneficiam ao viver em mucilagens de *M. aeruginosa* por serem ricas em nutrientes (Jiang *et al.*, 2007) e que estas também podem trazer algumas vantagens para as células de *Microcystis*. Neste estudo, a análise de células vivas em microscopia de luz com aplicação de nanquim, mostrou que ambas as morfologias e linhagens apresentavam mucilagem ao redor das células. Entretanto, a espessura da mucilagem nas colônias foi sempre proporcionalmente maior do que de células soltas (dado não apresentado). Desta forma, a presença de mucilagem mais espessa em colônias pode indicar maior quantidade de bactérias heterotróficas, promovendo maior proteção a colônias contra agentes antibióticos. Em nossos experimentos, as bactérias heterotróficas estavam presentes, porém não foram quantificadas.

Outra explicação possível é a composição da mucilagem que pode limitar fisicamente a difusão dos antibióticos devido a estrutura tridimensional das colônias de *M. aeruginosa*. A mucilagem das colônias também pode acumular compostos capazes de degradar antibióticos, como é relatado para biofilmes (De la Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Em biofilmes bacterianos, a penetração de antibióticos varia consideravelmente de acordo com sua permeabilidade (Singh *et al.*, 2016), que pode estar relacionada ao gênero, à linhagem e ao antibiótico testado.

Os resultados desse estudo apontaram também que culturas unicelulares são capazes de desenvolver mais rapidamente resistência a baixas dosagens de OXYT, enquanto o mesmo não foi observado para colônias. Essa característica pode ser uma resistência para a sobrevivência de células isoladas uma vez que não possuem a proteção das colônias. O desenvolvimento de resistência à tetraciclina está relacionado à diminuição da habilidade deste composto em entrar nas células. Esse

processo envolve mudanças coordenadas de múltiplas proteínas de membrana através da regulação da transcrição e pós-transcrição da expressão gênica (Delcour, 2009). Possivelmente, colônias necessitam de um maior tempo de exposição ao antibiótico para que a resistência possa ser desenvolvida, uma vez que um maior número de maquinário (células) precisa ser ajustado. Todavia, o presente estudo testou o possível desenvolvimento de resistência em somente uma linhagem e com um só tipo de antibiótico. Sendo assim, mais estudos sobre esse tema precisam ser desenvolvidos para que dados mais diversos e coesos possam ser discutidos sobre o papel de colônias no desenvolvimento de resistência a antibióticos.

O uso de antibióticos no controle de florações de cianobactérias já foi sugerido por Shang e colaboradores (2015). O presente estudo teve como objetivo ajudar a definir uma dosagem efetiva e segura ambientalmente para o uso de antibióticos em sistemas aquáticos no que concerne às cianobactérias, sob uma ótica morfológica nunca antes avaliada. Porém, mais do que contribuir para o desenvolvimento de ferramentas no manejo de cianobactérias, a avaliação do efeito de antibióticos é importante para a melhor compreensão da ecofisiologia de cianobactérias e de como sistemas aquáticos podem reagir à poluição por antibióticos. Além disso, nossos resultados sugerem que o rápido desenvolvimento de resistência ao antibiótico deve ser cuidadosamente levado em consideração. Estudos com maior número de linhagens e mais classes de antibióticos são necessários para melhor compreendermos as relações entre os efeitos de antibióticos e os morfotipos de *M. aeruginosa*.

CAPÍTULO 3 - O EFEITO DE COAGULANTES (QUITOSANA E CLORETO DE POLIALUMÍNIO) E LASTROS (BENTONITA MODIFICADA COM LANTÂNIO E SOLO VERMELHO) NA FLOCULAÇÃO E POSICIONAMENTO VERTICAL DE DIFERENTES MORFOLOGIAS DA CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

1) INTRODUÇÃO

O manejo de ambientes eutrofizados (com excesso de nitrogênio e fósforo) ainda é um grande desafio para as autoridades responsáveis por sistemas aquáticos em todo o mundo (Smith e Schindler, 2009; O'neil *et al.*, 2012). Apesar da eutrofização poder ser resultado de um envelhecimento natural dos sistemas aquáticos, as atividades antropogênicas têm aumentado e acelerado o processo (Smith, 2003). O uso indiscriminado de fertilizantes na agricultura e a descarga de efluentes sem tratamento nos sistemas aquáticos são as principais atividades humanas que contribuem para o aumento da eutrofização dos sistemas. Essas entradas de nutrientes podem ter efeitos profundos sobre a qualidade das águas receptoras e um dos efeitos mais comuns é o aumento no crescimento de algas e cianobactérias (Conley *et al.*, 2009; Schindler, 2012).

O primeiro passo para mitigar a eutrofização e as florações de cianobactérias, portanto, é reduzir ao máximo o aporte externo de nutrientes. A forma mais fácil de conter esses problemas ambientais seria evitá-los com medidas de prevenção. Entretanto, há décadas nutrientes têm sido continuamente escoados para os corpos aquáticos. Infelizmente, estancar a crescente carga de nutrientes proveniente das atividades humanas vão contra o atual sistema econômico global (Dodds *et al.*, 2008), e reduzir o uso de fertilizantes ou tratar 100% os esgotos não é prioridade da maioria

dos governos, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Portanto, a diminuição do aporte externo de nutrientes nem sempre é possível ou economicamente viável. Além disso, somente impedir o aporte externo de nutrientes pode demandar anos para a recuperação do sistema aquático, uma vez que o aporte interno de nutrientes muitas vezes pode ser a principal fonte para a eutrofização do sistema (Sondergaard *et al.*, 2001). Assim, é necessário reduzir não só o aporte externo como o aporte interno de nutrientes. Apesar da eutrofização ser o excesso de nitrogênio (N) e fósforo (P) e ambos serem importantes para o desenvolvimento de florações, a limitação de pelo menos um dos dois é o suficiente para manejar as florações de cianobactérias. Uma vez que reduzir P a concentrações limitantes é mais fácil do que reduzir outros nutrientes, o controle do P é considerado a melhor remediação contra a eutrofização (Schindler *et al.*, 2008).

Devido a necessidade de resolver os problemas de qualidade de água no mundo, a manipulação de processos bioquímicos (geo-engenharia) tem sido proposta como uma importante ferramenta (Lürling *et al.*, 2016). Em especial, a utilização de materiais capazes de absorver o P na fase sólida tem ganhado grande interesse (Spears, Bryan M. *et al.*, 2013). Esses materiais não só são capazes de adsorver o P dissolvido na coluna d'água como são capazes de controlar a liberação de P do sedimento e são geralmente naturais ou solos/argilas/areias/ modificados para adsorver P (Douglas *et al.*, 2016). A bentonita modificada com lantânio (Phoslock®) é um produto com essas características que vem sendo comumente utilizado (Haghseresht *et al.*, 2009), bem como solos naturais ricos em ferro, como por exemplo os solos vermelhos e a bauxita (Dai e Pan, 2014).

Durante florações de cianobactérias, o P comumente se encontra no sistema sob diferentes formas e concentrações. A menor parte se encontra em forma de

fosfato dissolvido disponível para a utilização das cianobactérias e a maior parte se encontra na forma particulada, dentro das células. Portanto, para o manejo de sistemas eutrofizados e com florações de cianobactérias é importante não só inativar o fosfato disponível para as cianobactérias quanto inativar o P particulado. Desta forma, para inativar todas as formas de P no sistema, um novo método foi desenvolvido, chamado *Flock & Sink*.

O método consiste na combinação de baixas doses de coagulante afim de promover a inativação do P total da coluna d'água, através da floculação do P particulado e dissolvido (*Flock*), com o lastro que age tanto na sedimentação das células (P particulado) (*Sink*) quanto na inativação do P armazenado nos sedimentos dos sistemas aquáticos (Lürling e Oosterhout, 2013). Assim, este método não só elimina o P dissolvido quanto o particulado da coluna d'água, mas também o aporte interno de P através da fixação permanente do P liberado pelo sedimento. Neste método, é importante a utilização de baixas doses de coagulante pois o objetivo é concentrar as células da coluna d'água na superfície sem causar dano celular (uma vez que é necessário evitar o rompimento da membrana celular afim de impedir a liberação de cianotoxinas) para posteriormente sedimentar as mesmas para o fundo. Além disso, a utilização da menor quantidade possível de coagulante garante a segurança ambiental no sistema aquático. Até o momento, entretanto, poucas aplicações do método foram realizadas em campo (Lürling e Oosterhout, 2013; Waajen *et al.*, 2016b; a).

Recentemente, Noyma e colaboradores (2016) testaram o método de *Flock & Sink* em amostras de cianobactérias provenientes do Reservatório do Funil (RJ) (predominantemente *Microcystis aeruginosa*) e mostraram que as células foram efetivamente floculadas e sedimentadas ao utilizarem uma combinação dos

coagulantes cloreto de polialumínio (PAC) ou quitosana (produzida a partir de casca de camarão) com solo coletado das margens do reservatório do Funil (solo vermelho, com composição predominante de argila de caulinita) ou com bentonita modificada com lantânio (Phoslock®) como lastro. O mesmo método foi testado por de Magalhães e colaboradores (2016), em que populações naturais de cianobactérias coletadas na Lagoa de Jacarepaguá (RJ) (predominantemente *M. aeruginosa* e *Planktothrix agardhii*) foram efetivamente floculadas e sedimentadas após a aplicação de PAC juntamente com solo vermelho do reservatório do Funil como lastro. Neste trabalho, a quitosana não foi efetiva como coagulante, e a concentração ótima efetiva de PAC foi quatro vezes maior do que a indicada por Noyma e colaboradores. A utilização do PAC como coagulante em estudos recentes se deve a sua forte capacidade de floculação, capacidade de diminuir a turbidez da água e habilidade de adsorver o P e matéria orgânica (Delgado *et al.*, 2003; Łopata e Gawrońska, 2008). A quitosana seria uma alternativa biodegradável e menos tóxica do que o PAC, com boas propriedades floculantes quando utilizada com lastro ou em determinados valores de pH (Zou *et al.*, 2006; Renault *et al.*, 2009). Como lastro, a bentonita modificada com lantânio, como já citado, tem sido descrita com forte capacidade de se ligar ao P e sua aplicação nos sistemas aquáticos tem gerado bons resultados (Spears, B. M. *et al.*, 2013; Copetti *et al.*, 2016). A utilização do solo vermelho do Reservatório do Funil seria uma alternativa de lastro local mais barata (Pan *et al.*, 2012) e mais natural do que o Phoslock® ou outras argilas modificadas.

O objetivo do presente estudo foi testar quais as concentrações de coagulantes (quitosana ou PAC) e lastro (solo vermelho do Reservatório do Funil ou bentonita modificada com lantânio) são efetivas na floculação e sedimentação de diferentes morfotipos de linhagens da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* isoladas do

Reservatório do Funil. Até onde se sabe, esse é o primeiro trabalho a comparar o método de *Flock & Sink* para diferentes morfologias. Nossa hipótese é de que o morfotipo colonial não demandará a utilização de coagulantes, ou menores concentrações de coagulantes serão necessárias para floculação do morfotipo colonial, uma vez que as células já estão agregadas. Em contrapartida, esperamos que maiores concentrações de lastro sejam necessárias para sedimentar efetivamente o morfotipo colonial em comparação com o unicelular, uma vez que colônias geralmente possuem maior flutuabilidade positiva em comparação a células isoladas.

2) MATERIAL E MÉTODOS

Organismos

As linhagens da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, LEA12 e LEA13, foram isoladas do Reservatório do Funil (RJ - Brasil) em 2013 pelo Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora. As culturas foram mantidas no *Plankton Laboratory* da Universidade de Wageningen (Holanda) a 25°C, 5 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14:10 horas (claro:escuro), em meio de cultura WC modificado (Lürling e Beekman, 1999). No momento do isolamento ambas linhagens se encontravam em forma colonial. De maneira geral, quando isoladas e cultivadas sob condições controladas em laboratório, as colônias se desfazem e as linhagens passam a existir predominantemente como células isoladas/unicélulas após algumas gerações (Bolch e Blackburn, 1996). A manutenção das culturas sob condições de baixa intensidade luminosa possibilitou um crescimento lento mantendo o morfotipo colonial. Para o crescimento prévio das culturas, as condições foram de 25°C, 55 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas, em meio de cultura WC. Durante o

período de crescimento prévio aos experimentos, culturas compostas pelo morfotipo unicelular foram obtidas através da separação manual e cultivo das células que eventualmente se separaram das colônias. Nesse estudo, as culturas coloniais se encontravam com 80 e 91% do total das células em colônias em LEA12 e LEA13, respectivamente. As culturas unicelulares se encontravam com 100% das células em células isoladas ou bi-células em ambas as linhagens. A manutenção das culturas e todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”).

Experimentos de *Flock & Sink*

Os experimentos descritos a seguir tiveram o mesmo desenho experimental (Figura 01) e foram delineados com o objetivo de testar se diferentes morfotipos (unicelular e colonial) da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* respondem diferentemente à presença de baixas doses de coagulantes e lastro – método de *Flock & Sink*. Para isso, aplicamos potenciais coagulantes (cloreto de polialumínio – PAC; e quitosana) e lastro (bentonita modificada com lantânio – LMB, Phoslock®; e solo vermelho – SV, solo proveniente da margem do Reservatório do Funil) separadamente ou em conjunto em tubos simulando a coluna d’água de um lago contendo diferentes morfologias de *M. aeruginosa*. Para tanto, suspensões de culturas coloniais e unicelulares de cada linhagem de *M. aeruginosa* (LEA12 e LEA13) foram adicionadas separadamente em tubos de vidro de 30 mL (14.5 x 1.5 cm), contendo meio de cultura WC modificado. A clorofila-a (*chl-a*) inicial e final das suspensões, assim como a eficiência fotossintética (Φ PSII, rendimento quântico do transporte de elétrons do fotossistema II), foram determinadas com o auxílio de Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Neste estudo, a eficiência fotossintética foi utilizada como

medida de quão saudável estava a célula. Portanto, se um determinado coagulante ou lastro em determinada concentração reduzir direta ou indiretamente a eficiência fotossintética, o uso do mesmo fica inviabilizado. Nos experimentos suspensões de cianobactérias foram tratadas com os coagulantes e/ou lastros (tratamentos) como descrito nas seções a seguir ou não tratadas (controles). Tratamentos e controles foram realizados em triplicatas. As suspensões nos tubos foram misturadas com bastão de vidro imediatamente após a aplicação dos coagulantes e/ou lastros e foram então deixadas intactas por 24 horas, a 25°C, sob condições controladas em laboratório. Após 24 horas, amostras de 5 mL foram retiradas do topo e do fundo dos tubos para medição de *chl-a* e eficiência fotossintética (Figura 01). O pH foi medido no meio dos tubos com o auxílio de um eletrodo de pH (WTW pH-320). O coagulante PAC ($Al_n(OH)_mCl_{3n-m}$, $\rho \approx 1.37 \text{ kg L}^{-1}$, 8,9% Al, 21,0% Cl) foi obtido da Pan-Americana (Rio de Janeiro, Brasil). O coagulante quitosana foi obtido a partir de cascas de camarão pela Polymar Ciência e Nutrição S/A (Ceará, Brasil). Antes da utilização, a quitosana foi acidificada com solução de ácido clorídrico a 1%. O solo vermelho (SV) foi coletado nas margens do reservatório do Funil e caracterizado quanto ao tamanho da partícula e composição mineralógica, como descrito em Noyma et al. (2016). A bentonita modificada com lantânio (LMB) Phoslock® foi desenvolvida por Australian CSIRO. SV e LMB foram adicionados na forma sólida.

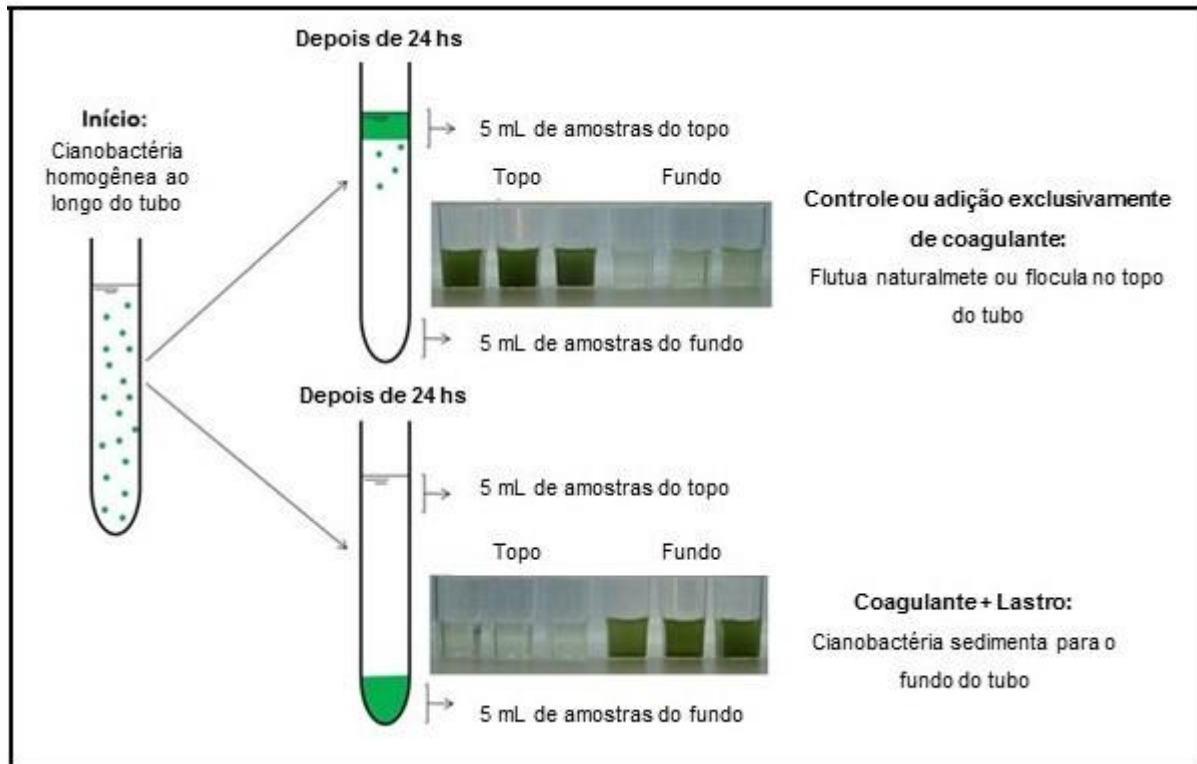


Figura 01: Desenho esquemático dos experimentos padrão de "Flock & Sink" em que cianobactérias com flutuação positiva natural se concentrarão no topo dos tubos de ensaio quando nada for adicionado ou quando for adicionado baixas doses de coagulantes, enquanto cianobactérias sedimentarão para fundo quando coagulante e lastro forem adicionados conjuntamente. A amostragem de 5 mL no topo e no fundo dos tubos é usada para determinar as concentrações de clorofila-a e eficiência fotossintética.

Efeitos do PAC e quitosana na flocação das células dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

No primeiro experimento foram avaliados separadamente os efeitos de quitosana e PAC (cloreto de polialumínio) na coagulação das células (formação visual de flocos) dos morfotipos colonial e unicelular de duas linhagens de *M. aeruginosa* (Figura 02). A concentração inicial de clorofila-a das culturas coloniais e unicelulares foi de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e as células se encontravam em boas condições fisiológicas, como mostrado pela eficiência fotossintética (0.55 ± 0.04 e 0.52 ± 0.01 para culturas unicelulares e coloniais de LEA12, respectivamente; 0.49 ± 0.05 e 0.53 ± 0.01 para culturas unicelulares e coloniais de LEA13, respectivamente). A quitosana foi aplicada

nas doses de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 mg L⁻¹ e o PAC nas doses de 0, 1, 2, 4, 8 e 16 mg Al L⁻¹. As séries de concentrações dos coagulantes (bem como as series de concentrações de lastro nos dois próximos experimentos) foram determinadas a partir de experimentos piloto e da literatura (De Magalhães *et al.*, 2016; Noyma *et al.*, 2016), de forma que as menores concentrações possíveis, porém efetivas, fossem testadas.

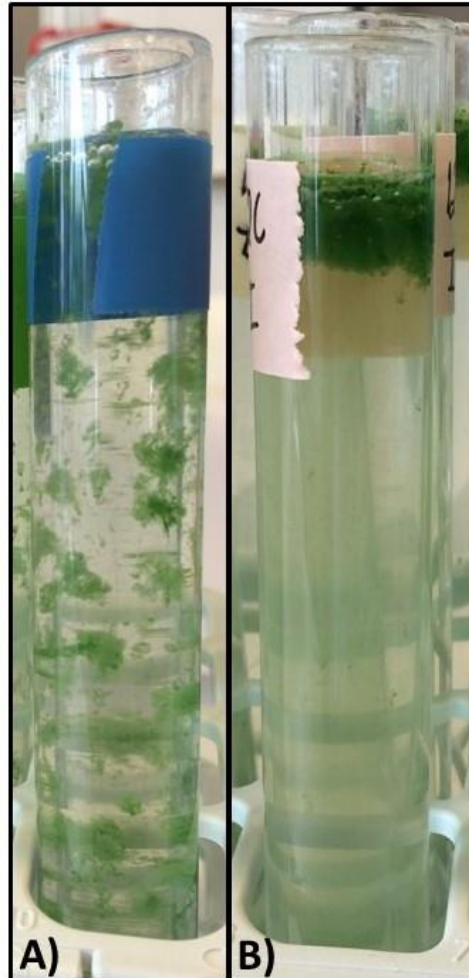


Figura 02: Exemplo da aparência das culturas nos tubos onde ocorreu (A) e onde não ocorreu (B) a floculação de colônias de LEA12.

Efeitos do PAC aplicado juntamente com LMB (Phoslock®) no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

O PAC foi escolhido em detrimento da quitosana para ser testado em conjunto com lastro por ter promovido a floculação das células em concentrações mais baixas do que a quitosana no experimento anterior. Assim, neste segundo experimento, foram avaliados os efeitos da dose fixa de PAC (2 mg Al L⁻¹) juntamente com diferentes concentrações de LMB (Phoslock®) e da aplicação de somente LMB (320 mg L⁻¹) no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e unicelular de *M. aeruginosa*. A dose fixa de 2 mg Al L⁻¹ de PAC foi definida por ter sido a menor concentração capaz de promover a formação de flocos nas linhagens testadas sem alterar o pH e eficiência fotossintética das células tanto do topo quanto do fundo dos tubos. A concentração inicial de clorofila-a das culturas unicelulares e coloniais foi de 250 µg L⁻¹ e as células se encontravam em boas condições fisiológicas, como mostrado pela eficiência fotossintética (0.54 e 0.55 ± 0.01 para culturas unicelulares e coloniais de LEA12, respectivamente; 0.57 ± 0.05 e 0.53 ± 0.05 para culturas unicelulares e coloniais de LEA13, respectivamente). O LMB foi administrado em doses de 0, 40, 160, 320 e 640 mg L⁻¹.

Efeitos do PAC aplicado juntamente com SV (solo vermelho) no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

No terceiro experimento foram avaliados os efeitos da dose fixa de PAC (2 mg Al L⁻¹) juntamente com diferentes concentrações de SV (solo vermelho) e da aplicação de somente SV (320 mg L⁻¹) no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e

unicelular de *M. aeruginosa*. A concentração inicial de clorofila-*a* das culturas coloniais e unicelulares foi de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as células se encontravam em boas condições fisiológicas, como mostrado pela eficiência fotossintética (0.57 ± 0.01 e 0.5 ± 0.05 para culturas unicelulares e coloniais de LEA12, respectivamente; 0.56 ± 0.04 e 0.56 ± 0.01 para culturas unicelulares e coloniais de LEA13, respectivamente). O SV foi administrado em doses de 0, 40, 160, 240, 320 e 640 mg L^{-1} .

Análises estatísticas

O efeito de diferentes concentrações de quitosana, PAC, PAC + LMB e PAC + SV na *cla-a* e eficiência fotossintética dos morfotipos unicelular e colonial de *M. aeruginosa* no topo e no fundo dos tubos foram comparados utilizando os controles como valores de referência através de análise de variância uni-direcional ANOVA. Sub-grupos homogêneos foram definidos através de análise *post hoc* de Tukey, considerando $p < 0.05$. Os testes foram realizados através do pacote de análises SPSS (versão 20, IBM Statistics). A normalidade de todos os dados foi testada através do teste Shapiro-Wilk no mesmo software.

3) RESULTADOS

Efeitos do PAC e quitosana na floculação das células dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Nesse experimento, séries de concentrações de quitosana e PAC foram aplicadas separadamente nos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 e LEA13 afim de testar qual seria a menor concentração efetiva na formação de flocos das células.

Os morfotipos colonial e unicelular das linhagens testadas apresentaram natural flutuabilidade na ausência de quitosana (0 mg L^{-1}) (Figuras 03 e 04). Após 24

horas, a concentração de *chl-a* no topo dos tubos controle foi em média 4.5 e 3 vezes maior do que no fundo para os morfotipos unicelular e colonial de LEA12, respectivamente. Para LEA13, a diferença entre os morfotipos colonial e unicelular foi mais pronunciada, sendo a concentração de *chl-a* no topo dos tubos controle em média 4.5 e 7 vezes maior do que no fundo para os morfotipos unicelular e colonial, respectivamente. Na série de quitosana (2 a 32 mg L⁻¹), após 24 horas, nenhuma concentração promoveu a floculação das células no morfotipo unicelular de ambas as linhagens e no morfotipo colonial de LEA13. No morfotipo colonial de LEA12, a dose mais alta (32 mg L⁻¹) floculou as células diminuindo em 55% a concentração de *chl-a* no topo dos tubos, e não afetou a eficiência fotossintética (Figura 03). Entretanto, a concentração de 32 mg L⁻¹ de quitosana diminuiu significativamente as eficiências fotossintéticas em todos os outros casos (LEA12 unicelular e LEA13 unicelular e colonial).

Os valores de pH variaram entre as linhagens e morfologias. Em todos os casos, o pH não variou significativamente na série de 0 a 8 mg L⁻¹ de quitosana, reduzindo na dosagem mais alta. Apesar da redução do pH em 32 mg, esta não foi suficiente para acidificar o meio e afetar as células, uma vez que o menor valor de pH medido foi 7 (Figuras 03 e 04).

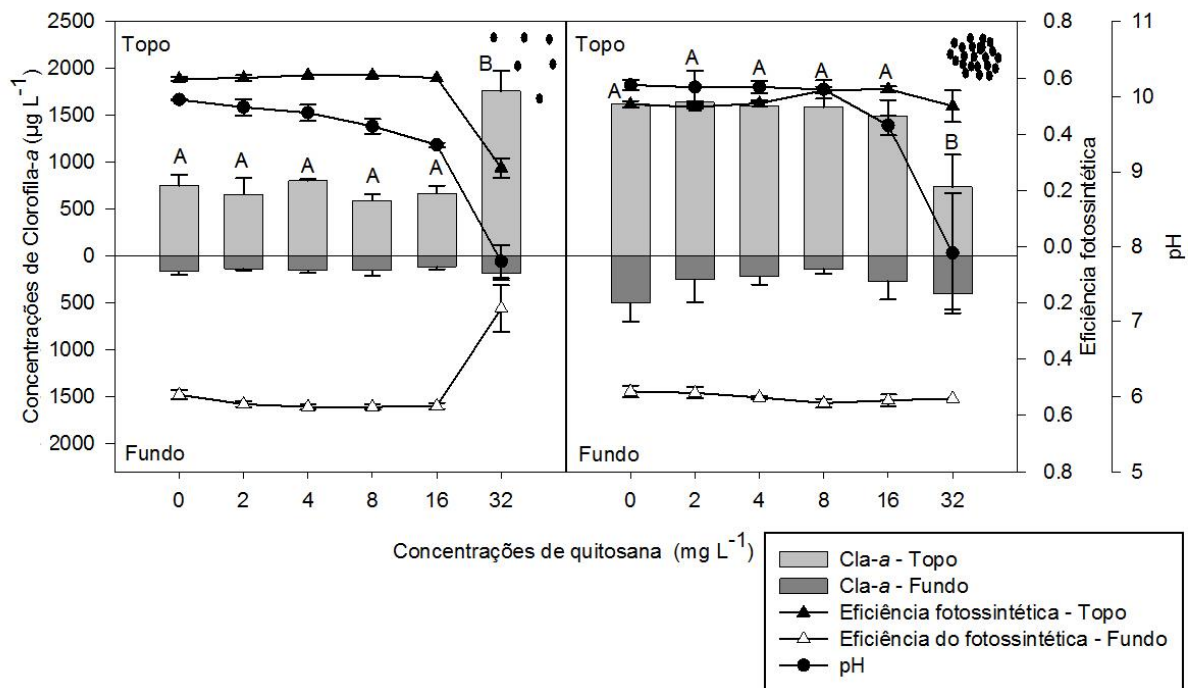


Figura 03: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA12 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante quitosana (0 a 32 mg L^{-1}). Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo. A ausência de letras significa que não houve diferença estatisticamente significativa.

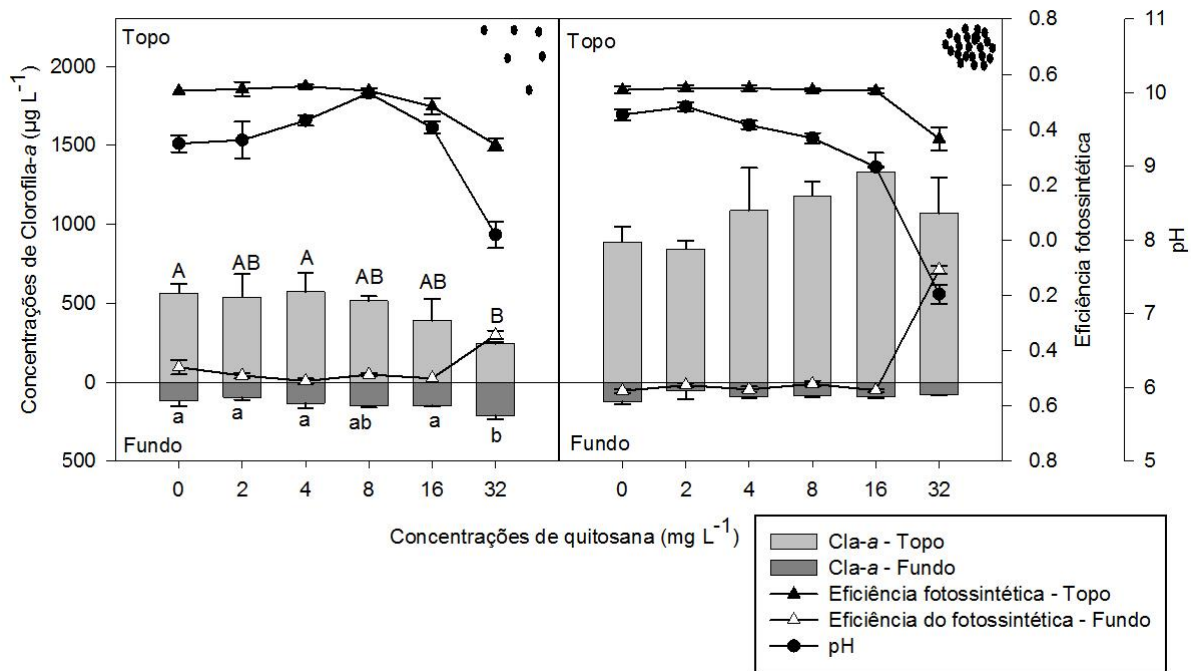


Figura 04: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA13 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante quitosana (0 a 32 mg L^{-1}). Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *chl-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *chl-a* no fundo. A ausência de letras significa que não houve diferença estatisticamente significativa.

No experimento para testar efeito de PAC na formação de flocos das células de culturas coloniais e unicelulares, somente colônias apresentaram alta flutuabilidade na ausência de PAC (0 mg L^{-1}), com maioria das células no topo dos tubos (Figuras 05 e 06). A concentração de *chl-a* do morfotipo unicelular nos tubos sem PAC foi 2 e 1.5 vezes maior no fundo do que na superfície para as linhagens LEA12 e LEA13, respectivamente. Por outro lado, a concentração de *chl-a* do morfotipo colonial dos tubos sem PAC foi em média 11.5 e 12 vezes maior no topo do que no fundo para LEA12 e LEA13, respectivamente. A formação de flocos foi observada em todas as concentrações na série de PAC (1 a 16 mg L^{-1}) em ambos os morfotipos e linhagens.

A concentração de 1 mg de PAC levou à formação de flocos menores comparados visualmente com o tamanho dos flocos nas concentrações de 2 mg em diante. Nas culturas coloniais de ambas as linhagens foi observada variação significativa na concentração de *chl-a* no topo dos tubos somente na dose mais alta de PAC. A variação na concentração de clorofila no morfotipo colonial exposto a 16 mg de PAC se deve provavelmente ao rompimento celular e liberação de *chl-a* para o meio, uma vez que a eficiência fotossintética nessa concentração de PAC caiu praticamente para zero tanto no topo quanto no fundo dos tubos (figuras 05 e 06). A série de 1 a 8 mg L⁻¹ de PAC não afetou a eficiência fotossintética de nenhum dos morfotipos ou linhagens testadas. Entretanto, nos tratamentos com 16 mg de PAC foi observada a diminuição da eficiência fotossintética de ambos os morfotipos de LEA12 e do morfotipo colonial de LEA 13, sem efeito na eficiência fotossintética de LEA13 unicelular. Em ambas as linhagens e morfotipos, os valores de pH mantiveram-se inalterados na série de 0 a 4 mg L⁻¹ de PAC e foi reduzido significativamente na dosagem mais alta em todos os casos, com menor valor de pH medido de 6.

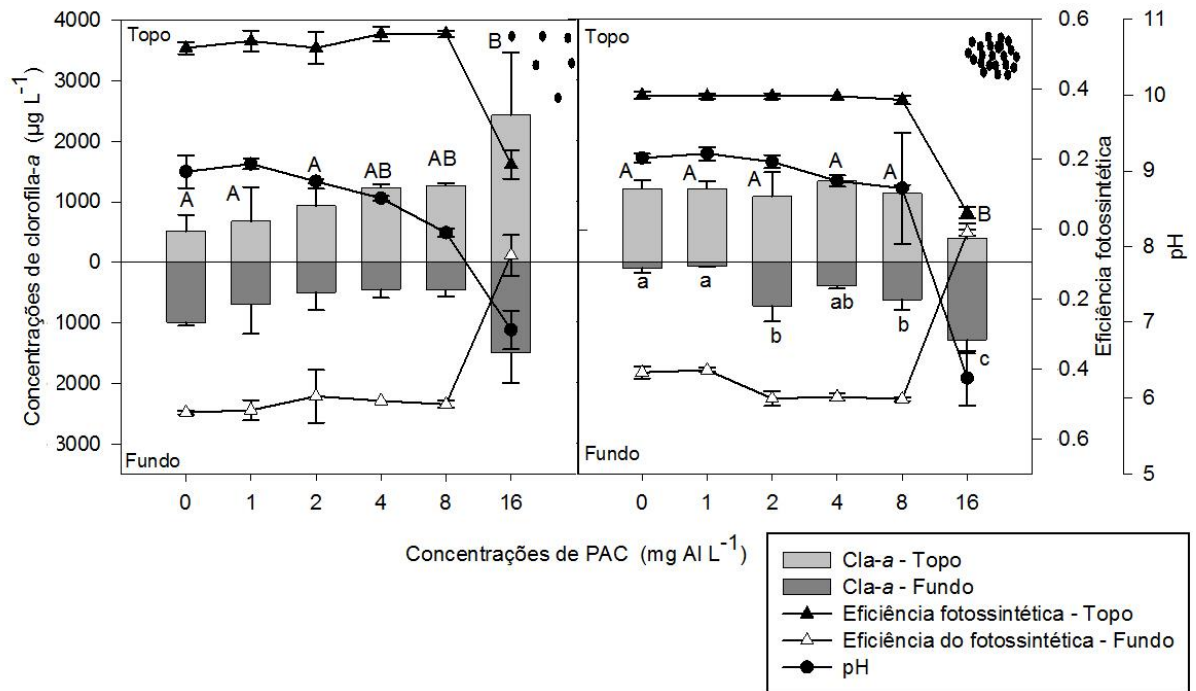


Figura 05: Concentrações de clorofila-*a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA12 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (0 a 16 mg L^{-1}). Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo. A ausência de letras significa que não houve diferença estatisticamente significativa.

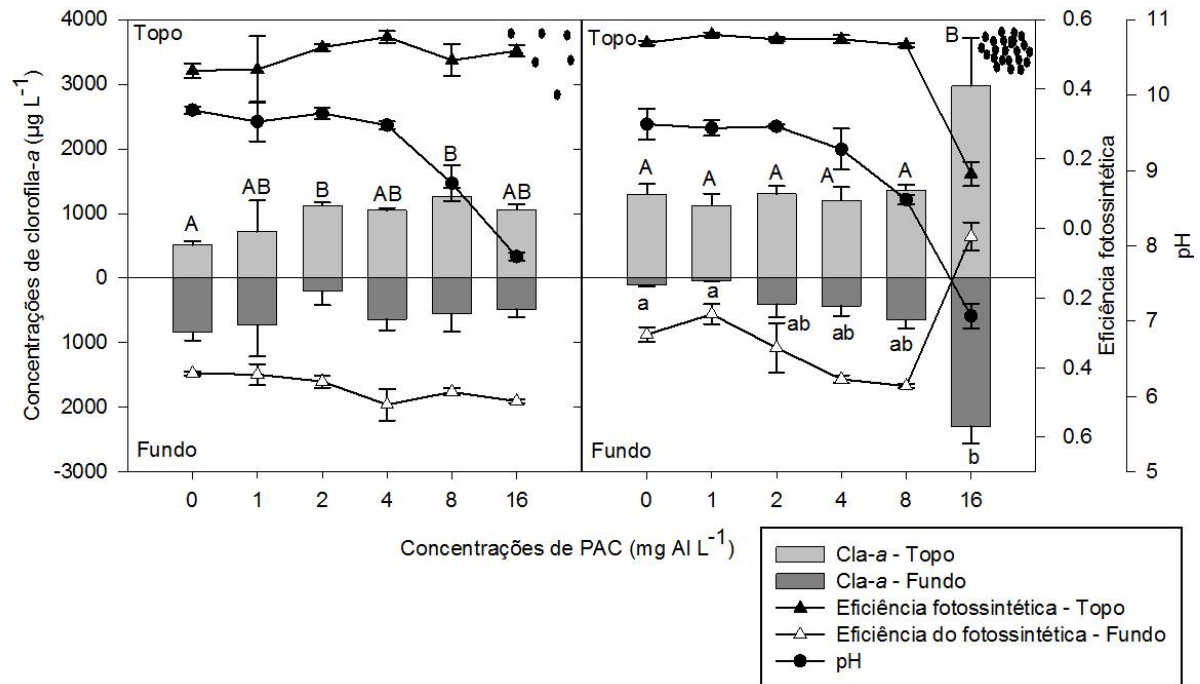


Figura 06: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA13 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (0 a 16 mg L^{-1}). Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo. A ausência de letras significa que não houve diferença estatisticamente significativa.

Efeitos do PAC aplicado juntamente com LMB no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Nesse experimento, a dose fixa de 2 mg L^{-1} de PAC foi aplicada juntamente com diferentes concentrações de LMB (Phoslock®) nos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 e LEA13 afim de testar qual é a menor concentração mais efetiva na sedimentação das células. No momento desse experimento, as culturas coloniais e unicelulares de *M. aeruginosa* apresentavam alta flutuabilidade na ausência de PAC

e LMB (Controle) com predominância de células no topo dos tubos (Figuras 07 e 08). Nos controles, a concentração de *cla-a* no topo dos tubos após 24 horas foi em média 5 e 12 vezes maior do que no fundo para os morfotipos unicelular e colonial de LEA12, respectivamente. Para LEA13, a diferença entre os morfotipos colonial e unicelular foi ainda mais pronunciada, sendo a concentração de *cla-a* no topo dos tubos em média 3 e 37 vezes maior do que no fundo para os morfotipos unicelular e colonial, respectivamente.

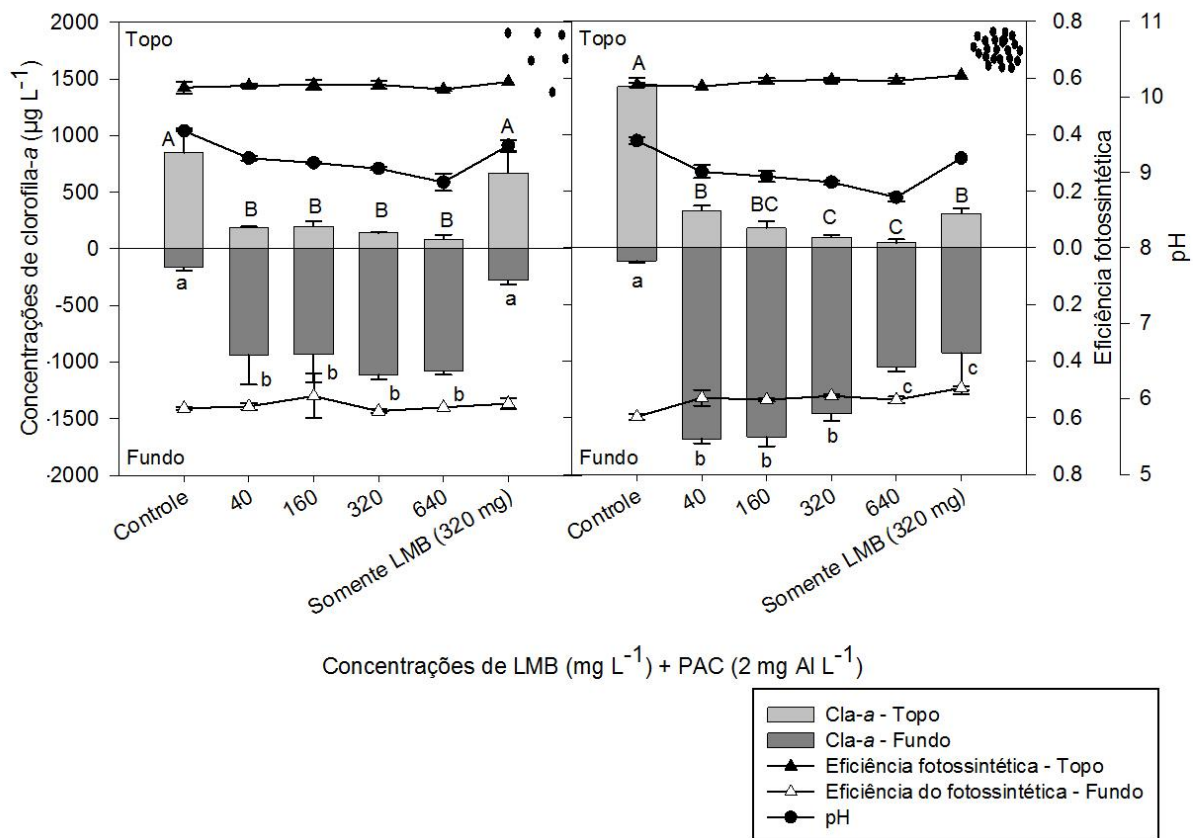


Figura 07: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA12 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (2 mg Al L^{-1}) combinado com diferentes concentrações de LMB (40 a 640 mg L^{-1}) e na presença somente de LMB. Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo.

A aplicação exclusivamente de LMB (320 mg L^{-1}) não afetou o posicionamento vertical do morfotipo unicelular de nenhuma das linhagens. Por outro lado, causou no morfotipo colonial a remoção significativa de 78% e 55% da chl-*a* do topo para o fundo em LEA12 ($F_{5,12} = 300$; $p < 0.001$) e LEA13 ($F_{5,12} = 17$; $p < 0.001$), respectivamente. A mesma dosagem de LMB (320mg) com adição da dose fixa de PAC causou a remoção de 93% e 78% da chl-*a* do topo para o fundo de colônias de LEA12 e LEA13, respectivamente (Figuras 07 e 08).

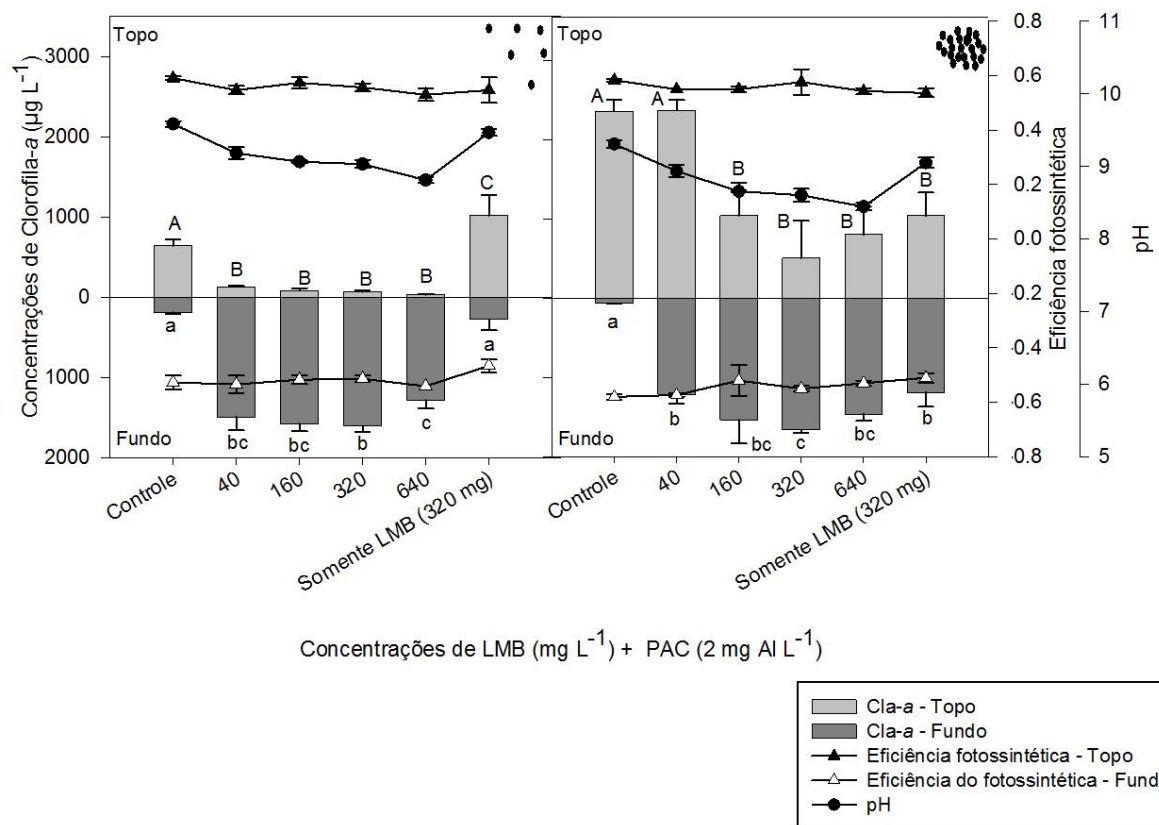


Figura 08: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfotipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA13 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (2 mg Al L^{-1}) combinado com diferentes concentrações de LMB (40 a 640 mg L^{-1}) e na presença somente de LMB. Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo.

A série de LMB (40 a 640 mg L^{-1}) juntamente com 2 mg PAC L^{-1} promoveu alta remoção das células da coluna d'água para o fundo dos tubos, apresentando gradual aumento na eficiência de remoção à medida que as concentrações de LMB foram aumentadas nos dois morfotipos de LEA12 e em LEA13 unicelular. Ao logo da série de LMB + PAC, a eficiência de remoção das células para o fundo variou de 76 - 90% e 77 - 96% em LEA12 unicelular e colonial, respectivamente; e de 80 - 95% em

LEA13 unicelular. Entretanto, a série de LMB + PAC não apresentou efeito dose-dependente nas colônias de LEA13, em que a concentração de 320 mg LMB L⁻¹ removeu 78% das células para o fundo enquanto a concentração de 640 mg removeu 66% das células. A eficiência fotossintética dos morfotipos unicelular e colonial das duas linhagens permaneceu inalterada em todos os tratamentos, variando em torno de 0.54 ± 0.2 no fundo e de 0.53 ± 0.3 no topo dos tubos. Em ambas as linhagens e morfologias, o pH diminuiu gradualmente com o aumento das doses de LMB; variando em torno de 9.4 ± 0.1 nos tratamentos controle até 8.6 ± 0.2 na maior dose de LMB em ambas as linhagens e morfotipos (Figuras 07 e 08).

Efeitos do PAC aplicado juntamente com SV (solo vermelho) no posicionamento vertical dos morfotipos colonial e unicelular de *Microcystis aeruginosa*

Nesse experimento, a dose fixa de 2 mg Al L⁻¹ de PAC foi aplicada juntamente com diferentes concentrações de solo vermelho (solo proveniente do reservatório do Funil) nos morfotipos colonial e unicelular de LEA12 e LEA13 afim de testar qual o tratamento com menor concentração é mais efetivo na sedimentação das células. No momento desse experimento, as culturas coloniais e unicelulares de *M. aeruginosa* apresentavam alta flutuabilidade na ausência de PAC e SV (Controles) (Figuras 09 e 10). Nos tratamentos controle, a concentração de *chl-a* no topo dos tubos após 24 horas foi em média 7 e 3 vezes maior do que no fundo em LEA12 unicelular e colonial, respectivamente. Para LEA13, a diferença entre os morfotipos foi mais pronunciada, sendo a concentração de *clorofila-a* no topo dos tubos em média 5 e 39 vezes maior do que no fundo para as culturas unicelulares e coloniais, respectivamente (Figuras 09 e 10).

A aplicação exclusivamente de SV (320 mg L⁻¹) não afetou o posicionamento vertical do morfotipo unicelular de ambas as linhagens. Para o morfotipo colonial, entretanto, a aplicação exclusivamente de SV levou a uma redução significativa da *chl-a* no topo de 86% e 58% com relação ao tratamento controle em LEA12 ($F_{6,14} = 7.4$; $p = 0.001$) e LEA13 ($F_{6,14} = 14$; $p < 0.001$), respectivamente. A mesma dosagem de SV (320 mg) com adição da dosagem fixa de PAC causou a remoção de 93% e 69% da *chl-a* do topo para o fundo de colônias de LEA12 e LEA13, respectivamente (Figuras 09 e 10).

Em geral, a série de SV (40 a 640 mg L⁻¹) juntamente com 2 mg PAC L⁻¹ promoveu efetivamente a remoção das células da coluna d'água para o fundo dos tubos. Entretanto, diferente do efeito do LMB no posicionamento vertical células, o SV não apresentou eficiência de remoção proporcional à dose aplicada (Figuras 09 e 10). Para LEA12, a dose de SV com maior eficiência de remoção das células dos morfotipos unicelular e colonial foi 160 mg, reduzindo a *chl-a* do topo em 62% e 98%, respectivamente. O mesmo foi observado para LEA13 unicelular, em que 160 mg de SV + PAC reduziram em 97% a *chl-a* do topo dos tubos. Entretanto, para LEA 13 colonial, 160 mg não foi a dose com maior eficiência de remoção das células para o fundo (78% em relação ao controle) e sim a concentração de 640 mg, com remoção de 94% das colônias.

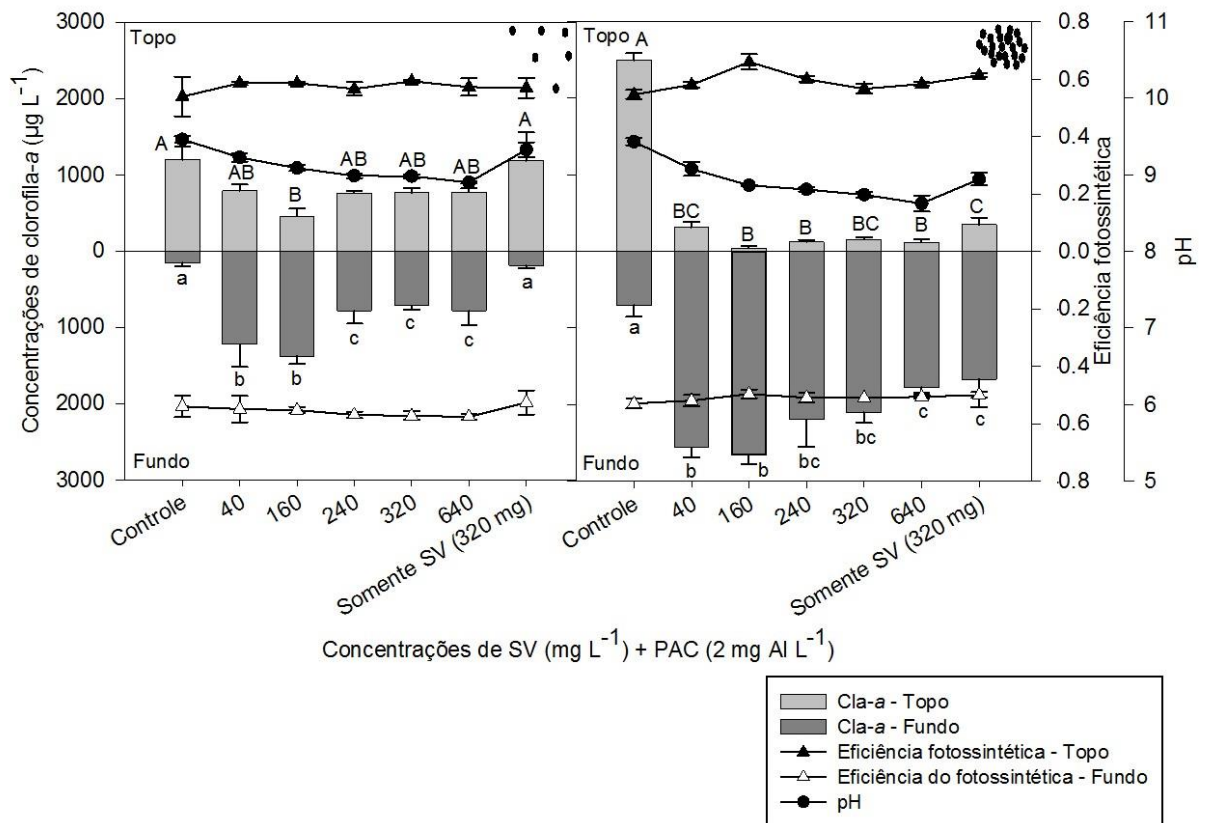


Figura 09: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfortipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA12 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (2 mg Al L^{-1}) combinado com diferentes concentrações de SV (40 a 640 mg L^{-1}) e na presença somente de SV. Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo.

Assim como no teste com LMB, a eficiência fotossintética das culturas coloniais e unicelulares de ambas linhagens permaneceu praticamente inalterada em todos os tratamentos, variando em torno de 0.53 ± 0.3 no fundo e de 0.56 ± 0.1 na superfície dos tubos. O pH diminuiu gradualmente com o aumento das doses de SV na série 40 a 640 mg L^{-1} ; variando em torno de 9.1 ± 0.3 nos tratamentos controle e de 8.6 ± 0.3 na maior dose de SV (Figuras 09 e 10).

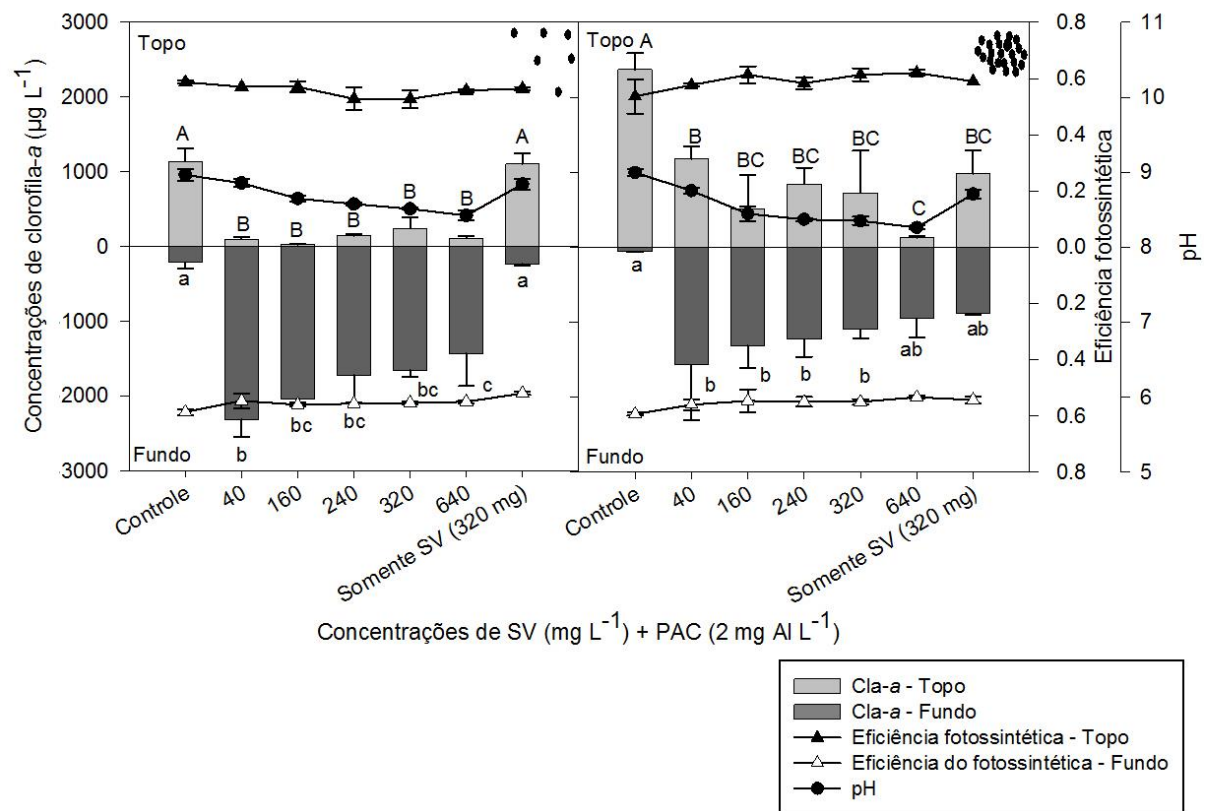


Figura 10: Concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 5 mL do topo (barras cinza claro) e nos 5 mL do fundo dos tubos (barras cinza escuro) do morfortipo unicelular (gráfico à esquerda) e colonial (gráfico à direita) de LEA13 encubadas por 24h na ausência ou presença no coagulante PAC (2 mg Al L^{-1}) combinado com diferentes concentrações de SV (40 a 640 mg L^{-1}) e na presença somente de SV. Nesse gráfico também estão representadas as eficiências fotossintéticas das células coletadas no topo (triângulos cheios) e no fundo (triângulos vazios), bem como os valores de pH nos tubos. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no topo dos tubos; as letras minúsculas sob as barras representam o resultado da comparação estatística das concentrações de *cla-a* no fundo.

4) DISCUSSÃO

Diferente do que era esperado, baixas concentrações de quitosana não promoveram a floculação de nenhum dos dois morfortipos, enquanto que 2 mg Al L^{-1} de PAC flocularam as culturas unicelulares e coloniais. A combinação de PAC + LMB e PAC + SV sedimentaram efetivamente o morfortipo unicelular, enquanto que a

aplicação somente de LMB ou SV foram efetivas para sedimentar o morfotipo colonial, eliminando a necessidade da aplicação de coagulante nesse caso.

O objetivo da formação de flocos no método de *Flock & Sink* é concentrar as células da coluna d'água na superfície sem causar dano celular para posteriormente sedimentar as mesmas para o fundo (Lürling e Oosterhout, 2013). A ineficiência na formação de flocos pela quitosana nesse estudo parece estar relacionada aos valores pH (variação em geral de 7 a 10), uma vez que valores de pH mais altos afetam os mecanismos de formação de flocos (neutralização da carga e formação de pontes) (Divakaran e Sivasankara Pillai, 2002). Considerando que durante florações de cianobactéria comumente se encontra valores de pH elevados, o uso da quitosana deve ser avaliado cuidadosamente. Entretanto, o pH das culturas no único caso em que foi observada a formação de flocos (LEA12 colonial em 32 mg quitosana L⁻¹) foi de 8, apontando que a influência na floculação neste caso não foi unicamente do pH. A formação de flocos pode variar com o tamanho das células, com a composição bioquímica da superfície celular, com a quantidade de matéria orgânica excretada pelas células, dentre outros fatores (Vandamme *et al.*, 2013). Esses fatores podem variar entre espécies e entre linhagens da mesma espécie. Contudo, uma avaliação mais detalhada sobre as características das linhagens que podem influenciar o efeito da quitosana não foi realizada neste estudo. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por De Magalhães e colaboradores (2016), em que a série de 1 a 32 mg L⁻¹ de quitosana também não promoveu a formação de flocos de populações naturais com predominância de *M. aeruginosa*. Os autores relacionaram a ineficiência da quitosana ao elevado pH e à alta força iônica da água da laguna testada, desaconselhando o uso da quitosana em sistemas com essas características. Por outro lado, diversos estudos apontaram a eficiência de baixas concentrações de

quitosana na remoção de células de cianobactéria (Li e Pan, 2015; Noyma *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). A diferença nos resultados encontrados na literatura e entre as linhagens testadas neste estudo aponta para a necessidade de um estudo detalhado da comunidade de cianobactérias antes da tomada de medidas para mitigação de florações de cianobactéria utilizando a quitosana.

A dosagem mais alta de quitosana (32 mg L⁻¹) levou à redução significativa na eficiência fotossintética de LEA12 unicelular e LEA13 unicelular e colonial. A redução na eficiência fotossintética é possivelmente devido à propriedade antibacteriana da quitosana (Kong *et al.*, 2010). Neste caso, a redução na eficiência fotossintética não é desejável pois pode acarretar em dano celular, com possível liberação de cianotoxinas para o meio. Uma vez que é necessário realizar o manejo de florações de forma segura, sem afetar outros organismos e sem promover o rompimento celular, fica inviabilizando o uso de quitosana em altas concentrações para o manejo de cianobactérias.

Diferente do que foi observado para a quitosana, a aplicação de somente PAC em baixas concentrações promoveu a formação de flocos efetiva das células em ambas morfologias e linhagens. O PAC é um potente coagulante com habilidade de adsorver fosfato dissolvido e vem sendo comumente utilizado em tratamentos de água e manejo de cianobactérias (Delgado *et al.*, 2003; Łopata e Gawrońska, 2008; Jancula e Marsalek, 2011). Devido à potencial toxicidade a outros componentes da biota aquática (Jančula *et al.*, 2011; Oosterhout e Lurling, 2011), a utilização de coagulantes a base de metais, como o PAC, no manejo de sistemas aquáticos enfrenta algumas críticas. Por esse motivo, o uso de coagulantes não-tóxicos e biodegradáveis, como a quitosana, é estimulado. Infelizmente, a utilização da quitosana pode não ser efetiva em alguns casos, como demonstrado neste estudo e relatado na literatura (De

Magalhães *et al.*, 2016), ou demandar altos custos financeiros na aplicação (Yang *et al.*, 2016). Desta forma, a utilização do PAC se torna uma alternativa. O alumínio, componente tóxico do PAC, só se torna biodisponível em sistemas aquáticos ácidos. Portanto, a utilização do PAC em sistemas com pH neutro e boa capacidade de tamponamento é relativamente segura (Jancula e Marsalek, 2011).

A dose efetiva de PAC encontrada nesse estudo para ambas as linhagens e morfologias (2 mg AL L⁻¹) está de acordo com a dose apontada na literatura (Lüring e Oosterhout, 2013; De Magalhães *et al.*, 2016; Noyma *et al.*, 2016). Entretanto, diferente dos nossos resultados, Noyma e colaboradores (2016) observaram redução da eficiência fotossintética das células ao serem expostas à concentração de 8 mg Al L⁻¹ de PAC. Em nossos estudos, a concentração de 8 mg Al L⁻¹ não afetou a eficiência fotossintética das células em nenhum caso. Observou-se diminuição significativa nas eficiências fotossintéticas somente na concentração de 16 mg Al L⁻¹, juntamente com a queda nos valores de pH, em LEA12 colonial e unicelular e LEA13 colonial. Porém, em LEA13 unicelular, a eficiência fotossintética não foi afetada por nenhuma concentração de PAC. Os diferentes valores de pH podem explicar a diferença nos resultados entre as nossas linhagens e morfologias e entre os resultados encontrados por Noyma e colaboradores. Os tratamentos com 16 mg Al L⁻¹ em culturas em que não foi observada diminuição da eficiência fotossintética apresentaram valores de pH mais altos (variação em média de 7.8 a 8), enquanto que as culturas que tiveram a eficiência fotossintética afetada por 16 mg Al L⁻¹ apresentaram valores de pH mais baixos (variação em média de 6 a 7.2). Noyma e colaboradores também registraram redução na eficiência fotossintética e baixos valores de pH (aproximadamente 4.5) nas culturas tratadas com 16 mg Al L⁻¹.

Apesar da adição exclusivamente de PAC ter promovido a formação de flocos em ambos os morfotipos e linhagens, baixas concentrações não alteraram significativamente a concentração de células no topo ou no fundo dos tubos, indicando a necessidade da utilização de lastro em conjunto com PAC afim de promover a sedimentação efetiva das células. Uma vez que 2 mg Al L^{-1} foi a menor concentração de PAC em que foi possível observar a formação de flocos das células sem afetar a eficiência fotossintética e nem os valores de pH, determinou-se essa concentração fixa para a aplicação de PAC + LMB e PAC + SV.

A sedimentação do morfotipo unicelular foi significativamente aumentada quando adicionado LMB ou SV juntamente com a dose fixa de PAC, como proposto por Lüring e Oosterhout (2013). Entretanto, nossos resultados mostraram que adição de PAC não causou aumento significativo na sedimentação das colônias, apontando que nestes casos a aplicação de somente LMB ou SV foi efetiva para a sedimentação do morfotipo colonial. A viscosidade característica de colônias de *M. aeruginosa* foi apontada como uma das causas para a fixação efetiva de colônias a partículas de argilas utilizadas como lastro (como o LMB ou o SV) (Verspagen *et al.*, 2006). A análise de células vivas em microscopia de luz com aplicação de nanquim revelou que ambas as morfologias e linhagens apresentavam mucilagem ao redor das células. Entretanto, a espessura da mucilagem nas colônias foi sempre proporcionalmente maior do que de células soltas (dado não apresentado). Desta forma, a presença de mucilagem mais espessa em colônias pode explicar a efetividade de sedimentação nos tratamentos com somente LMB ou SV.

Magalhães e colaboradores (2016) registraram uma parcial sedimentação das células (33% e 47%) quando aplicaram exclusivamente 320 mg L^{-1} de SV em amostras de campo contendo predominantemente *M. aeruginosa* colonial, entretanto esta

sedimentação não foi considerada significativa. Em nossos estudos, a sedimentação causada pela aplicação exclusivamente de 320 mg L⁻¹ de SV no morfotipo colonial foi de 86% e 59% para LEA12 e LEA13, respectivamente. A dose ótima de SV + PAC para LEA13 colonial, entretanto, foi de 640 mg L⁻¹ de SV. Assim, espera-se que a aplicação de uma maior concentração exclusivamente de SV possa acarretar em uma porcentagem de sedimentação mais efetiva, como ocorreu para LEA12 colonial, como possivelmente ocorreria no estudo de Magalhães, e como foi observado por Pan e colaboradores (2006). No estudo de Pan, 200 mg L⁻¹ da argila caulinita, principal componente do SV, removeu 43% da população de *M. aeruginosa*, enquanto que 700 mg L⁻¹ removeu 88%.

Colônias de LEA13 apresentaram maior resistência de sedimentação do que LEA12, tanto no tratamento com LMB quanto com SV, aplicados sozinhos ou em conjunto do PAC. Dentre as características avaliadas das linhagens, sabe-se que possuem em média o mesmo diâmetro celular, mucilagem com a mesma espessura, e que o número médio de células por colônia em LEA13 é praticamente o dobro do que em LEA12. Nenhuma dessas características explicaria a maior resistência de LEA13 à sedimentação, uma vez que ao possuir proporcionalmente a mesma quantidade de mucilagem, partículas maiores tendem a sedimentar mais rápido do que partículas menores (Reynolds, 2007). No entanto, uma avaliação quantitativa dos aerópos (especialização celular que auxilia a flutuação) não foi realizada neste estudo, e pode estar relacionada à maior capacidade de flutuação de LEA13.

Em geral, LMB e SV apresentaram a mesma performance na sedimentação efetiva das células. Para o método de *Flock & Sink* é desejável que ambos, além de atuar na sedimentação das células de cianobactéria (P particulado), também auxiliem na adsorção do P dissolvido na água. O LMB é um produto conhecido por sua alta

capacidade de adsorver o P dissolvido (Haghseresht *et al.*, 2009) sob condições anóxicas e em uma grande variabilidade de pH (Ross *et al.*, 2008). O SV também foi descrito como capaz de adsorver P, entretanto com capacidade expressivamente menor do que o LMB, e tem sua capacidade de adsorção reduzida sob condições de anoxia (Noyma *et al.* 2016). Apesar do LMB ser considerado mais eficiente na remoção do P, a aplicação desde pode não ser viável economicamente em muitos dos casos. O LMB é considerado um produto relativamente caro (R\$ 8.200,00 por tonelada). Para se ter uma mínima perspectiva de custo, foram necessárias 40 toneladas para manejar com sucesso um lago pequeno e raso da Holanda (6.7 hectares e média de profundidade de 4 metros) (Waajen *et al.*, 2016b). Além disso, compostos naturais, de origem local, com capacidade de lastro e de adsorção de P, como o SV do reservatório do Funil, podem ser uma alternativa mais segura para auxiliar no manejo de sistemas aquáticos, como proposto por Spears e colaboradores (2013).

Em nosso estudo, a menor dose efetiva de LMB aplicado com a dose fixa (2 mg L⁻¹) de PAC para sedimentar os morfotipos colonial e unicelular foi de 40 mg L⁻¹, na maioria dos casos, com exceção de LEA13 colonial em que a menor dose efetiva foi de 160 mg L⁻¹. Essas doses foram relativamente mais baixas do que as encontradas na literatura quando LMB também foi aplicado com 2 mg Al L⁻¹ de PAC (320 a 390 mg L⁻¹ de LMB) (Lürling e Oosterhout, 2013; Noyma *et al.*, 2016). A concentração inicial de *cla-a* em nossos experimentos (250 µg L⁻¹), no entanto, também foi inferior às concentrações nos tratamentos de Lürling e Oosterhout (800 µg L⁻¹ *cla-a*) e Noyma e colaboradores (500 µg L⁻¹ *cla-a*), e pode explicar a diferença na dosagem efetiva de LMB. Com relação à aplicação de SV + PAC, a menor dose efetiva de SV para a sedimentação dos morfotipos colonial e unicelular variou de 40 a 160

mg L⁻¹, enquanto que Noyma e colaboradores registraram sedimentação efetiva de SV + PAC somente nas concentrações de 160 mg L⁻¹ em diante. Novamente, a diferença na concentração inicial de *cla-a* nos nossos tratamentos e nos experimentos de Noyma e colaboradores pode explicar os diferentes valores ótimos na dosagem de SV.

Por fim, é importante salientar que os valores de pH e das eficiências fotossintéticas em nosso estudo permaneceram praticamente inalterados nas séries de LMB + PAC e SV + PAC, bem como na aplicação do lastro exclusivamente, garantindo a integridade celular e evitando a liberação de cianotoxinas na coluna d'água, como é proposto pelo método de *Flock & Sink*.

Em conclusão, nossos resultados apontam que a concentração efetiva de lastro necessária para cada caso de manejo de populações de cianobactérias vai depender da morfologia predominante e da capacidade de flutuação da população a ser manejada. Considerando a variação entre os morfotipos colonial e unicelular observada neste estudo, é esperado que outras morfologias, como cianobactérias filamentosas por exemplo, também apresentem diferentes respostas. Desta forma, enfatizamos que é necessário testar todas as possibilidades (aplicação de lastro com ou sem coagulantes) nas comunidades de cianobactéria de cada sistema aquático em experimentações de menor escala antes da aplicação do método de *Flock & Sink* diretamente nos lagos, represas, etc. Apesar do método ter sido implementado com sucesso em alguns casos (Oosterhout e Lurling, 2011; Waajen *et al.*, 2016b), a repetição dos procedimentos em um novo sistema aquático que não tenha passado por uma análise sistêmica antes pode facilmente resultar no fracasso do método.

CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusão geral da tese, apontamos que os morfotipos de *M. aeruginosa* influenciam significativamente o efeito de substâncias químicas de diversas naturezas utilizadas com o objetivo de controlar o crescimento de cianobactérias. A seguir, um sumário das principais ideias apresentadas:

- Peróxidos de hidrogênio e de cálcio afetaram mais o morfotipo unicelular do que colonial.
- As doses de peróxido de hidrogênio capazes de causar a liberação significativa de MC para o meio no morfotipo unicelular não aumentaram a concentração de MC dissolvida no meio das culturas coloniais.
- O morfotipo colonial apresentou maior resistência ao antibiótico oxytetraciclina, enquanto que o antibiótico enrofloxacina afetou igualmente ambos os morfotipos.
- O morfotipo unicelular desenvolveu resistência a oxytetracyclina mais rapidamente do que o morfotipo colonial.
- No método de *Flock & Sink*, a aplicação de somente lastro removeu significativamente a biomassa do morfotipo colonial enquanto o morfotipo unicelular demandou a aplicação de coagulante e lastro.
- A concentração efetiva de lastro necessária para o manejo de cada lago com florações de cianobactérias vai depender da morfologia predominante e da capacidade de flutuação da população de cianobactérias a ser manejada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, T. et al. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 601-606, 2007. ISSN 1552-8618. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1897/06-195R.1> >.

AZEVEDO, S. M. F. O. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, v. 181–182, p. 441-446, 2002. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02004912> >.

BARRINGTON, D. J.; GHADOUANI, A. Application of Hydrogen Peroxide for the Removal of Toxic Cyanobacteria and Other Phytoplankton from Wastewater. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 23, p. 8916-8921, Dec 1 2008. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <Go to ISI>://000261307200052 >.

BARRINGTON, D. J.; GHADOUANI, A.; IVEY, G. N. Cyanobacterial and microcystins dynamics following the application of hydrogen peroxide to waste stabilisation ponds. *Hydrology and Earth System Sciences*, v. 17, n. 6, p. 2097-2105, 2013. ISSN 1027-5606. Disponível em: < <Go to ISI>://000321139100002 >.

BARRINGTON, D. J.; REICHWALDT, E. S.; GHADOUANI, A. The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems. *Ecological Engineering*, v. 50, p. 86-94, Jan 2013. ISSN 0925-8574. Disponível em: < <Go to ISI>://000315179100012 >.

BOLCH, C. J. S.; BLACKBURN, S. I. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutz. *Journal of Applied Phycology*, v. 8, n. 1, p. 5-13, 1996. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <Go to ISI>://A1996VE83900002 >.

BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, p. 25-40, 2014. ISSN 1984-8250. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502014000100003&nrm=iso >.

BOUCHARD, J. N.; PURDIE, D. A. Effect of Elevated Temperature, Darkness, and Hydrogen Peroxide Treatment on Oxidative Stress and Cell Death in the Bloom-Forming Toxic Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*. *Journal of Phycology*, v. 47, n. 6, p. 1316-1325, Dec 2011. ISSN 0022-3646. Disponível em: < <Go to ISI>://000297880500010 >.

BURKHOLDER, J. M.; GLIBERT, P. M. Intraspecific variability: an important consideration in forming generalisations about toxigenic algal species. *African Journal of Marine Science*, v. 28, n. 2, p. 177-180, 2006/09/01 2006. ISSN 1814-232X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2989/18142320609504143> >.

CHO, I.; LEE, K. Effect of Calcium Peroxide on the Growth and Proliferation of *Microcystis aeruginosa*, a Water-blooming Cyanobacterium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 7, n. 4, p. 231-233, 2002. ISSN 1226-8372. Disponível em: < <Go to ISI>://KJD:ART001011290 >.

CHORUS, I. et al. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, v. 3, n. 4, p. 323-347, Oct-Dec 2000. ISSN 1093-7404. Disponível em: < <Go to ISI>://000089790700002 >.

CODD, G. A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, v. 16, n. 1, p. 51-60, Oct 2000. ISSN 0925-8574. Disponível em: < <Go to ISI>://000165060200006 >.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203, n. 3, p. 264-272, Mar 15 2005. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <Go to ISI>://000227579200008 >.

CONLEY, D. J. et al. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science*, v. 323, n. 5917, p. 1014-1015, 2009. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/sci/323/5917/1014.full.pdf> >.

COOKE, G. D. et al. *Restoration and management of lakes and reservoirs*. CRC press, 2016. ISBN 1420032100.

COOPER, W. J.; ZIKA, R. G. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science*, v. 220, n. 4598, p. 711-2, May 13 1983. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

COPETTI, D. et al. Eutrophication management in surface waters using lanthanum modified bentonite: A review. *Water Research*, 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415303821> >.

DAI, L.; PAN, G. The effects of red soil in removing phosphorus from water column and reducing phosphorus release from sediment in Lake Taihu. *Water Science and Technology*, v. 69, n. 5, p. 1052-1058, 2014.

DE FIGUEIREDO, D. R. et al. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 59, n. 2, p. 151-163, 2004. ISSN 0147-6513. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651304000740> >.

DE MAGALHÃES, L. et al. Efficacy of Coagulants and Ballast Compounds in Removal of Cyanobacteria (*Microcystis*) from Water of the Tropical Lagoon Jacarepaguá (Rio de Janeiro, Brazil). *Estuaries and Coasts*, p. 1-13, 2016. ISSN 1559-2731. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12237-016-0125-x> >.

DELCOUR, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696358/> >.

DELGADO, S. et al. Behaviour of Inorganic Coagulants in Secondary Effluents from a Conventional Wastewater Treatment Plant. *Filtration & Separation*, v. 40, n. 7, p. 42-46, 9// 2003. ISSN 0015-1882. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015188203007328> >.

DING, Y. et al. Hydrogen peroxide induces apoptotic-like cell death in *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) in a dose-dependent manner. *Phycologia*, v. 51, n. 5, p. 567-575, Sep 2012. ISSN 0031-8884. Disponível em: < <Go to ISI>://000308682800009 >.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 50, n. 1, p. 7-17, Jan 2006. ISSN 1613-4125. Disponível em: < <Go to ISI>://000234951300003 >.

DIVAKARAN, R.; SIVASANKARA PILLAI, V. N. Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology*, v. 14, n. 5, p. 419-422, 2002. ISSN 1573-5176. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022137023257> >.

DODDS, W. K. et al. Eutrophication of U.S. Freshwaters: Analysis of Potential Economic Damages. *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 1, p. 12-19, 2009/01/01 2008. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/es801217q> >. Acesso em: 2012/05/24.

DOUGLAS, G. B. et al. Guiding principles for the development and application of solid-phase phosphorus adsorbents for freshwater ecosystems. *Aquatic Ecology*, p. 1-21, 2016. ISSN 1573-5125. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10452-016-9575-2> >.

DRABKOVA, M. et al. Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica*, v. 45, n. 3, p. 363-369, 2007. ISSN 0300-3604. Disponível em: < <Go to ISI>://000248975800006 >.

DRABKOVA, M.; ADMIRAAL, W.; MARSALEK, B. Combined exposure to hydrogen peroxide and light - Selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 1, p. 309-314, Jan 1 2007. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <Go to ISI>://000243124600051 >.

EBERT, I. et al. Toxicity of the Fluoroquinolone Antibiotics Enrofloxacin and Ciprofloxacin to Photoautotrophic Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 12, p. 2786-2792, Dec 2011. ISSN 0730-7268. Disponível em: < <Go to ISI>://000297413100020 >.

FAN, J. et al. Evaluating the effectiveness of copper sulphate, chlorine, potassium permanganate, hydrogen peroxide and ozone on cyanobacterial cell integrity. *Water Research*, v. 47, n. 14, p. 5153-5164, Sep 15 2013. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <Go to ISI>://000324566400033 >.

FAN, J. J. et al. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, v. 264, p. 313-322, Jan 15 2014. ISSN 0304-3894. Disponível em: < <Go to ISI>://000331021200038 >.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989/01/27 1989. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416589800169> >.

GONZÁLEZ-PLEITER, M. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, v. 47, n. 6, p. 2050-2064, 2013. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135413000377> >.

GREENFIELD, D. et al. The Effects of Three Chemical Algaecides on Cell Numbers and Toxin Content of the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabaenopsis* sp. p. 1-11, 2014. ISSN 0364-152X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00267-014-0339-2> >.

GRIFFITHS, D. J.; SAKER, M. L. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, v. 18, n. 2, p. 78-93, Apr 2003. ISSN 1520-4081. Disponível em: < <Go to ISI>://000181956200002 >.

HAGHSERESHT, F.; WANG, S.; DO, D. D. A novel lanthanum-modified bentonite, Phoslock, for phosphate removal from wastewaters. *Applied Clay Science*, v. 46, n. 4, p. 369-375, 12// 2009. ISSN 0169-1317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016913170900237> >.

HANH, D. N.; RAJBHANDARI, B. K.; ANNACHHATRE, A. P. Bioremediation of sediments from intensive aquaculture shrimp farms by using calcium peroxide as slow oxygen release agent. *Environmental Technology*, v. 26, n. 5, p. 581-589, May 2005. ISSN 0959-3330. Disponível em: < <Go to ISI>://000230185100012 >.

HUSZAR, V.; DA SILVA, L. A Estrutura DA Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudos. *Limnotemas*, v. 2, p. 1-22, 1999.

JANCULA, D.; MARSALEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, v. 85, n. 9, p. 1415-1422, Nov 2011. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <Go to ISI>://000298459000001 >.

JANČULA, D.; MIKULA, P.; MARŠÁLEK, B. Effects of polyaluminium chloride on the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemistry and Ecology*, v. 27, n. 4, p. 351-357, 2011/08/01 2011. ISSN 0275-7540. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/02757540.2011.575373> >.

JEPPESEN, E. et al. Recovery resilience following reduction in external phosphorus loading of shallow eutrophic Danish lakes: duration, regulating factors and methods for overcoming resilience. In: GIUSSANI, G.;VAN LIERE, L., et al (Ed.). Ecosystem Research in Freshwater Environment Recovery: Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, v.48, 1991. p.127 - 148.

JIANG, L. et al. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). In: QIN, B.;LIU, Z., et al (Ed.). Eutrophication of Shallow Lakes with Special Reference to Lake Taihu, China. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p.161-165. ISBN 978-1-4020-6158-5.

JUNEAU, P. et al. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. Chemosphere, v. 45, n. 4-5, p. 589+, Nov 2001. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <Go to ISI>://000171451900021 >.

KIM, B. H.; HWANG, S. J.; HAN, M. S. Bacterium and Fish-Mediated Morphological Changes of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Freshwater Ecology, v. 23, n. 4, p. 613-622, Dec 2008. ISSN 0270-5060. Disponível em: < <Go to ISI>://000260590800013 >.

KOLAR, B. et al. The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. Chemosphere, v. 115, n. 0, p. 75-80, 2014. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514002537> >.

KOMAREK, J. et al. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp nov. Cryptogamie Algologie, v. 23, n. 2, p. 159-177, Apr-Jun 2002. ISSN 0181-1568. Disponível em: < <Go to ISI>://000177604600004 >.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology, v. 144, n. 1, p. 51-63, 11/15/ 2010. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005167> >.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508015105> >.

LI, H. et al. In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. Toxicol, v. 53, n. 1, p. 169-175, 1// 2009. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108005758> >.

LI, H.; PAN, G. Simultaneous Removal of Harmful Algal Blooms and Microcystins Using Microorganism- and Chitosan-Modified Local Soil. Environ. Sci. Technol., v. 49 n. 10, p. 6249–6256, 2015.

LI, M.; NKURUMAH, P. N.; PENG, Q. Different tolerances to chemical contaminants between unicellular and colonial morph of *Microcystis aeruginosa*: Excluding the differences among different strains. *Journal of Hazardous Materials*, v. 285, n. 0, p. 245-249, 2015. ISSN 0304-3894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389414009935> >.

LI, Y.; LI, D. Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabaena* PCC7120. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 1, p. 69-78, 2012. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9648-x> >.

ŁOPATA, M.; GAWROŃSKA, H. Phosphorus immobilization in Lake Głęboć following treatment with polyaluminum chloride. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 37: 99-105 p. 2008.

LÜRLING, M. et al. Editorial – A critical perspective on geo-engineering for eutrophication management in lakes. *Water Research*, v. 97, p. 1-10, 6/15/ 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416000555> >.

LÜRLING, M.; BEEKMAN, W. Grazer-induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales; Chlorophyceae): coenobium and spine formation. *Phycologia*, v. 38, n. 5, p. 368-376, Sep 1999. ISSN 0031-8884. Disponível em: < <Go to ISI>://000083651900004 >.

LURLING, M.; FAASSEN, E. J. Dog poisonings associated with a *Microcystis aeruginosa* bloom in the Netherlands. *Toxins*, v. 5, n. 3, p. 556-67, 2013. ISSN 2072-6651 (Electronic) 2072-6651 (Linking).

LÜRLING, M.; MENG, D.; FAASSEN, E. Effects of Hydrogen Peroxide and Ultrasound on Biomass Reduction and Toxin Release in the Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Toxins*, v. 6, n. 12, p. 3260-3280, 2014. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/12/3260> >.

LÜRLING, M.; OOSTERHOUT, F. V. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research*, v. 47, n. 17, p. 6527-6537, 11/1/ 2013. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135413006593> >.

LÜTZHØFT, H.-C. H.; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN, S. E. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 36, n. 1, p. 1-6, 1999. ISSN 1432-0703. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900435> >.

MARINHO, M. M.; SOUZA, M. B. G.; LÜRLING, M. Light and Phosphate Competition Between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* is Strain Dependent. *Microbial Ecology*, v. 66, n. 3, p. 479-488, 2013/10/01 2013. ISSN 0095-3628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0232-1> >.

- MATTHIJS, H. C. P. et al. Existing and emerging cyanocidal compounds: new perspectives for cyanobacterial bloom mitigation. *Aquatic Ecology*, v. 50, n. 3, p. 443-460, 2016. ISSN 1573-5125. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10452-016-9577-0> >.
- MATTHIJS, H. C. P. et al. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water Research*, v. 46, n. 5, p. 1460-1472, Apr 1 2012. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <Go to ISI>://000301018700011 >.
- MELLO, M. M. et al. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Plankton Research*, v. 34, n. 11, p. 987-994, Nov 2012. ISSN 0142-7873. Disponível em: < <Go to ISI>://000309467200006 >.
- MIKULA, P. et al. Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* – new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, v. 47, n. 3, p. 195-206, 2014/09/05 2012. ISSN 0967-0262. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2012.687144> >.
- NOVOTORTSEV, V. et al. Examination of the disinfecting properties of calcium peroxide and its suitability for improving hydrodynamic characteristics of surface water bodies. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 85, n. 5, p. 726-730, May 2012. ISSN 1070-4272. Disponível em: < <Go to ISI>://000305417900007 >.
- NOYMA, N. P. et al. Controlling cyanobacterial blooms through effective flocculation and sedimentation with combined use of flocculants and phosphorus adsorbing natural soil and modified clay. *Water Research*, 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415303833> >.
- O'NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, v. 14, p. 313-334, Feb 2012. ISSN 1568-9883. Disponível em: < <Go to ISI>://000300818000018 >.
- OOSTERHOUT, F.; LURLING, M. Effects of the novel 'Flock & Lock' lake restoration technique on *Daphnia* in Lake Rauwbraken (The Netherlands). *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, v. 33, n. 2, p. 255–263, 2011.
- PAERL, H.; OTTEN, T. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, v. 65, n. 4, p. 995-1010, 2013/05/01 2013. ISSN 0095-3628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y> >.
- PAN, G. et al. Reducing the Recruitment of Sedimented Algae and Nutrient Release into the Overlying Water Using Modified Soil/Sand Flocculation-Capping in Eutrophic Lakes. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 9, p. 5077-5084, 2012/05/01 2012. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/es3000307> >.
- PAN, G. et al. Removal of harmful cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils III. Factors affecting the removal efficiency and an in situ field experiment using chitosan-modified local soils. *Environmental Pollution*, v. 141, n. 2, p. 206-212, 5//

2006. ISSN 0269-7491. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749105004471> >.

PARKHILL, J.-P.; MAILLET, G.; CULLEN, J. J. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, v. 37, n. 4, p. 517-529, 2001. ISSN 1529-8817. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037004517.x> >.

QIAN, H. F. et al. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, v. 99, n. 3, p. 405-412, Sep 1 2010. ISSN 0166-445X. Disponível em: <
<Go to ISI>://000281493400011 >.

QUADRA, G. R. et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 2, p. 1200-1218, January 01 2017. ISSN 1614-7499. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7789-4> >.

RALPH, P. J. et al. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 89, n. 4, p. 589-607, 2007/10/01 2007. ISSN 0277-2248. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/02772240701561593>>.

RENAULT, F. et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*, v. 45, n. 5, p. 1337-1348, 5// 2009. ISSN 0014-3057. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305708007222> >.

REYNOLDS, C. S. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia*, v. 578, n. 1, p. 37-45, Mar 2007. ISSN 0018-8158. Disponível em: < <Go to ISI>://000244308300005 >.

RICO, A. et al. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, v. 412–413, p. 231-243, 2013. ISSN 0044-8486. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848613003542> >.

RICO, A. et al. Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. *Environmental Pollution*, v. 191, p. 8-16, Aug 2014. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000338605200002 >.

ROBINSON, A. A.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 2, p. 423-430, Feb 2005. ISSN 0730-7268. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226375600023 >.

ROSS, G.; HAGHSERESHT, F.; CLOETE, T. E. The effect of pH and anoxia on the performance of Phoslock®, a phosphorus binding clay. *Harmful Algae*, v. 7, n. 4, p.

545-550, 6// 2008. ISSN 1568-9883. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988307001916> >.

SCHINDLER, D. W. et al. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 32, p. 11254-11258, August 12, 2008 2008. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/105/32/11254.abstract> >.

SCHINDLER, D. W. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.*, v. 279, p. 4322, 2012.

SCHMITT-JANSEN, M.; ALTENBURGER, R. The use of pulse-amplitude modulated (PAM) fluorescence-based methods to evaluate effects of herbicides in microalgal systems of different complexity. *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 89, n. 4, p. 665-681, 2007/10/01 2007. ISSN 0277-2248. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/02772240701561601> >.

SHANG, A. H. et al. Physiological effects of tetracycline antibiotic pollutants on non-target aquatic *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 50, n. 11, p. 809-818, 2015/11/02 2015. ISSN 0360-1234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2015.1058100> >.

SHEN, H. et al. Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, v. 56, n. 6, p. 1065-1080, Jun 2011. ISSN 0046-5070. Disponível em: < <Go to ISI>://000289640800004 >.

SHEN, H.; SONG, L. Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloom-forming *Microcystis*. *Hydrobiologia*, v. 592, n. 1, p. 475-486, 2007. ISSN 1573-5117. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-0794-3> >.

SMITH, V. H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 10, n. 2, p. 126-139, 2003. ISSN 0944-1344. Disponível em: < <Go to ISI>://000181903800010 >.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 4, p. 201-207, Apr 2009. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://000265358900010 >.

SNEL, J. F. H. et al. Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquatic Ecology*, v. 32, n. 2, p. 113-123, 1998. ISSN 1573-5125. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009971930626> >.

SOARES, M. C. S. et al. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*, v. 717, n. 1, p. 1-12, 2013/06/02 2013. ISSN 0018-8158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-013-1562-1> >.

SONDERGAARD, M.; JENSEN, P. J.; JEPPESEN, E. Retention and Internal Loading of Phosphorus in Shallow, Eutrophic Lakes. *TheScientificWorldJOURNAL*, v. 1, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2001.72> >.

SPEARS, B. M. et al. Comparison of phosphorus (P) removal properties of materials proposed for the control of sediment p release in UK lakes. *Science of The Total Environment*, v. 442, p. 103-110, 1/1/ 2013. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712012661> >.

SPEARS, B. M. et al. Lake responses following lanthanum-modified bentonite clay (Phoslock®) application: an analysis of water column lanthanum data from 16 case study lakes. *Water Res.*, v. 47, p. 5930, 2013.

SPELTINI, A. et al. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: Sample preparation and determination. *Journal of Separation Science*, v. 33, n. 8, p. 1115-1131, 2010. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900753> >.

STEFFENSEN, D. A. Economic cost of cyanobacterial blooms. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*, v. 619, p. 855-865, 2008. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <Go to ISI>://000254893200071 >.

VAN DER GRINTEN, E. et al. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*, v. 80, n. 1, p. 1-6, 2010. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653510004182> >.

VAN WICHELEN, J. et al. Strong effects of amoebae grazing on the biomass and genetic structure of a *Microcystis* bloom (Cyanobacteria). *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 10, p. 2797-2813, Oct 2010. ISSN 1462-2912. Disponível em: < <Go to ISI>://000282375400013 >.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLEAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 4, p. 233-239, 4// 2013. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779912002247> >.

VERSPAGEN, J. M. H.; VISSER, P. M.; HUISMAN, J. Aggregation with clay causes sedimentation of the buoyant cyanobacteria *Microcystis* spp. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 44, n. 2, p. 165-174, Sep 12 2006. ISSN 0948-3055. Disponível em: < <Go to ISI>://000241076000005 >.

WAAJEN, G. et al. Geo-engineering experiments in two urban ponds to control eutrophication. *Water Research*, v. 97, p. 69-82, 6/15/ 2016a. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415303961> >.

_____. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v.

97, p. 83-95, 6/15/ 2016b. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415303614> >.

WANG, X. et al. Differential sensitivity of colonial and unicellular *Microcystis* strains to an algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of plankton research, v. 35, n. 5, p. 1172-1176, 2013. ISSN 0142-7873.

WANG, Z. C. et al. An integrated method for removal of harmful cyanobacterial blooms in eutrophic lakes. Environmental Pollution, v. 160, p. 34-41, Jan 2012. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <Go to ISI>://000297898000006 >.

WANG, Z.; ZHANG, H.; PAN, G. Ecotoxicological assessment of flocculant modified soil for lake restoration using an integrated biotic toxicity index. Water Research, v. 97, p. 133-141, 6/15/ 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415301846> >.

WU, X.; KONG, F.; ZHANG, M. Photoinhibition of colonial and unicellular *Microcystis* cells in a summer bloom in Lake Taihu. Limnology, v. 12, n. 1, p. 55-61, 2011. ISSN 1439-8621. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10201-010-0321-5> >.

WU, Z. X. et al. Response of *Microcystis* to copper stress - Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? Environmental Pollution, v. 147, n. 2, p. 324-330, May 2007. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246457700004 >.

WU, Z. X.; SONG, L. R. Physiological comparison between colonial and unicellular forms of *Microcystis aeruginosa* Kutz. (Cyanobacteria). Phycologia, v. 47, n. 1, p. 98-104, Jan 2008. ISSN 0031-8884. Disponível em: < <Go to ISI>://000252288800010 >.

YANG, R. et al. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. Water Research, v. 95, p. 59-89, 5/15/ 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416301270> >.

YANG, Z. et al. Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. Hydrobiologia, v. 563, p. 225-230, Jun 2006. ISSN 0018-8158. Disponível em: < <Go to ISI>://000237552100018 >.

YANG, Z.; KONG, F. X. Formation of large colonies: a defense mechanism of *Microcystis aeruginosa* under continuous grazing pressure by flagellate *Ochromonas* sp. Journal of Limnology, v. 71, n. 1, p. 61-66, 2012. ISSN 1129-5767. Disponível em: < <Go to ISI>://000303943400005 >.

ZHANG, D. et al. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. Environmental Pollution, v. 184, p. 620-639, 2014. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113004806> >.

ZHANG, Y.; JIANG, H.-B.; QIU, B.-S. Effects of UVB Radiation on competition between the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the

Chlorophyceae *Chlamydomonas microsphaera*. Journal of Phycology, v. 49, n. 2, p. 318-328, 2013. ISSN 1529-8817. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12038> >.

ZOU, H. et al. Removal of cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils II. Effective removal of *Microcystis aeruginosa* using local soils and sediments modified by chitosan. Environmental Pollution, v. 141, n. 2, p. 201-205, 5// 2006. ISSN 0269-7491. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910500446X> >.

ANEXOS I E II

Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences

**Maria Carolina S. Soares, Vera
L. M. Huszar, Marcela N. Miranda,
Mariana M. Mello, Fabio Roland &
Miquel Lürling**

Hydrobiologia

The International Journal of Aquatic
Sciences

ISSN 0018-8158

Hydrobiologia

DOI 10.1007/s10750-013-1562-1



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences

Maria Carolina S. Soares · Vera L. M. Huszar ·
Marcela N. Miranda · Mariana M. Mello ·
Fabio Roland · Miquel Lürling

Received: 7 December 2012 / Revised: 14 May 2013 / Accepted: 18 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Based on a literature survey, we evaluated the periods of cyanobacterial dominance in Brazil. We hypothesized that variability of environmental forces along the country will promote or facilitate temporal and spatial mosaic in cyanobacterial dominance. The most striking outcomes are related to the dominance of *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, and *Microcystis*. Although they share important adaptive strategies (e.g., aerotopes, large size and toxins production), our findings suggest that they have different environmental preferences. *Dolichospermum* and *Microcystis* dominated mainly in warm-rainy periods whereas *Cylindrospermopsis* was more common during dry periods and in

mixed systems, or formed perennial dominance. Maximum phosphorus concentrations were observed in reservoirs dominated by *Cylindrospermopsis*. Although the main genera reached high biomass levels individually, different abilities to form dominance and co-dominance were observed. The number of co-dominance of Chroococales and Nostocales was almost the same as the individual occurrence of the main genera from these groups. This dataset reveals patterns of dominance of these cyanobacteria and also indicates that physiological features will cause differences in the mechanisms of interactions between species. The understanding of these processes and their relationship to environmental conditions will promote better understanding of cyanobacterial dominance and increase our ability to predict and manage these events.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10750-013-1562-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Handling editor: Luigi Naselli-Flores

M. C. S. Soares (✉)
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental,
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora,
MG 36036-900, Brazil
e-mail: carolina.soares@ufjf.edu.br

V. L. M. Huszar
Departamento de Botânica, Museu Nacional do Rio de
Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de
Janeiro, RJ 20940-040, Brazil

M. N. Miranda · M. M. Mello · F. Roland
Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz
de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

Keywords *Cylindrospermopsis* · *Dolichospermum* ·
Harmful algae · *Microcystis*

M. Lürling
Department of Aquatic Ecology, Netherlands Institute of
Ecology—Royal Netherlands Academy of Arts and
Sciences, Wageningen, The Netherlands

M. Lürling
Department of Environmental Sciences, Aquatic Ecology
and Water Quality Management Group, Wageningen
University, P.O. Box 8080, Wageningen, The Netherlands

Introduction

Cyanobacteria may be the main component of phytoplankton community in different periods of the year, but also form stable annual dominance patterns. This is evident especially in tropical systems that undergo relatively small changes during the year (Figueredo & Giani, 2009; Soares et al., 2009a). An important physiological factor favoring cyanobacterial dominance in many systems is the presence of aerotopes, which reduces sedimentation and increases access to light and nutrients along the water column (Reynolds et al., 1987; Walsby, 1994). In favorable conditions, cyanobacteria with aerotopes may form dense populations, accumulating at the water surface and concentrating even further by wind drift to the windward shore. These particular cyanobacteria are distributed across a number of genera and vary in shape and size. Surface accumulation and high biomass has been especially related to filamentous *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindropermopsis*, *Dolichospermum* (formerly *Anabaena*), *Nodularia* and *Planktothrix* (formerly *Oscillatoria*), and the colonial *Microcystis* (Oliver & Ganf, 2000). The special advantages of these cyanobacteria have been summarized in a functional classification based on morphological traits (Kruk et al., 2010): group III, formed by large filaments with slow growth rates, high tolerance to light limitation, and N₂ fixation (some); and group VII formed by large mucilaginous colonies. Despite the considerable differences in morphology, they share common features such as the presence of aerotopes, large size, resistance to grazing, and ability to produce toxins. These cyanotoxins constitute one of the most high risk categories of waterborne toxic substances (Codd et al., 2005; Dittman & Wiegand, 2006), and present a serious threat to the environment and health of wildlife, cattle and humans.

Anthropogenic eutrophication and more recently, global climate change will favor increases in the frequency, occurrence, and duration of cyanobacterial dominance (Paerl & Huisman, 2008; Moss et al., 2011). While the increase in the world population has stimulated the input of nutrients in aquatic systems, rising temperatures will change the physical characteristics of the water, favoring cyanobacteria dominance over other phytoplankton organisms (Cayelan et al., 2012; O'Neil et al., 2012). Although these factors may stimulate cyanobacteria as a group, the

species differ widely in morphological and functional aspects affecting production of toxins and interactions with other organisms. The understanding of environmental factors that facilitate and promote the establishment of different species of cyanobacteria is mandatory to predict and manage these events and their consequences.

Cyanobacteria occurrence and dominance have increased in recent decades, as have studies evaluating environmental conditions that favor these organisms. However, most of the studies have analyzed particular occurrences in time and space, and we are still far from discerning general patterns and trends. The lack of uniformity in methodological procedures is a barrier in generating precise comparative studies. Furthermore, due to lack of interaction between field observations and experimental studies, it is difficult to make generalizations. In this heterogeneous scenario, the search for general trends may indicate some patterns and aspects that should be clarified. In Brazil, as elsewhere, cyanobacteria flourishing seem to be expanding. While it might be virtually impossible to predict the species of cyanobacteria that might dominate in the future, the prediction of dominant functional groups might be a more attainable goal. Increased insight into the relationship of the distribution and occurrence of periods of dominance to limnological characteristics seems to be crucial for outlining the ecological preferences and determining the implications of predicted climate-change scenarios for different water characteristics.

In order to evaluate the environmental factors related to differences in cyanobacterial dominance, we surveyed published data on Brazilian tropical and subtropical freshwater systems. We hypothesized that variability of environmental forces along the country will promote or facilitate temporal and spatial mosaic in cyanobacterial dominance and composition, but also that annual periods of dominance will be favored by stable conditions in aquatic systems located at low latitudes.

Materials and methods

Data mining

A dataset was constructed using papers published from 1990 to 2011 and indexed in the SCIELO (Brazil),

SCOPUS, and ISI (international) literature databases. The search was performed from November 30 to December 11, 2009 and updated on May 1, 2011, using different combinations of the following keywords: cyanobacteria, Cyanophyceae, phytoplankton, cyanotoxins, and Brazil (Brasil). Only studies on freshwater systems and planktonic communities were included in the first dataset, which was organized according to the following subjects: molecular biology (MOLBIO), community dynamics (COMDYN), ecophysiology (ECOPHY), taxonomy (TAX), toxicology (TOX), and others (OTHERS). Papers about community dynamics were then selected according to the following criteria: (a) at least one period of dominance of cyanobacteria (number of samples in each period depends on the sampling frequency of each paper); (b) phytoplankton quantitative analysis using the settling technique (Utermöhl, 1958); (c) data on biovolume or biomass of cyanobacteria. In these papers, samples were taken during dry/wet seasons, monthly, fortnightly, or weekly. If several different papers appeared referring to the same water body during the same study period, the one with most complete information (physical features, nutrients, etc.) was included in the data analyses. Cyanobacterial dominance was analyzed according to the periods of dominance (one genus) or co-dominance (two or more genera). These periods were analyzed according to: cyanobacterial contribution to the total biovolume, main species, contribution of the main species to the total biovolume, mean and maximum biovolume, period of the year, mean temperature, physical structure of the water column (mixing or stratification), total phosphorus, soluble reactive phosphorus, total nitrogen, ammonium, nitrate, nitrite, and dissolved inorganic nitrogen (when available). Periods consisted of the average data of the period (more than one data) or in case of dominance or co-dominance during only one sample, individual data were used. This particular occurrence was considered only when data fitted the following conditions: (1) dominance occurring in one month during monthly survey—indicating changes in patterns of dominance that are relevant to the dataset; and (2) one month of dominance during seasonal sampling frequency—in this condition, we could not assume that the dominance represented a pattern or it is just a random occurrence. To verify the validity of these data, we ran an extra search on unpublished data (PhD and master theses, technical reports and personal

communications). When the periods and dominant species matched with other observations in different years, we maintained data in our dataset. Different periods in the same study were included and considered as separate periods of dominance or co-dominance. For papers with vertical-profile or spatial data, only data for the sub-surface of the deepest station were selected. Consequently, only data on limnetic region of the lakes and reservoirs are shown. Only one of the papers sampled integrated phytoplankton along the euphotic zone (dos Santos & Calijuri, 1998). The data were extracted directly from tables or figures using the software Fifdi for Matlab 7.8.

Data analysis

A detrended correspondence analysis (DCA) was performed, using the species dataset to determine the length of the gradient for the first two axes (Leps & Smilauer, 1999). Redundancy Analysis (RDA) was performed using canonical ordination software (CANOCO v.4.5) to ordinate data from different periods and environmental variables. The forward selection of RDA was used to determine the minimum number of factors that could explain statistically significant ($P < 0.05$) proportions of variation in the species data. The significance of these variables was assessed using Monte Carlo permutation tests (with 999 unrestricted permutations).

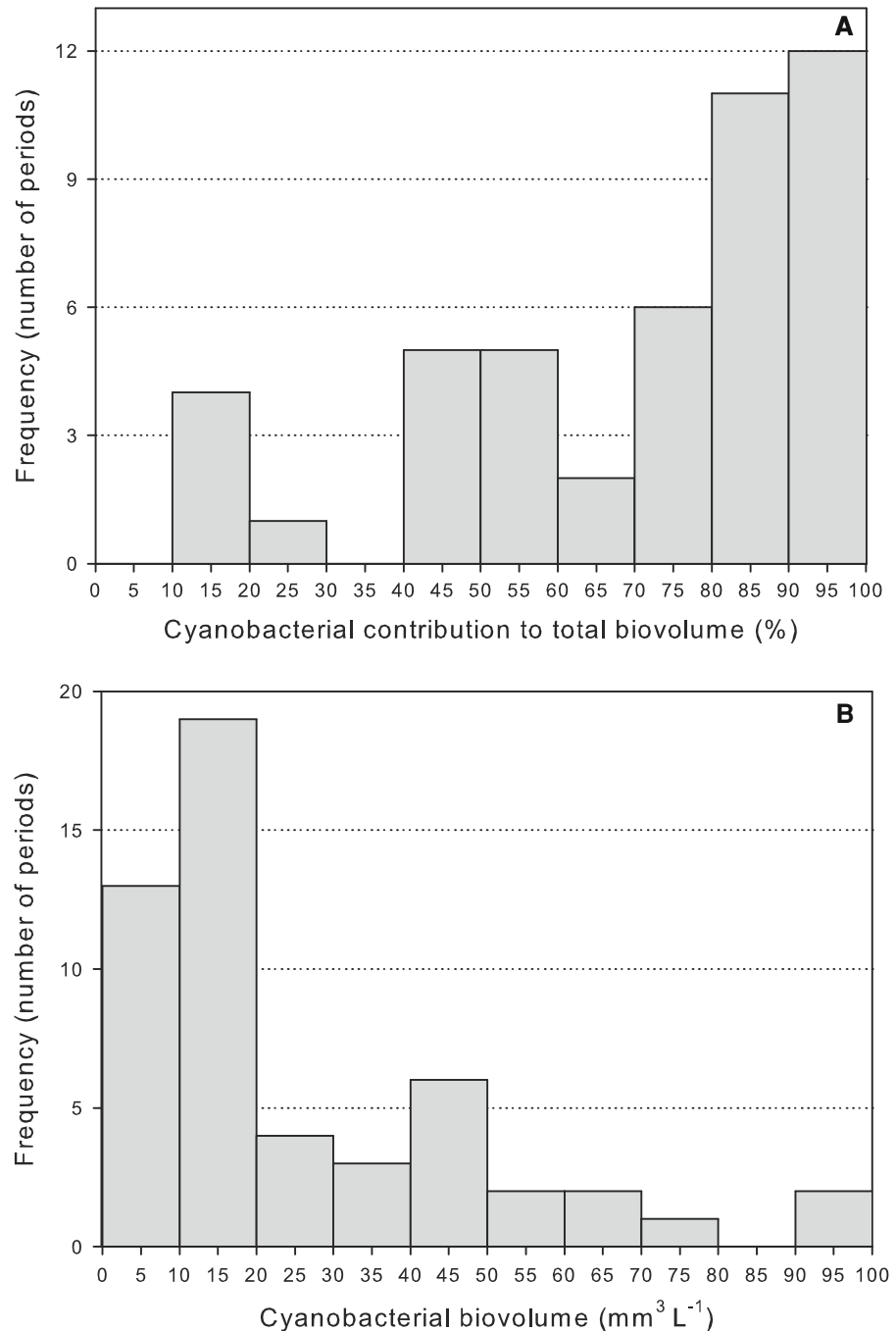
Results

Initially, a total of 160 papers were selected and divided into the six main categories. The majority of the studies are about community dynamics (36%) and toxicology (28%) followed by taxonomy, ecophysiology, molecular biology, and applied issues (around 9% each). From an initial pool of 57 papers on community dynamics, 22 fit the criteria established, and referred to 24 different systems (different papers about the same system in different periods, or several systems in the same paper) and 48 periods of dominance or co-dominance (See Supplementary Material). N (number of data) varied because not all data were presented in all the papers. The studies cover locations in Brazil from north ($1^{\circ}28'S$) to south ($29^{\circ}05'N$) and from east ($36^{\circ}29'W$) to west ($56^{\circ}14'W$), but the majority of studies were carried out near the coast. Most of the

systems with cyanobacteria dominance are reservoirs (71%, $n = 17$), and only five authors mentioned these systems as used for drinking-water supply. Cyanobacterial contribution to total biovolume during periods varied from 14 to 99% ($n = 41$), but average contribution of total data was 69% (± 26 SD) (Fig. 1A).

Average cyanobacterial total biovolume in all periods ($n = 45$, Fig. 1B) varied from $0.1 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$, with the co-dominance of *Planktolyngbya limnetica* and *Synechococcus nidulans* in a coastal lagoon, to $95.1 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ in a reservoir, with the dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Fig. 1 Frequency distribution of the cyanobacterial contribution to total biovolume (%; $n = 41$) (A) and cyanobacteria biovolume ($\text{mm}^3 \text{ l}^{-1}$; $n = 45$) (B) for the total dataset



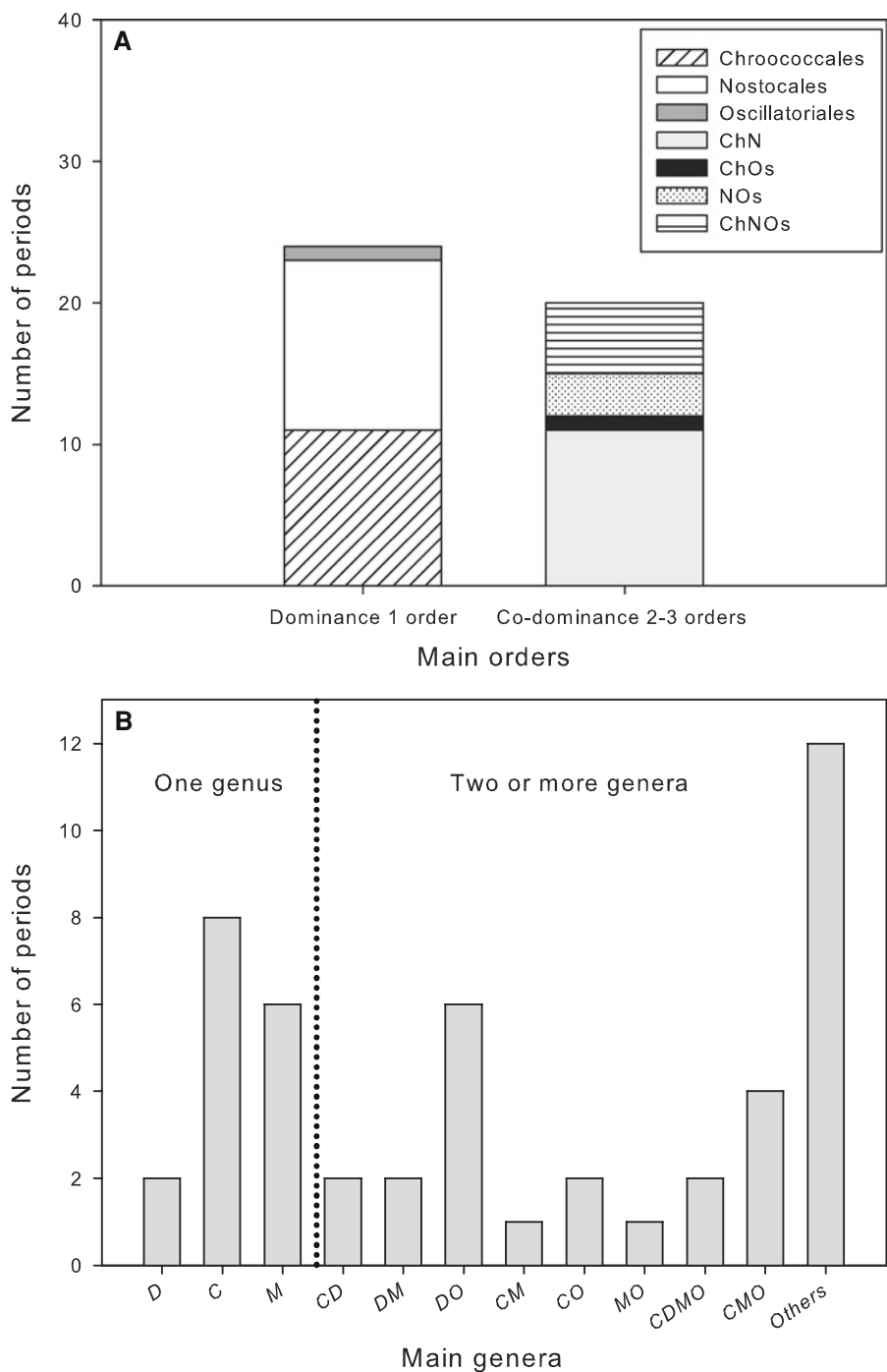
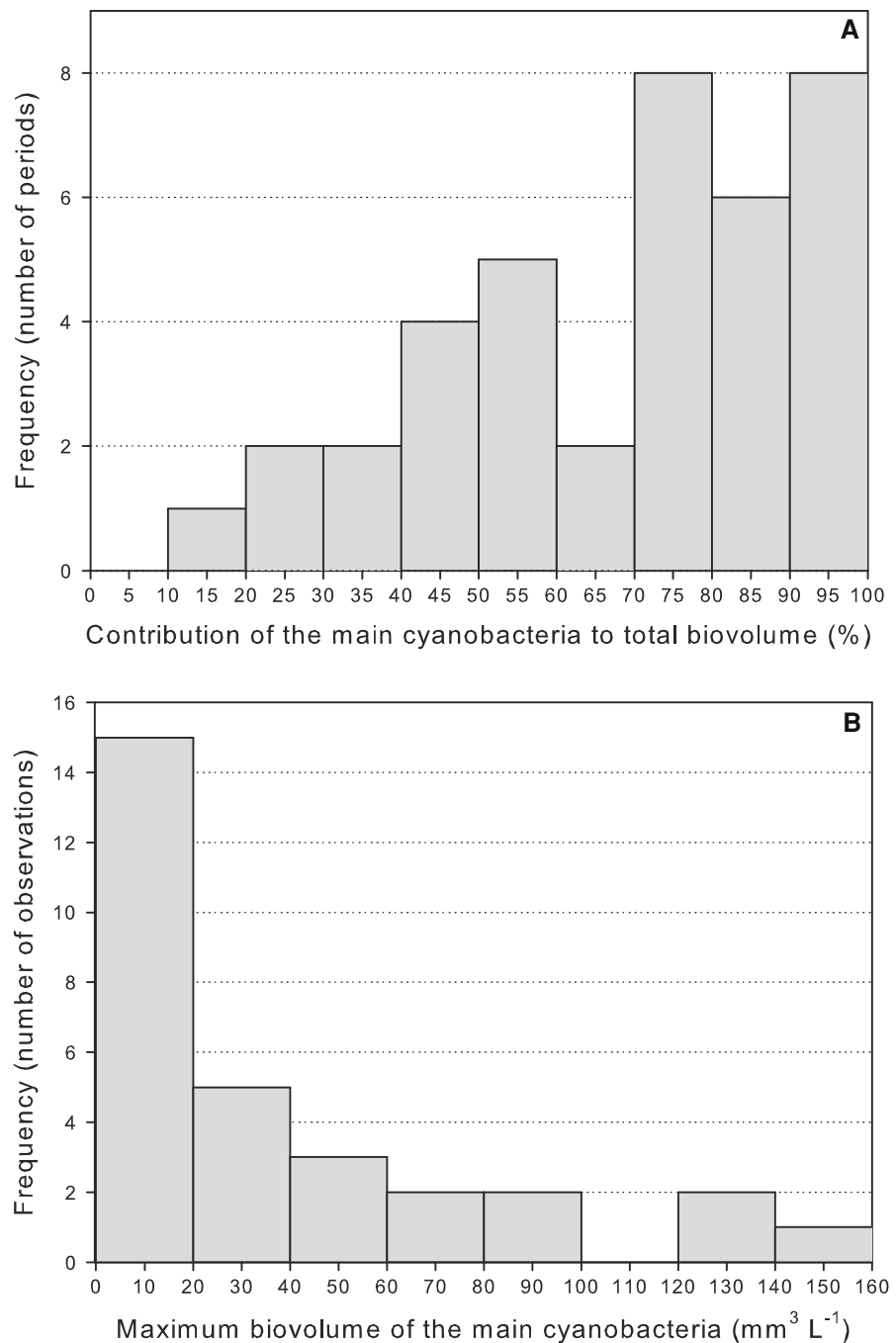


Fig. 2 Number of periods with dominance and co-dominance of different cyanobacterial orders ($n = 48$) (A) and with dominance (one) and co-dominance (two or more) of the main cyanobacterial genera ($n = 48$) (B) for the total dataset. ChN, Chroococcales and Nostocales; ChOs, Chroococcales and Oscillatoriales; NOs, Nostocales and Oscillatoriales; ChNOs, Chroococcales, Nostocales and Oscillatoriales; D, *Dolichospermum*; C, *Cylindrospermopsis*;

M, *Microcystis*; O, Others; CD, *Cylindrospermopsis* and *Dolichospermum*; DM, *Dolichospermum* and *Microcystis*; DO, *Dolichospermum* and Others; CM, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*; CO, *Cylindrospermopsis* and Others; MO, *Microcystis* and Others; CDMO, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis* and Others; and CMO, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* and Others

Fig. 3 Frequency distribution of the contribution to the main cyanobacteria to the total biovolume (%; $n = 38$) (A) and maximum biomass of the main cyanobacteria (mg l^{-1} ; $n = 30$) (B) for the total dataset. The maximum reported biomass of 3868 mg l^{-1} (Crossetti & Bicudo, 2008) was excluded from this analysis



Periods of co-dominance of cyanobacteria were mainly formed between members of the same taxonomical orders (Fig. 2A). Co-dominance between members of different orders was common between colonial (Chroococcales) and filamentous N_2 -fixing (Nostocales) (ChN) (23.0%), while the presence of

members of the three orders, including filamentous non- N_2 -fixing cyanobacteria (Oscillatoriales) (ChNOs) consisted of 10.4% of periods. Periods consisted mostly of one (45.8%) or two (41.7%) dominating genera, while co-dominance of 3-6 genera was scarcer (12.5%, $n = 48$). *Cylindrospermopsis* (C), *Dolichospermum* (D)

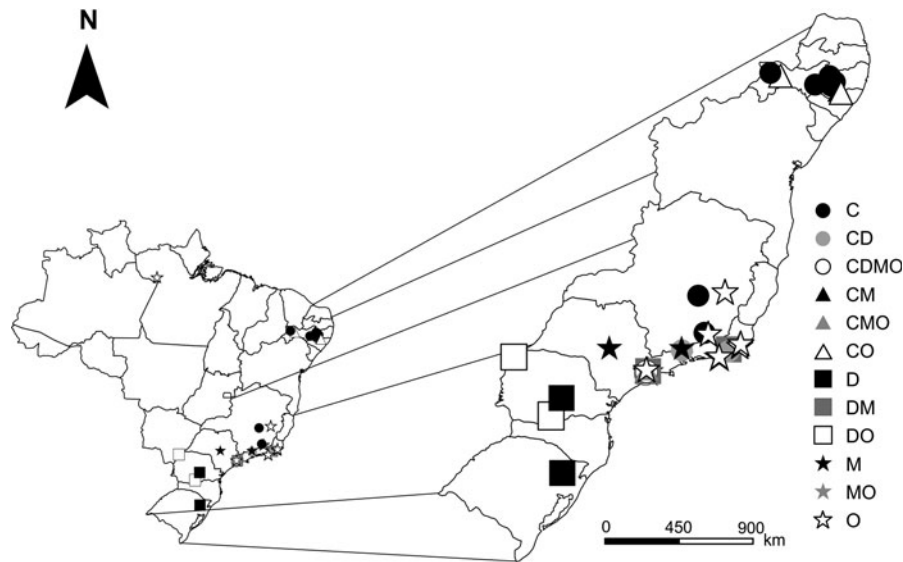


Fig. 4 Distribution of the three main cyanobacterial genera in Brazil. D, *Dolichospermum*; C, *Cylindrospermopsis*; M, *Microcystis*; O, Others; CD, *Cylindrospermopsis* and *Dolichospermum*; DM, *Dolichospermum* and *Microcystis*; DO, *Dolichospermum* and Others; CM, *Cylindrospermopsis* and

Microcystis; CO, *Cylindrospermopsis* and Others; MO, *Microcystis* and Others; CDMO, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis* and Others; and CMO, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* and Others

(filamentous N_2 -fixing cyanobacteria) and *Microcystis* (M) (colonial) were the most common genera, present in 77% of periods ($n = 48$). Although periods of dominance of only one genus were more common (Fig. 2B), *Dolichospermum* was often found forming co-dominance with colonial cyanobacteria, such as *Aphanocapsa* and *Radiocystis* (DO). When *Cylindrospermopsis* formed co-dominance with other genera, it was mostly with Oscillatoriales such as *Lyngbya*, *Planktolynngbya*, *Planktothrix* and *Geitlerinema* (CO) and *Microcystis* (CM). *Sphaerocavum* was the main genus forming co-dominance with *Microcystis* (MO). However, the three main genera occurred together in only 4% of the total number of periods (CDMO) (Fig. 2B). In 60% ($n = 38$) of the incidences, only one species was responsible for more than 50% of total biovolume, indicating a tendency to monospecific dominance or a low variety of species during these periods (Fig. 3A). During these periods of dominance of the main genera (*Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* and *Microcystis*), maximum biovolume varied from $1.4 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ (*Dolichospermum planctonicum*, formerly *Anabaena planctonica*) to $3,868 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ (*Microcystis panniformis*). However, many data showed maximum biovolume below $20 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ (mean $38 \pm 43 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$, $n = 30$) (Fig. 3B). Importantly,

only few investigators used the word “bloom” to characterize the periods of cyanobacterial dominance (28%, $n = 48$). Furthermore, only four papers ($n = 48$) provided any information on toxins, demonstrating that studies on analysis of toxins are rarely related to the dynamics of these organisms and its relationship with changes in the environment. Three of them report results on mouse/fish bioassays during the dominance of *C. raciborskii* (Bouvy et al., 1999; Soares et al., 2007) and *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (Huszar et al., 1998), but only one related the effects observed to the presence of neurotoxins (Bouvy et al., 1999). Soares et al. (2009a) mentioned the presence of microcystins and saxitoxins during dominance periods of *M. aeruginosa* and *C. raciborskii*, respectively.

The distributions of the three genera along the country are shown in Fig. 4. *Dolichospermum* was found as a dominant exclusively in latitudes higher than $22^\circ 33' \text{S}$, while *Cylindrospermopsis* and *Microcystis* have a broader distribution.

Cyanobacteria dominance and environmental conditions

The periods of cyanobacterial dominance occurred especially during rainy season (rainy-warm periods in

intermediate latitudes) (38% of dominance events, $n = 48$) (See Supplementary Material). Annual dominance of cyanobacteria was most common in reservoirs from lower latitudes and consequently with relatively low variation in temperature during the year. Cyanobacteria dominance occurred mainly in periods with mixing of the water column (73%, $n = 30$) than in periods of stratification, but most of the periods occurred in shallow systems (maximum depth <5 m). Stratification seems to have favored *Dolichospermum* and *Microcystis*, while *Cylindrospermopsis* was related to systems with annual mixing. Although the majority of the periods occurred in eutrophic conditions, monospecific dominance of *Dolichospermum* occurred in lower concentrations of total phosphorus, while *Cylindrospermopsis* and *Microcystis* dominance were more common in systems with concentrations above $20 \mu\text{g l}^{-1}$. *Cylindrospermopsis* dominance occurred in the maximum concentrations of total phosphorus ($685 \mu\text{g l}^{-1}$) (See Supplementary Material).

The RDA using forward selection and the screened environmental data yielded two significant variables: water temperature ($P = 0.004$, $F = 3.1$) and pH ($P = 0.04$, $F = 2.0$). Together, these two variables accounted for 54% of the total variance in phytoplankton biovolume. Axis 1 and 2 accounted for 46.7 and 26.7% of the relationship between species and environmental variables (Fig. 5). Samples were distributed along the RDA triplot according to the main monospecific dominance. *Dolichospermum* (D) dominate in deep systems, with lower concentrations of nutrients and during periods of higher temperatures. On the other hand, *Cylindrospermopsis* was more common in shallow systems, principally with higher nutrient concentrations. Similar characteristics seem to have favored the group Others (O) that is predominantly formed by Oscillatoriales. *Microcystis*, but also period of co-dominance between different taxa, was more related to intermediate conditions (Fig. 5).

Discussion

Factors related to the occurrence of cyanobacterial occurrence and dominance have been extensively investigated; however, large differences in the eco-physiology of species make generalizations about the drivers of such events difficult (Cayelan et al., 2012).

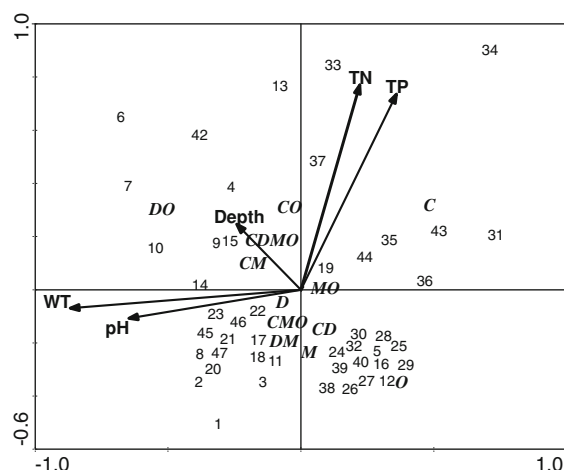


Fig. 5 RDA ordination diagram of cyanobacterial dominance considering environmental variables as vectors and the main genera (*Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis* and Others) on bi-dimensional space of the first (46.7%) and second (26.7%) axes. D, *Dolichospermum*; C, *Cylindrospermopsis*; M, *Microcystis*; O Others; CD, *Cylindrospermopsis* and *Dolichospermum*; DM, *Dolichospermum* and *Microcystis*; DO, *Dolichospermum* and Others; CM, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*; CO, *Cylindrospermopsis* and Others; MO, *Microcystis* and Others; CDMO, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis* and Others; and CMO, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* and Others, WT water temperature, Depth maximum depth, TN total nitrogen, TP total phosphorus. ¹Alves-de-Souza et al. (2006), ²Becker et al. (2008), ³Beyruth (2000), ⁴Borges et al. (2008), ⁵Bouvy et al. (1999), ^{6–10}Bovo-Scomparin and Train (2008), ^{11–13}Crossetti & Bicudo (2008), ^{14–15}Dantas et al. (2008), ¹⁶Figueredo et al. (2009), ^{17–19}Fonseca et al. (2008), ^{20–23}Gemelgo et al. (2009), ²⁴Huszar et al. (1997), ^{25–27}Huszar et al. (1998), ^{28–37}Huszar et al. (2000), ^{38–39}Marinho et al. (2002), ⁴⁰Melo et al. (2007), ⁴¹dos Santos et al. (1998), ⁴²Silva et al. (2005), ^{43–44}Soares et al. (2007), ^{45–46}Soares et al. (2009b), ⁴⁷Soares et al. (2009a), ⁴⁸Souza et al. (2008)

We analyzed a dataset on cyanobacterial dominance in Brazilian freshwater systems, aiming to evaluate environmental factors related to the periods of dominance and co-dominance of the main cyanobacteria. Our analysis revealed that *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* and *Microcystis* were the most prevalent cyanobacterial genera in the pelagic environment, which is in agreement with other findings outside Brazil (Codd et al., 2005; Hoeger et al., 2004) and in this country (Huszar & Silva, 1999). Although the three genera share important adaptive strategies such as aerotopes, large size, and ability to produce toxins, our results suggest that these three most common genera have different environmental preferences that affect their occurrence and dominance. The high

incidence of these organisms in reservoirs indicates that these systems provide appropriate conditions for the occurrence and maintenance of cyanobacterial dominance, especially because most of the reservoirs are located in or receive water from densely populated areas (dos Santos & Calijuri, 1998; Beyruth, 2000; Fonseca & Bicudo, 2008; Gemelgo & Mucci, 2009; Soares et al., 2009a). High input of nutrients, increase in retention time and elevated temperatures during the whole year may favor dense cyanobacterial populations in these systems.

Problems in dealing with a variety of data generated by various sources are mainly methodological: first, many studies were excluded from our analysis because they quantified phytoplankton samples using other methods than a counting chamber and inverted microscopy (Utermöhl, 1958), which is well suited for assessment of wide differences in cell type and is widely accepted as one of the most reliable methods for phytoplankton enumeration (Chorus & Bartram, 1999). Second, most of the studies analyzed surface samples, but none of them mentioned the presence of scums. Sampling these dense concentrations of cells may drastically affect estimates of the maximum biovolume. For example, in 2008, the Dutch lake De Gouden Ham had a surface scum with a total chlorophyll-a concentration of $73,000 \mu\text{g l}^{-1}$, while simultaneously the water had chlorophyll-a concentrations between 62 and $110 \mu\text{g l}^{-1}$ (Lürling & van Oosterhout, 2012). Since chlorophyll-a comprises on average 2% of the cell dry weight on average (Reynolds, 2006), the estimated biovolume of that scum was around $3,650 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$. This value is very close to the maximum biomass value observed in our dataset of $3,868 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$, for dominance of *Microcystis panniformis*, “great biomass that had been recorded at the surface” (Crossetti & Bicudo, 2008), which suggests the presence of a surface scum. Finally, the spatial distribution is unequal, with most studies concentrated on the Brazilian coast. This is because, traditionally, higher number of Universities and Research Centers are concentrated in this region. Although we cannot assume that cyanobacterial occurrence and dominance are less common in inland northern and central Brazil, a higher incidence of potentially toxic cyanobacteria was previously recorded along the coast, which is the most populated region of the country and its water bodies are subject to eutrophication (Moss & Moss, 2005).

Because of the large variation in biomass and systems analyzed in our dataset, we decided not to characterize the periods of dominance as blooms. Many aspects have been discussed in the literature (Smayda, 1997; Oliver & Ganf, 2000; Reynolds, 2006; Leão et al., 2009), but a universal concept applicable to different systems and conditions is difficult to find. The fact that only a few authors of the papers that we analyzed mentioned the word “bloom” to characterize the periods of cyanobacterial dominance indicates the lack of a clear definition. Smayda (1997) presented an interesting discussion on what is a bloom, with special attention to the numerical aspect of harmful blooms. Cyanobacterial blooms are often events where organisms were able to proliferate into dense populations that even could accumulate at the surface of water bodies. However, it should be noted that accumulation of high biomass can also occur in water bodies (even oligo-mesotrophic systems) with a relatively low cyanobacterial concentration when these are no longer dispersed through the entire water column, but concentrated at one shore; and in an opposite situation, where high biomass might be distributed along the water column, but with the absence of surface accumulation or scum. Consequently, the presence of scums will mainly depend on the environmental factors such as physical structure of the water column, wind, and turbulence. In our dataset, maximum biovolume ($>100 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$) was related to dominance and co-dominance of *Microcystis*, which is well known to form scums, and dominate in stratified (Soares et al., 2009a) and mixed (Huszar et al., 2000; Crossetti & Bicudo, 2008) conditions. Unfortunately, the manuscripts do not inform the presence (or absence) of scums and do not allow us to form generalizations regarding the visual appearance of scum and its relationship to environmental conditions. The inclusion of a few comments on the general aspects of this period of dominance would help to clarify this issue.

In northern temperate water bodies, peaks of cyanobacterial biomass are usually observed during the summer and autumn periods (Reynolds & Petersen, 2000). However, in Mediterranean region, eutrophic and hypereutrophic conditions may favor long-lasting or even continuous cyanobacterial dominance throughout the year (Moustaka-Gouni et al., 2007). Although we observed peaks of biovolume especially during warmer periods, long-term or perennial

cyanobacterial dominance occurred mainly in highly eutrophic reservoirs in the northeast (Bouvy et al., 1999; Huszar et al., 2000) or southeast (Crossetti & Bicudo, 2008; Soares et al., 2009a). These conditions were related to dominance of *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. Periods of dominance of *Dolichospermum* were found in the lower latitudes of Brazil. In this region, maximum biomass occurred during summer months, confirming the higher dependence of this cyanobacterium on the increase in temperature (Li & Watanabe, 2001; Giordanino et al., 2011).

Buoyant cyanobacteria are known to benefit from the intensified and prolonged thermal stratification (Huisman et al., 2005). Stratification favored *Dolichospermum* and *Microcystis* dominance, which is fully in line with the literature (Wagner & Adrian, 2009; Naselli-Flores & Barone, 2003; Huber et al., 2012). However, we also observed many cases of cyanobacterial dominance during mixing of the water column. These were mostly cases with *Cylindrospermopsis* in systems with annual mixing. *Cylindrospermopsis* is considered to be well adapted to both stratified (Berger et al., 2006) and mixing periods (Burford et al., 2006) and periods of dominance are commonly reported in mixed conditions, which underpins the wide tolerance of *Cylindrospermopsis* for mixing (Bonilla et al., 2012).

Periods of cyanobacterial dominance occurred in a wide range of nutrient concentrations, but preferably in eutrophic conditions. Maximum values of phosphorus were not necessarily related to maximum values of biovolume. Maximum phosphorus concentrations were observed in reservoirs dominated by *Cylindrospermopsis* (Chapéu, Algodões, Ingazeiras, Mundaú). Furthermore N_2 -fixing cyanobacteria (mainly *Cylindrospermopsis*) were dominant in systems with higher nitrogen content, indicating nitrogen fixation is not the mechanism that provide advantage to the cyanobacteria in these systems (Huszar et al., 2000; Burford et al., 2006).

Although the three main genera were able to reach high biomass levels individually (Bouvy et al., 1999; Becker et al., 2008; Soares et al., 2009a), different abilities to form dominance and co-dominance were observed. Curiously, the number of co-dominance events of Chroococales and Nostocales was almost the same as the individual occurrence of the main genera from these two groups. This co-dominance is especially marked for *Cylindrospermopsis*, which

co-occurred with different cyanobacteria in many systems. The monospecific dominance of *C. raciborskii* was previously described in the functional groups approach proposed by Reynolds et al. (2002). However, in a recent approach—morphology based functional groups (Kruk et al., 2010), *Cylindrospermopsis* and *Dolichospermum* were placed in the same group III, composed by filaments with aerotopes and that share similar features such as big size, N_2 -fixing ability and potential toxicity. In our dataset, *Cylindrospermopsis* was also commonly forming co-dominance with Oscillatoriales such as *Lyngbya*, *Planktolynghya* and *Planktothrix* that are also shade-tolerant, implying that they can succeed in turbid, eutrophic systems (Kokocinski & Soininen, 2012; Bonilla et al., 2012). *Cylindrospermopsis* combines a wide tolerance to key environmental factors with a high degree of plasticity that could explain its current broad distribution, and suggest the likelihood of more widespread dominance under predicted climate-change scenarios (Bonilla et al., 2012). Individual dominance of Oscillatoriales occurred in few periods, with values of biovolume below $20 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ (Huszar & Reynolds, 1997; Alves-de-Souza et al., 2006; Melo et al., 2007; Soares et al., 2009b), and, curiously, during the dry-cold season (Alves-de-Souza et al., 2006; Melo et al., 2007; Souza et al., 2008; Soares et al., 2009b). *Microcystis* formed co-dominance with other species of the same genus or with *Sphaerocolum*. Furthermore, high tolerance to high insolation and tolerance to stratified conditions (Reynolds et al., 2002) corroborate the main dominance of this genus during summer months, when most of the deep systems are stratified. However, Marinho & Huszar (2002) also observed high biomass of *Microcystis* in a continuously mixed shallow lake, but with daily periods of stratification.

In conclusion, our dataset shows that cyanobacteria dominance occurs in a wide variety of environmental conditions, and interactions between organisms and their habitats lead to different outcomes in the population structure and dynamics. Although the three main genera (*Microcystis*, *Cylindrospermopsis* and *Dolichospermum*) share common features, a spatial and temporal mosaic of periods of dominance was observed along the country. Moreover, physiological differences will change the mechanisms of interactions between species. The understanding of these processes and their relationship to environmental

conditions will promote better understanding of cyanobacterial dominance and increase our ability to predict and manage these events.

Acknowledgments This study was conducted under the auspices of the CAPES (Brasil)/Wageningen University (The Netherlands) CAPES-WUR project 004/2008. We thank Felipe Pacheco for his help with the map. MCS Soares is grateful to the National Council of Research and Development (CNPq) (471093/2010-6) and the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ02684/10). VLM Huszar is partially supported by CNPq (307727/2009-2). We also thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions.

References

- Alves-de-Souza, C., M. Menezes & V. Huszar, 2006. Phytoplankton composition and functional groups in a tropical humid coastal lagoon, Brazil. *Acta Botanica Brasiliica* 20: 701–708.
- Becker, V., V. L. M. Huszar, L. Naselli-Flores & J. Padišák, 2008. Phytoplankton equilibrium phases during thermal stratification in a deep subtropical reservoir. *Freshwater Biology* 53: 952–963.
- Berger, C., N. Ba, M. Gugger, M. Bouvy, F. Rusconi, A. Couté, M. Trousselier & C. Bernard, 2006. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiology Ecology* 57: 355–366.
- Beyruth, Z., 2000. Periodic disturbances, trophic gradient and phytoplankton characteristics related to cyanobacterial growth in Guarapiranga Reservoir. *Hydrobiologia* 424: 51–65.
- Bonilla, S., L. Aubriot, M. C. S. Soares, M. González-Piana, A. Fabre, V. L. M. Huszar, M. Lürling, D. Antoniadis, J. Padišák & C. Kruk, 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* 79: 594–607.
- Borges, P. A. F., S. Train & L. C. Rodrigues, 2008. Spatial and temporal variation of phytoplankton in two subtropical Brazilian reservoirs. *Hydrobiologia* 607: 63–74.
- Bouvy, M., R. Molica, S. de Oliveira, M. M. Marinho & B. Beker, 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 285–297.
- Bovo-Scomparin, V. M. & S. Train, 2008. Long-term variability of the phytoplankton community in an isolated floodplain lake of the Ivinhema River State Park, Brazil. *Hydrobiologia* 610: 331–344.
- Burford, M. A., K. L. McNeale & F. J. McKenzie-Smith, 2006. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Freshwater Biology* 51: 2143–2153.
- Cayelan, C. C., B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton & J. D. Brookes, 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research* 46: 1394–1407.
- Chorus, I. & J. Bartram, 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, UK.
- Codd, G. A., L. F. Morrison & J. S. Metcalf, 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264–272.
- Crossetti, L. O. & C. E. M. Bicudo, 2008. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. *Hydrobiologia* 614: 91–105.
- Dantas, E. W., A. d. N. Moura, M. d. C. Bittencourt-Oliveira, J. D. d. T. A. Neto & A. d. D. Cavalcanti, 2008. Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brazil. *Acta Botanica Brasiliica* 22: 970–982.
- Dittman, E. & C. Wiegand, 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 7–17.
- dos Santos, A. & M. C. Calijuri, 1998. Survival strategies of some species of the phytoplankton community in the Barra Bonita Reservoir (São Paulo). *Hydrobiologia* 367: 139–152.
- Figueredo, C. C. & A. Giani, 2009. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia* 39: 264–272.
- Fonseca, B. M. & C. E. M. Bicudo, 2008. Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brazil). *Hydrobiologia* 600: 267–282.
- Gemelho, M. C. P. & J. L. N. Mucci, 2009. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in Brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, São Paulo). *Brazilian Journal of Biology* 69: 1001–1013.
- Giordanino, M. V., S. M. Strauch, V. E. Villafane & H. E. W., 2011. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 103: 68–77.
- Hoeger, S. J., G. Shaw, B. C. Hitzfeld & D. R. Dietrich, 2004. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatments plants. *Toxicon* 43: 639–649.
- Huber, V., C. Wagner, D. Gerten & R. Adrian, 2012. To bloom or not to bloom: contrasting responses of cyanobacteria to recent heat waves explained by critical thresholds of abiotic drivers. *Oecologia* 169: 245–256.
- Huisman, J., H. C. P. Matthijs & P. M. Visser, 2005. *Harmful Cyanobacteria*. Springer, Netherlands.
- Huszar, V. L. M. & C. S. Reynolds, 1997. Phytoplankton periodicity and sequences of dominance in an Amazonian floodplain lake (Lago Batata, Pará, Brazil): responses to gradual environmental change. *Hydrobiologia* 346: 169–181.
- Huszar, V. L. M. & L. H. S. Silva, 1999. A estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos. *Limnologia* 2: 1–21.
- Huszar, V. L. M., L. H. S. Silva, P. Domingos, M. Marinho & S. Melo, 1998. Phytoplankton species composition is more sensitive than OECD criteria to the trophic status of three Brazilian tropical lakes. *Hydrobiologia* 369(370): 59–71.
- Huszar, V. L. M., L. H. S. Silva, M. M. Marinho, P. Domingos & C. Sant'Anna, 2000. Cyanoprokaryote assemblages in

- eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424: 67–77.
- Kokocinski, M. & J. Soininen, 2012. Environmental factors related to the occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) at the north-eastern limit of its geographical range. *European Journal of Phycology* 47: 12–21.
- Kruk, C., V. L. M. Huszar, E. T. H. M. Peeters, S. Bonilla, L. Costa, M. Lüring, C. S. Reynolds & M. Scheffer, 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55: 614–627.
- Leão, P. N., M. T. S. D. Vasconcelos & V. M. Vasconcelos, 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 271–282.
- Leps, J. & P. Smilauer, 1999. Multivariate analysis of ecological data. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia.
- Li, R. & M. M. Watanabe, 2001. Physiological properties of planktic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) and their taxonomic value at species level. *Archiv für Hydrobiologie* 103: 31–45.
- Lüring, M. & F. van Oosterhout, 2012. Case study on the efficacy of a lanthanum-enriched clay (Phoslock[®]) in controlling eutrophication in Lake Het Groene Eiland (The Netherlands). *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-012-1141-x.
- Marinho, M. M. & V. L. M. Huszar, 2002. Nutrient availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southeastern Brazil). *Archiv für Hydrobiologie* 153: 443–468.
- Melo, S., R. L. Bozelli & F. A. Esteves, 2007. Temporal and spatial fluctuations of phytoplankton in a tropical coastal lagoon, southeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 475–783.
- Moss, G. & M. Moss, 2005. *Brasil das águas: revelando o azul do verde e amarelo*. Editora Super Nova, Florianópolis: 158 pp.
- Moss, B., S. Kosten, M. Meerhoff, R. W. Battarbee, E. Jeppesen, N. Mazzeo, K. Havens, G. Lacerot, Z. Liu, L. Meester, H. Paerl & M. Scheffer, 2011. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters* 1: 101–105.
- Moustaka-Gouni, M., E. Vardaka & E. Tryfon, 2007. Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady state dominance of *Limnithrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 575: 129–140.
- Naselli-Flores, L. & R. Barone, 2003. Steady-state assemblages in a Mediterranean hypertrophic reservoir. The role of *Microcystis* ecomorphological variability in maintaining an apparent equilibrium. *Hydrobiologia* 502: 133–143.
- O'Neil, J. M., T. W. Davis, M. A. Burford & C. J. Gobler, 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313–334.
- Oliver, R. L. & G. G. Ganf, 2000. Freshwater blooms. In Whitton, B. A. & M. Potts (eds), *The Ecology of Cyanobacteria – The Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 149–194.
- Paerl, H. W. & J. Huisman, 2008. Blooms like it hot. *Science* 320: 57–58.
- Reynolds, C. S., 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 535 pp.
- Reynolds, C. S. & A. C. Petersen, 2000. The distribution of planktonic cyanobacteria in Irish lakes in relation to their trophic state. *Hydrobiologia* 424: 91–99.
- Reynolds, C. S., R. L. Oliver & A. E. Walsby, 1987. Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 379–390.
- Reynolds, C. S., V. L. M. Huszar, C. Kruk, L. Naselli-Flores & S. Melo, 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24: 417–428.
- Silva, C. M., S. Train & L. C. Rodrigues, 2005. Phytoplankton assemblages in a Brazilian subtropical cascading reservoir system. *Hydrobiologia* 537: 99–109.
- Smayda, T. J., 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography* 42: 1132–1136.
- Soares, M. C. S., V. L. M. Huszar & F. Roland, 2007. Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). *River Research and Application* 23: 698–714.
- Soares, M. C. S., M. I. A. Rocha, M. M. Marinho, S. M. F. O. Azevedo, C. W. C. Branco & V. L. M. Huszar, 2009a. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 137–149.
- Soares, M. C. S., L. O. Vidal, F. Roland & V. L. M. Huszar, 2009b. Cyanobacterial equilibrium phases in a small tropical impoundment. *Journal of Plankton Research* 31: 1331–1338.
- Souza, M. B. G., C. F. A. Barros, F. Barbosa, E. Hajnal & J. Padisak, 2008. Role of *atelomixis* in replacement of phytoplankton assemblages in Dom Helvécio Lake, South-East Brazil. *Hydrobiologia* 607: 211–224.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitteilungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 9: 1–38.
- Wagner, C. & R. Adrian, 2009. Cyanobacteria dominance: quantifying the effect of climate change. *Limnology and Oceanography* 54: 2460–2468.
- Walsby, A. E., 1994. Gas vesicles. *Microbiological Reviews* 58: 94–144.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <http://www.researchgate.net/publication/282873184>

Trans generational effects of the neurotoxin BMAA on the aquatic grazer *Daphnia magna*

ARTICLE in AQUATIC TOXICOLOGY (AMSTERDAM, NETHERLANDS) · OCTOBER 2015

Impact Factor: 3.45 · DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.09.018

READS

38

4 AUTHORS:



[Elisabeth J Faassen](#)

Wageningen University

20 PUBLICATIONS 328 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[María García Altares](#)

Leibniz Institute for Natural Product Resear...

6 PUBLICATIONS 20 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Mariana Mendes e Mello](#)

Federal University of Juiz de Fora

3 PUBLICATIONS 20 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

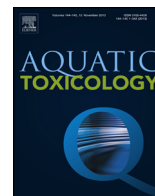


[Miquel Lurling](#)

Wageningen University

129 PUBLICATIONS 2,463 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Trans generational effects of the neurotoxin BMAA on the aquatic grazer *Daphnia magna*



Elisabeth J. Faassen^{a,*}, María García-Altres^{a,1}, Mariana Mendes e Mello^{a,b}, Miquel Lürling^{a,c}

^a Wageningen University, P.O. Box 47, Wageningen, 6700 DD, The Netherlands

^b Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

^c NIOO-KNAW, Droevendaalsesteeg 10, Wageningen, 6708 PB, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2014

Received in revised form 13 August 2015

Accepted 29 September 2015

Available online 9 October 2015

Keywords:

β -N-Methylamino-L-alanine

Daphnia magna

Fitness

Maternal effects

Adaptation

Life history

ABSTRACT

β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) is a neurotoxin that is suspected to play a role in the neurological diseases amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. BMAA has been detected in phytoplankton and globally, the main exposure routes for humans to BMAA are through direct contact with phytoplankton-infested waters and consumption of BMAA-contaminated fish and invertebrates. As BMAA can be transferred from mothers to offspring in mammals, BMAA exposure is expected to have transgenerational effects. The aim of our study was to determine whether maternal exposure to BMAA affects offspring fitness in zooplankton. We performed a multigenerational life history experiment and a multigenerational uptake experiment with the water flea *Daphnia magna* as a model species. In both experiments, offspring from nonexposed and exposed mothers were raised in clean and BMAA-containing medium. Direct exposure to 110 μ g/l BMAA reduced survival, somatic growth, reproduction and population growth. Maternal exposure did not affect *D. magna* fitness: animals from exposed mothers that were raised in clean medium had a higher mortality and produced lighter neonates than the controls, but this did not result in lower population growth rates. No evidence of adaptation was found. Instead, multigeneration exposure to BMAA had a negative effect: animals that were exposed during two generations had a lower brood viability and neonate weight than animals born from unexposed mothers, but raised in BMAA-containing medium. Maternal transfer of BMAA was observed, but BMAA concentrations in neonates raised in BMAA containing medium were similar for animals born from exposed and unexposed mothers. Our results indicate that zooplankton might be an important vector for the transfer of BMAA along the pelagic food chain, but whether BMAA plays a role in preventing zooplankton from controlling cyanobacterial blooms needs further investigation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The neurotoxin β -Nt-alanine (BMAA) is suspected to play a role in the neurological diseases amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease (Bradley and Mash, 2009; Chiu et al., 2011; Pablo et al., 2009; Spencer et al., 1987). BMAA was discovered on the island of Guam in seeds of the cycad

Cycas micronesica (Vega and Bell, 1967), which were used as food by the native Chamorro people (Whiting, 1963). Since there was a long latency period between exposure and onset of the disease, BMAA was considered to be a slow toxin (Spencer et al., 1991). It was suggested that this latency period was caused by the presence of a 'toxic reservoir', in which BMAA was stored in a protein-associated form and was slowly released in its free form (Murch et al., 2004). Recent studies indeed indicate that BMAA can either associate with, or be incorporated into proteins (Dunlop et al., 2013; Glover et al., 2014; Karlsson et al., 2014; Okle et al., 2013), although this association might in some cases be superficial (Van Onselen et al., 2015). BMAA can be maternally transferred as shown for mice, either directly (Karlsson et al., 2009) or through milk during lactation (Andersson et al., 2013). If BMAA can reside inside the body for a longer period of time and can be transferred to offspring, it is likely that BMAA

* Corresponding author.

E-mail addresses: els.faassen@wur.nl (E.J. Faassen), maria.garciaaltres.perez@gmail.com (M. García-Altres), mmello.mariana@gmail.com (M. Mendes e Mello), miquel.lurling@wur.nl (M. Lürling).

¹ Current address: Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute (HKI) Beutenbergstraße 11/a, 07745 Jena 03641, Germany.

exposure can have transgenerational effects. However, the effect of maternal exposure on offspring fitness has not been studied yet.

Globally, the main human exposure routes to BMAA are via the aquatic ecosystem, like through direct contact with phytoplankton-infested waters and consumption of BMAA-contaminated fish, shellfish and other invertebrates (Faassen, 2014). BMAA has been detected in natural phytoplankton communities (e.g., Faassen et al. (2009); Jonasson et al. (2010)) and in laboratory-cultured cyanobacterial and diatom isolates (Jiang et al., 2014; Spáčil et al., 2010). Although reported values vary widely, BMAA concentrations in phytoplankton (when present) are expected to lie in the ng/g dry weight (DW) to low µg/g DW range (Faassen, 2014). In addition, BMAA has been found in animals used for human consumption, such as crabs, oysters, mussels and fish (e.g., Christensen et al. (2012); Jonasson et al. (2010); Lampinen Salomonsson et al. (2013)), in concentrations similar to those for phytoplankton (Faassen, 2014).

To test whether transgenerational effects of BMAA exposure occur, animals with short generation times can best be used. The water flea *Daphnia magna* reproduces fast and asexually, and is easy to culture. Moreover, *D. magna* is naturally exposed to BMAA, as it can feed on BMAA-containing phytoplankton species such as cyanobacteria and diatoms. It may therefore be a vector for BMAA transport along the pelagic food chain, and as such contribute to human BMAA exposure through fish consumption. Indeed, BMAA has been found in natural zooplankton populations at concentrations below 0.1 µg/g DW (Jonasson et al., 2010) and in experimentally exposed zooplankton (Lürling et al., 2011). Finally, herbivorous zooplankton species, such as *D. magna*, play an important ecological role in freshwater systems. Under favourable circumstances, like low predation pressure, they can control phytoplankton abundance and contribute to a clear water system (Sommer et al., 2012). They transfer energy from primary producers to higher trophic levels and are therefore key species in many aquatic food chains (Sommer et al., 2012). Changes in *Daphnia* fitness may therefore result in altered phytoplankton composition and abundance, as well as in food web changes.

BMAA in dissolved form is not acutely lethal to *D. magna*, but exposure to concentrations of 10–100 µg/l increased size at first reproduction and decreased population growth rate in a previous study (Lürling et al., 2011). Moreover, BMAA was detected in offspring from exposed *D. magna* mothers (Lürling et al., 2011). We therefore expect that BMAA exposure of *D. magna* mothers might affect their offspring's fitness. As shown for the cyanobacterial toxin microcystin-LR, such transgenerational effects can both increase and decrease offspring fitness. In one study, cyanobacterial extracts and microcystin-LR reduced survival and delayed maturity in offspring from exposed mothers (Dao et al., 2010). However, in some cases *Daphnia* can adapt to cyanobacterial exposure, as shown in another study (Lemaire et al., 2012). In case adaptation occurs, offspring from exposed mothers can have an increased fitness when exposed to cyanobacteria compared to offspring from unexposed mothers (Gustafsson et al., 2005). This increased fitness might be caused by microcystin-LR-induced maternal transfer of detoxification enzyme activation, which results in higher offspring survival under exposed conditions (Ortiz-Rodríguez et al., 2012). As shown for *D. carinata*, this maternally transferred inducible tolerance is clone-specific, and could come at the expense of reduced fitness under unexposed conditions (Jiang et al., 2013).

Current toxicological studies focus on direct effects of BMAA exposure. Given the expected transgenerational effects of BMAA exposure, multi-generation studies are also needed. The aim of our study is to determine whether maternal exposure to BMAA affects offspring fitness in *D. magna*, a key species in aquatic systems that has the potential to transfer BMAA from phytoplankton to human food. We hypothesize that maternal exposure to BMAA negatively

affects their offspring's population growth rates and that *D. magna* does not adapt to BMAA exposure. To test these hypotheses, we performed a life history experiment with offspring born from unexposed and exposed mothers, that were raised in either clean or BMAA containing medium. We furthermore performed an uptake experiment to see whether BMAA could be maternally transferred.

2. Methods

2.1. *Daphnia magna* maintenance and pre-culture

D. magna Straus used in our experiments were isolated from the Dutch lake Zwemlust in 1999 and maintained in the laboratory as described earlier (Lürling et al., 2011). Both experiments were performed with neonates from a new isofemale lineage (Lürling et al., 2011). The life history experiment was performed in 2010 and the BMAA uptake experiment was performed in 2015.

2.2. Life history experiment

Neonates (less than 24 h old) were placed individually in glass tubes and were either placed in clean medium ($n=12$, control treatment, C), or received medium with a BMAA concentration of ~ 110 µg/l ($n=12$, BMAA treatment, B). The first two broods of this F_0 generation animals were immediately removed from the tubes. Neonates of the third broods (generation F_1 , less than 24 h old) from different mothers were individually transferred to new glass tubes. One or two neonates of each mother were transferred to clean medium, another one or two to BMAA containing medium (Fig. 1). This resulted in the following treatments: transfer from clean medium to clean medium ($n=11$, control-control treatment, CC), from clean medium to BMAA containing medium ($n=11$, control-BMAA treatment, CB), from BMAA containing to clean medium ($n=9$, BMAA-control treatment, BC) and from BMAA containing to BMAA containing medium ($n=10$, BMAA-BMAA treatment, BB). These F_1 animals were kept until they produced their third brood, all broods (the F_2 generation) were immediately removed from the tubes. Survival, somatic growth, reproduction and population growth of the F_1 generation, and presence of BMAA in the animals from the F_1 and F_2 generation were endpoints for this experiment.

All glass tubes used in this experiment contained 100 ml of RT medium (Tollrian, 1993) and the green algae *Scenedesmus obliquus* SAG 276/3a at ~ 5 mg C/l. In the treatments where animals were exposed to BMAA, BMAA (L-BMAA hydrochloride, Sigma-Aldrich) was added to the medium at a nominal concentration of ~ 110 µg/l. BMAA stocks were prepared weekly, and the nominal concentration in the medium ranged between 104 and 117 µg/l due to different stock concentrations. F_0 animals were transferred to new tubes with clean medium, food and BMAA (if appropriate) every two days, F_1 animals were transferred daily. The experiment was performed at 22 °C and in a light-dark regime of 18–6 h at 7.4 µmol photons/m² s in an incubator (Gallenkamp) without shaking.

Every two days (F_0 animals), and nearly every day (F_1 animals), survival, number of living and dead neonates and body length were recorded. Body length was measured under a dissection microscope and was defined as the distance from the most posterior point on the eye to the base of the junction of the tail spine of the carapace. After animals were removed from the experiment (neonates immediately after they were born, adults at the end of the experiment), they were thoroughly rinsed and placed in clean medium for a few hours. Animals were subsequently placed in small aluminium cups for dry weight determination. All adults were pooled per treatment. For neonates from F_0 adults, 3–4 broods per treatment (all belonging to the same brood number) were combined. The neonates from F_1 adults were pooled per brood. The animals

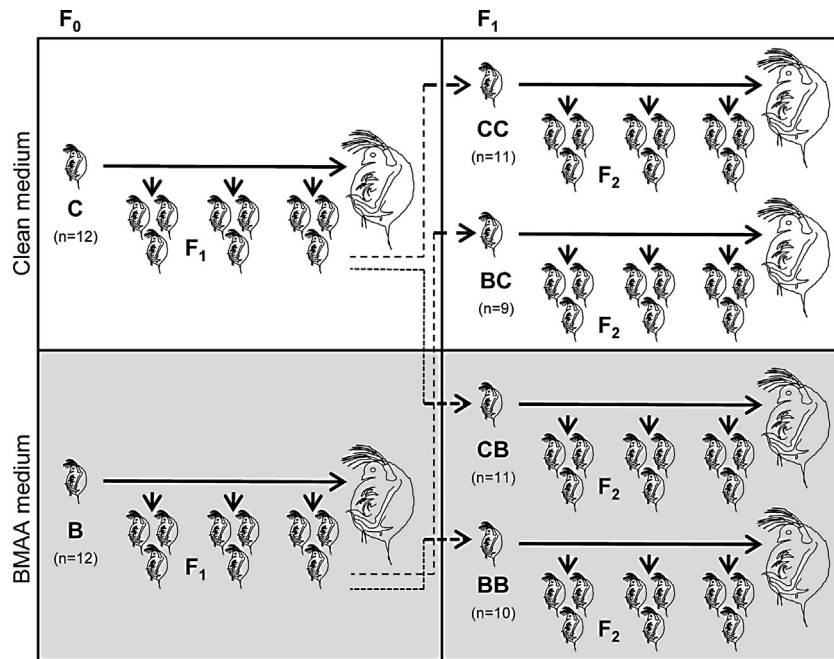


Fig. 1. Setup of the life history experiment.

were dried overnight at 50 °C before weighing on a MC5 microbalance (Sartorius). At the start of the experiment, body length and dry weight of 24 F_0 neonates that were not used in the experiment were determined as a representative of $t = 0$.

2.3. BMAA uptake experiment

The setup of the BMAA uptake experiment was similar to that of the life history experiment, except that the animals were not kept individually, but with 20 individuals in one jar to obtain enough biomass for the BMAA analysis. Twenty neonates (less than 24 h old) were placed in glass jars and were either placed in clean medium ($n = 3$, control treatment, c), or received medium with a nominal BMAA concentration of 78 $\mu\text{g/l}$ ($n = 3$, BMAA treatment, b). The animals were fed daily, and the first two broods of this F_0 generation animals were immediately removed from the jars, as were the dead animals. When the eggs from the third brood of the F_0 animals were deposited in the brood sac, the F_1 mothers were transferred to the new exposure conditions. Half of these animals were transferred to clean medium, the other half to BMAA-containing medium. This resulted in similar treatments as in the life history experiment: control–control treatment (cc), control–BMAA treatment (cb), BMAA–control treatment (bc) and BMAA–BMAA treatment (bb, all $n = 3$). After half of the F_0 mothers had produced their third brood, 20 F_1 neonates were randomly selected and were used for the second part of the experiment. The other neonates (F_1) and the adults (F_0) were removed from the jars. In the second part of the experiment, the 20 selected F_1 neonates were kept in the treatment in which they were born, until they produced their third brood. All broods (F_2) were immediately removed from the jars. Survival, total number of offspring, brood mortality and concentration of BMAA in the animals were endpoints for this experiment.

All glass jars used in this experiment contained 800 ml of RT medium. Animals were transferred to new jars with medium and BMAA (if appropriate) at each pregnancy and after giving birth. The medium of the jars in which the animals were kept up to their first pregnancy was refreshed every three days. The animals were fed with *S. obliquus* SAG 276/3a, an amount corresponding to a food

concentration of ~ 5 mg C/l was added daily. The experiment was performed in the dark at 20 °C in an incubator without shaking.

Every day, survival and number of living and dead neonates were recorded. After living animals were removed from the experiment, they were thoroughly rinsed and placed in a beaker containing 100 ml of clean medium with ~ 5 mg C/l of *S. obliquus* for three hours. After these three hours, they were rinsed again and stored at -20 °C in eppendorf tubes. Animals were pooled per replicate and brood: for each jar, the adults were pooled, as were the first broods, the second broods and the third broods.

2.4. BMAA analysis

The dried *D. magna* samples from the life history experiment were removed from the aluminium cups and were prepared and analysed for BMAA by LC–MS/MS as in Lürding et al. (2011). In short, dried samples were hydrolysed in 6N HCl vapor for 20 h at 105 °C in a hydrolysis workstation (Eldex). After drying, these samples were reconstituted in 300 μL acetonitrile/water/formic acid (v/v 65:35:0.1) and transferred to a vial for analysis. Analysis was performed on an Agilent 1200 LC and 6410 MS/MS. These analyses were performed before we developed our method with internal standard (Faassen et al., 2012) and the BMAA content of the samples from the life history experiment could therefore not be quantified. BMAA concentrations in the medium were not determined, as medium was refreshed daily and BMAA was expected to be stable from previous test results.

Daphnia samples from the uptake experiment were analysed according to Faassen et al. (2012) with slight modifications. Before analysis, samples from the uptake experiment were lyophilized and homogenized with a plastic stick. Depending on the available amount of sample material, 0.2 up to 1.1 mg (less than 0.2 mg for some brood samples) was transferred to a small glass tube and 40 μl of a 2 mg/l D_3 BMAA (D_3 BMAA hydrochloride, Novakits) solution in 20 mM HCl was added. After the samples were dried under vacuum, 30 μl 6N HCl was added to each sample and after flushing with nitrogen gas, liquid hydrolysis was performed for 17.5 h under vacuum in a hydrolysis workstation at 105 °C. After hydrolysis, samples were dried under vacuum and reconstituted in 1 ml of

acetonitrile/water/formic acid (v/v 67:33:0.1) and filtered in a tube with a 0.2 μm cellulose acetate filter (Grace Davison Discovery Science) for 5 min at $16,000 \times g$. The filtrate was transferred to a vial, stored at 4°C and analysed by LC–MS/MS within two weeks.

The medium from the uptake experiment was regularly sampled. These samples were filtered over a 0.2 μm cellulose acetate filter for 5 min at $16,000 \times g$. 300 μl of the filtrate was transferred to a vial and 600 μl of acetonitrile with 0.15% formic acid (v:v) was added. The samples were stored at 4°C awaiting analysis.

LC–MS/MS analysis was performed according to Faassen et al. (2012) with slight modifications. Separation was performed on a Agilent 1260 LC, with a 2.1×150 mm, 5 μm ZIC–HILIC column (SeQuant, Sweden). Column temperature was 40°C , injection volume 5 μl and flowrate 0.4 ml/min. The mobile phase consisted of acetonitrile with 0.1 % formic acid (v/v, eluent A) and water with 0.1% formic acid (v/v, eluent B). The elution program was 0–2 min: 95% A, 4 min: 65% A, 8–17 min 55% A, 17–23 min 95% A, with linear decreases between the time steps and the first 4 and last 6 min were directed to waste. BMAA, D_3BMAA , α,γ -diaminobutyric acid (DAB, DAB dihydrochloride, Sigma) and *N*-(2-aminoethyl) glycine (AEG, TCI) were detected on an Agilent 6460 MS/MS. Nitrogen was used as drying, sheath and collision gas and source settings were: drying gas temperature 230°C , drying gas flow 12 l/min, nebulizer pressure 40 psi, sheath gas temperature 250°C , sheath gas flow 12 l/min, capillary voltage 2500 V, nozzle voltage 500 V. Fragmentor voltage was 50 V and both quadrupoles were operated in unit mode. The ESI source was operated in positive mode, and the following transitions were monitored in MRM for D_3BMAA : m/z 122.1 to 105.1 (4 V collision energy), 88.1 (8 V) and 76.2 (8 V). For BMAA, DAB and AEG, the following transitions were monitored: m/z 119.1 to 102.1 (BMAA, DAB, AEG, 4 V), 101.1 (DAB, 4 V), 88.1 (BMAA, 8 V), 76.2 (BMAA, 8 V) and 74.2 (DAB, 4 V). For D_3BMAA , the ratio between quantifier m/z 105.1 and qualifier m/z 88.1 was 27%, the ratio between m/z 105.1 and m/z 76.2 was 43%. For BMAA the ratios between quantifier m/z 102.1 and qualifiers m/z 88.1 and 76.2 were 25%. For both compounds, a relative deviation from these ratios of 20% was allowed. DAB and AEG were not quantified in this study, but only included in the analysis to exclude co-elution with BMAA. In the *Daphnia* samples, BMAA was quantified against an external calibration curve and corrected for D_3BMAA recovery. Medium samples were not spiked with D_3BMAA as there was no bias during workup and analysis (recovery 102%, SD 1.6, $n=3$), these samples were directly quantified against the BMAA calibration curve.

LOD (based on signal to noise (S/N) ratio for all three transitions of at least 3) for BMAA was an injected amount of 34 fmol, LOQ (S/N ratio of the quantifier at least 10, S/N ratio of the two qualifiers at least 3) was 84 fmol. Recovery in *D. magna* samples was 108% (SD 16, $n=72$). Retention times of BMAA, D_3BMAA (both 11.6 min) and DAB (12.5 min) were similar as in Faassen et al. (2012), no chromatograms are therefore shown in this manuscript. AEG was baseline separated from DAB at 13.8 min.

2.5. Data analysis

In the life history experiment, somatic growth was determined for each adult by fitting the equation $f=(a \times b)/(a+(b-a) \times \exp(-c \times z))$ through its body length data (z , mm) in Sigmaplot 12.0. The initial body length (a , mm) was constrained at the measured value, b (proxy for the maximum body length, mm) and c were estimated. c was used as an estimation of the maximum growth rate (1/day).

Population growth (r , 1/day) was approached as follows for the first three broods: $r \approx \ln R_0/T_c$, in which net productive rate

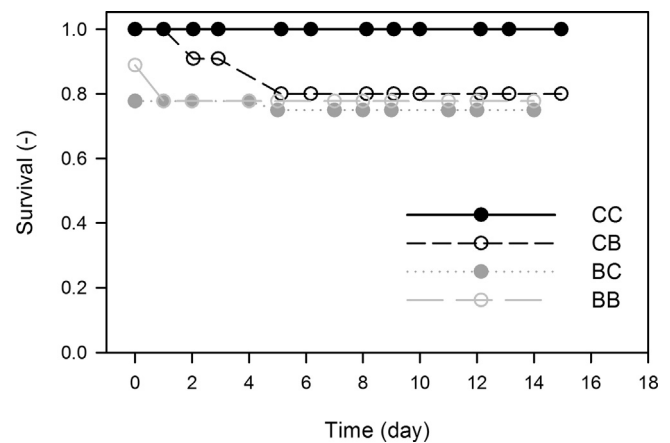


Fig. 2. Survival of *D. magna* during the F_1 life history experiment. Survival is corrected for death by handling of one animal in treatments CB, BC and BB. n varies from 11 (CC and CB) to 9 (BC).

(R_0) is defined as $R_0 = \sum_{x=0}^{\Omega} l_x \times m_x$ with l_x the probability to survive until age class x (death by handling is excluded from these calculations) and m_x the number of living offspring produced at age class x ; and cohort generation time (T_c , day) is defined as $T_c = \sum_{x=0}^{\Omega} x \times l_x \times m_x / R_0$ (Begon et al., 2006). Within treatment variability in r was estimated by the Jackknife technique (Meyer et al., 1986).

Most statistics were performed on untransformed data in Sigmaplot 12.0, except for ANCOVAs, which were performed on untransformed data in SPSS 19. ANCOVAs were used to correct for the F_1 size at birth during the life history experiment, and were only performed if the dependent variable met the criteria for normal distribution and homogeneity of variance, and if it was determined for each surviving individual.

3. Results

In this section, the results of the second part of both experiments (F_1 exposure) are discussed in the main article. Treatments from the life history experiment are indicated with uppercase abbreviations (i.e., CC, CB, BC and BB), treatments from the uptake experiment are indicated with lower case abbreviations (cc, cb, bc and bb). Life history results of the F_0 exposure for both experiments are shown in Appendices A and B.

3.1. Survival

In the life history experiment, at least 75% of the animals survived each treatment (Fig. 2). Survival was highest (100%) in the controls (CC). Survival was approximately 80% in all treatments in which animals were directly or via the F_0 generation exposed to BMAA (CB, BC and BB). When the neonates of treatment B were transferred to treatments BC and BB, 20% of the animals died within a day. After this first day of the F_1 exposure, no further treatment-related mortality occurred in treatments BC and BB. In the CB treatment, mortality only occurred in the first five days after transfer. In treatments CB, BC and BB, one animal was killed during handling, but these deaths are not included in the survival calculations.

In the uptake experiment, survival was 88% or higher in treatments cc, bc and bb. In treatment cb, however, high mortality

Table 1
Life history parameters of F_1 generation *D. magna* in the uptake experiment. F_1 animals from unexposed mothers were either kept in clean medium (cc) or exposed to BMAA (cb), F_1 animals from BMAA-exposed mothers were treated similarly (bc and bb). SD means standard deviation, homogeneous subsets are indicated with similar symbols and determined by pairwise comparison (Holm-Sidak method, significant at $p < 0.05$) when treatment effects were significant, $n = 3$ for all treatments.

			cc	cb	bc	bb	Statistical information
Survival (%)	Mean		88	48	95	91	Kruskal–Wallis ANOVA $H_3 = 7.89, p = 0.055$
	SD		5.8	31.7	0.2	6.1	
	Group		a	a	a	a	
Total neonates brood 1 ^a	Mean		92	43	145	145	One Way ANOVA $F_{3,8} = 11.25, p = 0.003$
	SD		7.2	32.7	36.3	12.2	
	Group		a,b	b	a	a	
Total neonates brood 2 ^a	Mean		155	84	307	231	One Way ANOVA $F_{3,8} = 4.07, p = 0.05$
	SD		20.8	63.7	109.0	104.2	
	Group		a	a	a	a	
Total neonates brood 3 ^a	Mean		265	111	323	309	One Way ANOVA $F_{3,8} = 5.22, p = 0.027$
	SD		46.4	53.8	120.7	45.0	
	Group		a,b	b	a	a,b	
Mortality in broods (%)	Mean		0.1	0.0	1.0	0.5	Kruskal–Wallis ANOVA $H_3 = 6.75, p = 0.080$
	SD		0.13	0.00	1.46	0.47	
	Group		a	a	a	a	

^a Only living offspring are considered.

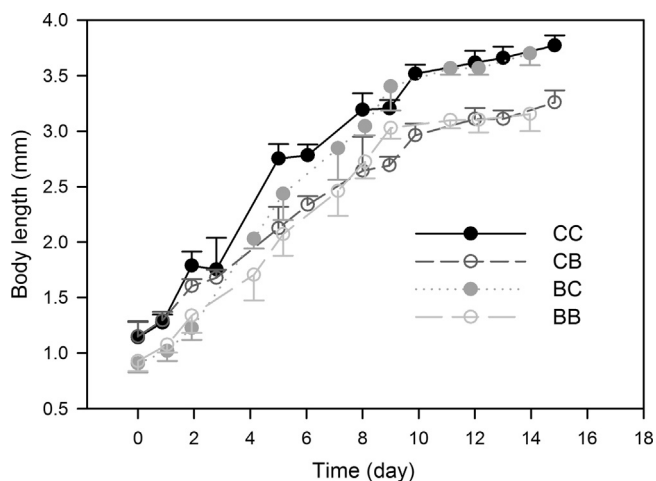


Fig. 3. Somatic growth of *D. magna* during the F_1 life history experiment. Error bars represent standard deviations, n varies between 6 (BC, end of experiment) and 11 (CC).

occurred at day three (survival percentages 75%, 55% and 15% in the separate jars, respectively) and incidental mortality occurred at subsequent days, resulting in an 48% overall survival at the end of the experiment (Table 1).

3.2. Somatic growth

Animals that were directly exposed to BMAA (treatments CB and BB) were smaller at the end of the experiment than animals raised in clean medium (CC and BC, Fig. 3). Initially, F_1 animals originating from BMAA exposed mothers (BC and BB) were smaller than those from control mothers (CC and CB, Mann–Whitney rank sum test, $U = 25.00, n_C = 22, n_B = 15, p < 0.001$). However, BC animals had a similar length at the end of the experiment as the animals that were neither directly nor indirectly exposed to BMAA (CC). Likewise, although the CB animals were initially larger than the BB animals, their final length was the same (Fig. 3, Table 2). The differences in growth rate occurred around day 4 (Fig. 3). The maximum growth rate of CB animals was lower than that of the other animals (Table 2). When corrected for size at the start of the experiment, the effects of direct F_1 exposure on final length (ANCOVA, $F_{1,29} = 138.28, p < 0.001$) and on maximum growth rate (ANCOVA, $F_{1,29} = 13.57, p = 0.001$) were still significant.

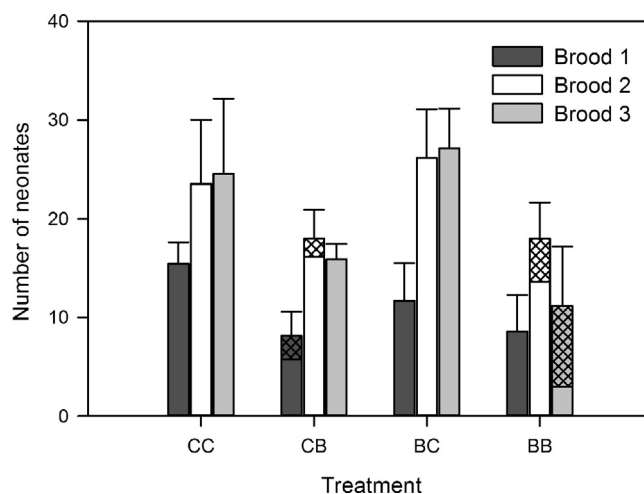


Fig. 4. Number of living (solid fill) and dead (crossed fill) neonates of *D. magna* during F_1 exposure in the life history experiment. Error bars represent the standard deviation of the total number of neonates per brood. n varies between 6 (BC and third brood BB) and 11 (CC).

3.3. Reproduction

In the life history experiment, animals raised in clean medium (treatments CC and BC) produced more living offspring (average 64, SD 12.4, $n = 17$) than animals that were raised in BMAA-containing medium (CB and BB, average 32, SD 10.7, $n = 15$, Mann–Whitney rank sum test, $U = 13.00, p < 0.001$). When corrected for size at the start of the experiment, the effect of direct F_1 exposure on the number of living neonates in brood 1 was still significant (ANCOVA, $F_{1,29} = 56.43, p < 0.001$). The number of living offspring produced was lowest in animals that were exposed to BMAA in the F_0 and F_1 generation (treatment BB, Fig. 4, Table 2). Animals that were only exposed to BMAA in the F_1 generation (treatment CB) also produced less living neonates than animals raised in clean medium, but this was only significant for the first brood. The second and third CB broods belonged both to the statistically defined subgroups of the CC and BC animals and to the subgroup of the BB animals (Table 2).

Furthermore, animals that were directly exposed to BMAA produced dead offspring. In total, 11% of the CB neonates and 32% of the BB neonates were born dead (Table 2), and in the third BB brood, the number of neonates born dead was 73% (Fig. 4).

Table 2

Life history parameters of F_1 generation *D. magna* and presence of BMAA in F_1 and F_2 generations in the life history experiment. In this experiment, F_1 animals from unexposed mothers were either kept in clean medium (CC) or exposed to BMAA (CB), F_1 animals from BMAA-exposed mothers were treated similarly (BC and BB). SD means standard deviation, homogeneous subsets are indicated with similar symbols. d. means detected, n.d. means not detected.

			CC	CB	BC	BB	Statistical information
Survival	(%)	<i>n</i>	100 11	80 11	75 9	78 10	
Final length	(mm)	Mean	3.8	3.3	3.7	3.2	One Way ANOVA
		SD	0.09	0.11	0.11	0.15	$F_{3,28} = 58.02, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comp. Holm–Sidak
		Group	a	b	a	b	significant if $p < 0.05$
Maximum growth rate	(1/day)	Mean	0.31	0.20	0.32	0.28	One Way ANOVA
		SD	0.03	0.03	0.03	0.03	$F_{3,28} = 12.76, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comp. Holm–Sidak
		Group	a	b	a	a	significant if $p < 0.05$
Time of first reproduction	(day)	Mean	8.3	8.5	7.7	8.7	Kruskal–Wallis ANOVA
		SD	0.65	0.67	0.82	0.49	$H_3 = 7.87, p = 0.049$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comparison Dunn
		Group	a	a	a	a	all comparisons $p > 0.05$
Inter-clutch duration	(day)	Mean	3.4	3.4	3.4	3.9 ^a	Kruskal–Wallis ANOVA
		SD	0.32	0.32	0.38	0.85	$H_3 = 3.72, p = 0.293$
		<i>n</i>	11	8	6	6	
		Group	a	a	a	a	
Size first brood ^b		Mean	16	6	12	9	One Way ANOVA
		SD	2.2	4.2	3.8	3.7	$F_{3,28} = 13.73, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comp. Holm–Sidak
		Group	a	b	a,c	b,c	Significant if $p < 0.05$
Size second brood ^b		Mean	24	16	26	14	Kruskal–Wallis ANOVA
		SD	6.5	7.0	4.9	8.5	$H_3 = 15.89, p = 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comparison Dunn
		Group	a	a,b	a	b	significant if $p < 0.05$
Size third brood ^b		Mean	25	16	27	3	Kruskal–Wallis ANOVA
		SD	7.6	1.6	4.0	4.0	$H_3 = 20.14, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	6	Pairwise comparison Dunn
		Group	a	a,b	a	b	Significant if $p < 0.05$
Dry weight neonates	(μg)	Mean	6.8	5.1	4.6	4.1	One Way ANOVA
		SD	2.0	1.4	1.4	1.6	$F_{3,90} = 12.66, p < 0.001$
		<i>n</i>	33	24	18	19	Pairwise comp. Holm–Sidak
		Group	a	b	b	b	Significant if $p < 0.05$
Mortality in broods	(%)	Mean	0	11	0	32	Kruskal–Wallis ANOVA
		SD	0.0	15.7	0.0	22.9	$H_3 = 18.16, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	8	6	7	Pairwise comparison Dunn
		Group	a	a,b	a	b	significant if $p < 0.05$
Population growth rate	(1/day)	Mean	0.34	0.26	0.33	0.27	One Way ANOVA
		SD	0.02	0.05	0.06	0.06	$F_{3,34} = 6.94, p < 0.001$
		<i>n</i>	11	10	8	9	Pairwise comp. Holm–Sidak
		Group	a	b	a	b	Significant if $p < 0.05$
BMAA in adults (F_1)			n.d.	d.	d.	d.	
BMAA in neonates (F_2)			n.d.	d.	d.	d.	

^a One animal only reproduced twice.

^b Only living offspring are considered.

BMAA exposure, either directly or indirectly, resulted in smaller neonates: BB neonates, for instance, weighed 40% less than CC neonates (Table 2). This effect was most pronounced in the third brood (One Way ANOVA, $F_{3,27} = 12.76, p < 0.001$, Fig. 5).

In the uptake experiment, the cb animals produced the lowest total number of living offspring (Table 1). Brood mortality (0.0–1.0%) was similar for all treatments, and was lower than in the life history experiment (Table 1).

3.4. Population growth rate

Direct BMAA exposure (treatments CB and BB) decreased the population growth rate over 20% compared to the animals raised in clean medium. This decrease was mainly caused by the small number of living offspring produced compared to the F_1 animals in clean medium. F_0 exposure to BMAA did not affect the fitness of the F_1 animals kept in clean medium (treatment BC): despite the

higher mortality of BC animals in the first five days, their population growth rate was similar to that of the CC animals (Table 2).

3.5. BMAA in animals

BMAA was detected in all samples of adults that had directly or indirectly been exposed to BMAA in the life history experiment. No BMAA was detected in the controls (CC adults and neonates). BMAA was also detected in most neonate samples of treatments CB, BC and BB (Table 2). Neonate samples in which no BMAA was detected mostly contained little biomass, due to small brood sizes and/or low neonate weight, and therefore likely dropped below the limit of detection.

In the uptake experiment, BMAA was detected in F_0 adults that had been exposed to BMAA either during the first part of their lives (bc), during the last stage of their third pregnancy and directly after giving birth to the third brood (cb) or during their whole lives (bb),

Table 3
Mean BMAA concentrations ($\mu\text{g/g DW}$) in positive samples, with standard deviations (SD) and number of positive samples (n) in the second part of the uptake experiment. F_0 adults have spent one or two days in the conditions of the second part of the experiment, only to give birth to the F_1 neonates. A part of these F_1 neonates has been removed within 24 h after birth (' F_1 neonates' in table), the other part was kept under the experimental conditions and was removed from the experiment after giving birth to three broods (' F_1 adults' in the table). F_2 neonates are the offspring of these F_1 adults and were removed within 24 h after birth. All treatments were performed in triplicate, n.d. means not detected.

	cc			cb			bc			bb		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
F_0 adults	n.d.	–	–	45.5	19.88	3	15.37	–	1	8.6	–	2
F_1 neonates	n.d.	–	–	56.2	35.18	3	n.d.	–	–	15.1	–	2
F_2 neonates brood 1	n.d.	–	–	5.6	–	1	n.d.	–	–	5.2	2.04	3
F_2 neonates brood 2	n.d.	–	–	3.5	–	1	n.d.	–	–	4.8	–	1
F_2 neonates brood 3	n.d.	–	–	4.7	–	2	n.d.	–	–	2.5	–	2
F_1 adults	n.d.	–	–	7.8	9.96	3	4.5	–	1	3.4	1.16	3

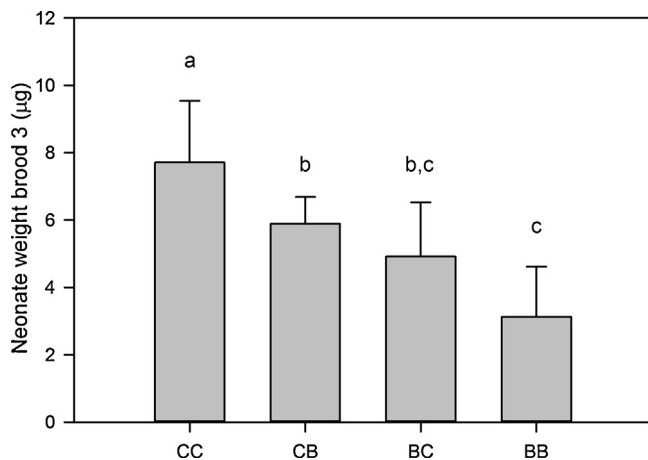


Fig. 5. Neonate dry weight of the third brood during F_1 exposure in the life history experiment. Error bars represent standard deviations, n ranges from 6 (BC and BB) to 11 (CC). Letters indicate homogeneous groups (Holm–Sidak pairwise comparison, significant at $p < 0.05$).

although not always in all three replicates (Table 3). Furthermore, most of the F_1 neonates exposed to BMAA containing medium for less than 24 h (cb and bb) contained detectable amounts of BMAA. BMAA was also found in the cb and bb F_1 adults, albeit at lower concentrations than in the F_1 neonates from the same jar (paired t -test, $t_4 = 2.85$, $p = 0.047$). No BMAA was detected in bc F_1 neonates, which were born in clean medium from BMAA-exposed mothers. However, in one of the bc jars, BMAA was found in the F_1 adults. Most F_2 neonates born in BMAA-containing medium had comparable BMAA concentrations (2.5 up to 5.6 $\mu\text{g/g DW}$). No BMAA was detected in any of the cc animals.

4. Discussion

Below, transgenerational effects of BMAA exposure on *D. magna* will be discussed. Most conclusions will be based on the outcomes of the life history experiment, as this experiment was best controlled in terms of food availability, crowding and BMAA exposure. Moreover, as the animals were followed individually, this experiment gives more information on reproductive output. The uptake experiment will mainly be used to determine uptake characteristics and to assess whether maternal transfer of BMAA occurs.

Direct chronic BMAA exposure (approximately 110 $\mu\text{g/l}$) decreased the maximum growth rate, body length, brood size, neonate weight and clutch viability of *D. magna*. Direct exposure caused a 24% reduction of population growth compared to the control animals (compare treatments CB and CC, Table 2). This is in

line with a previous 15-day exposure study, in which an exposure to 100 $\mu\text{g BMAA/l}$ also reduced population growth rate (calculated over two broods), albeit to a lesser extent (9%, Lüring et al. (2011)). However, brood mortality and reduced body length were not observed in this earlier study.

Maternal BMAA exposure seemed to have a slightly negative impact on offspring raised in clean medium (compare treatments BC and CC). BC animals had a higher mortality directly after transfer to clean medium, and produced broods with lower weight than the control animals. However, since the BC animals started to reproduce early, and produced as many living offspring as the control animals, their population growth rate was equal to that of the controls. BC neonates were born in BMAA-containing medium and spent their first hours (less than 24 h) in it before they were transferred to clean medium. As *D. magna* can take up BMAA within 24 h (Table 3, Esterhuizen-Londt et al. (2015)), effects of neonate BMAA exposure cannot be ruled out in the life history experiment.

The F_1 generation born from BMAA-exposed F_0 mothers did not adapt to BMAA exposure (compare treatments CB and BB). BB animals only performed better than CB animals in terms of maximum somatic growth rate. In contrast, multi-generation exposure negatively affected reproduction in BB animals. Although the population growth rate between CB and BB animals was the same, BB animals produced lighter neonates and had a higher brood mortality. These effects were most pronounced (and significant) for the third brood. *Daphnia* can develop an increased stress tolerance within a lifetime, and transfer this trait to its offspring (e.g., Agrawal et al. (1999); Gustafsson et al. (2005)). The duration of the experiment was therefore long enough to demonstrate such rapid adaptation, if our clone would have been able of it. Our clone had been kept in the laboratory for 12 years at the time of the life history experiment, and might therefore have lost some of its ability to deal with cyanobacterial toxins. As adaptation to changing environments is clone-specific in *Daphnia*, it is possible that other clones would react differently to multi-generational BMAA exposure. In line with adaptation to the cyanobacterial toxin microcystin, such adaptation would be expected mostly in clones exposed to BMAA containing phytoplankton (Lemaire et al., 2012).

In the uptake experiment, measured BMAA concentrations (average 27 $\mu\text{g/l}$, SD 24.4, $n = 38$) varied and were lower than the nominal concentration of 78 $\mu\text{g/l}$. This means that under the experimental conditions, BMAA was not stable for a few days. This is in contrast with a previous test, in which BMAA concentration was stable for 96 h in a jar containing RT medium but no *Daphnia* and food (20 °C, continuous light, relative SD 6.2%, $n = 12$). The fact that the animals in the uptake experiment were exposed to lower and more variable BMAA concentrations than the animals in the life history experiment (in which medium was refreshed daily), might explain the lack of effect of BMAA exposure on survival, reproduc-

tion and brood mortality in the bb animals (Table 1) compared to the BB animals (Table 2).

The effects of direct BMAA exposure were strongest in juveniles (in both experiments, most treatment related mortality occurred within the first five days and somatic growth reduction was most pronounced before the first pregnancy in BMAA exposed animals, Fig. 3) and in the number, viability and weight of the offspring (Table 2). Once animals started to reproduce, no more adult mortality occurred in the life history experiment, and somatic growth was similar between exposed and non-exposed adults (Fig. 3). BMAA was detected in the neonates of directly and indirectly exposed mothers (Table 2), also in the neonates that were born in clean medium (F_2 BC neonates, Table 2 and F_1 bc adults, Table 3). This means that BMAA was maternally transferred, and that in *D. magna* females the internal BMAA concentration is lowered through reproduction. Similarly, in mice, the internal BMAA load in mothers is reduced when BMAA is transferred to their offspring via the placenta and lactation (Andersson et al., 2013; Karlsson et al., 2009).

Unfortunately, we could not determine BMAA concentrations in the life history experiment, our semi-quantitative results were too inaccurate as was shown from mass balances of F_1 neonates and their F_2 offspring. Whether the concentrations determined in our previous *Daphnia* study, using the same method, were accurate cannot be tested (Lürling et al., 2011). The samples from the uptake experiment were analysed with our improved method, with which BMAA concentrations can accurately be determined.

BMAA was taken up by *D. magna* adults within two days, as the F_0 animals raised in clean medium but transferred to BMAA containing medium only to give birth (cb) contained BMAA (Table 3). This is in line with the rapid (within 3 h) BMAA uptake reported for this species (Esterhuizen-Londt et al., 2015). The BMAA concentration in adults born and raised in BMAA-containing medium was 7 times lower at the end of the experiment than when they were neonates, but as the animals increase about 40 times in weight during this period, this decrease is lower than is expected from dilution by growth alone, which indicates BMAA uptake during their lifetime. BMAA losses seemed to occur at a slower speed than initial uptake: some animals that had spent more than 20 (bc F_1 adults) or 14–17 days in clean medium (BC F_1 adults) still contained detectable amounts of BMAA.

At present, little is known about BMAA metabolism in vivo. In neonatal rats, in vivo protein association of BMAA has been suggested, but no BMAA was detected seven months after exposure (Karlsson et al., 2014). One study on BMAA exposed shellfish did not find evidence for BMAA catabolism, but the majority of the BMAA added to the aquaria could not be retrieved (Downing et al., 2014). Similarly, BMAA was taken up by the macrophyte *Ceratophyllum demersum*, but during depuration, free and protein associated BMAA levels in the plant decreased, while there were no indications for catabolism or excretion (Downing et al., 2015). This latter study suggests that BMAA was transformed in vivo into a form that was undetectable by the analytical methods employed.

Although it is common to either look for 'free' (in an aqueous extract) and 'protein-associated' BMAA (in the pellet created during extraction and released after acid hydrolysis), or for total BMAA (hydrolysis of the total sample), there is a possibility that BMAA is bound to small molecules in the supernatant which are not precipitated during extraction (Cheng and Banack, 2009). When only free and protein-associated BMAA are analysed, this fraction will be overlooked. We do not know in which forms BMAA was present during our experiment, as we had too little sample material to look for different forms. Instead, we chose to hydrolyse the total sample, which is the safest way of recovering all forms in which BMAA can be present. However, we performed some preliminary tests to determine the fraction in which BMAA is present in exposed *D. magna*. For this, we extracted lyophilized, BMAA exposed *D. magna*

with 0.1 N trichloroacetic acid to precipitate proteins, as in Faassen et al. (2012). The extract was subsequently dried and hydrolysed in 6N HCl as described above (Section 2.4). We found BMAA in this hydrolysed extract, and when compared to the non-hydrolysed extract and total BMAA concentrations, it appeared that approximately 20% of the BMAA was present in the non-hydrolysed extract, and that (most of) the remaining 80% was found in the hydrolysed extract. This agrees with another recent BMAA uptake study in *D. magna*, in which no protein-associated, but only free BMAA was detected after 24 h of exposure (no hydrolysed extract was analysed) (Esterhuizen-Londt et al., 2015).

Our study suggests that zooplankton can be an important vector for BMAA transport through the pelagic food chain. BMAA was present in adults and neonates both after direct BMAA exposure and after maternal exposure. This implies that after a BMAA-containing phytoplankton bloom has declined, BMAA might still be present in the zooplankton and may be transferred from them to higher aquatic organisms. Indeed, BMAA has not only been detected in natural zooplankton at concentrations below 0.1 $\mu\text{g/g}$ DW (Jonasson et al., 2010), but also in the pelagic fish species Atlantic herring (*Clupea harengus*, 0.01 $\mu\text{g/g}$ DW or lower) that feeds on plankton and is sold for human consumption (Jonasson et al., 2010).

Finally, the role of BMAA in phytoplankton is unknown. One possible explanation is that it, like many other non-protein amino acids, acts as a grazer repellent (Bell, 2003; Zenk and Juenger, 2007). As shown in this study, BMAA indeed reduced *D. magna* fitness. Our experiment, however, merely served as a proof of principle, as the dissolved BMAA concentrations were higher than expected in the field: no quantifiable dissolved BMAA concentrations have to our knowledge yet been reported for surface water. While zooplankton grazing can control phytoplankton abundance under certain conditions, cyanobacteria are generally poor food to zooplankton due to their hard-to-handle morphology, low nutritional value and the presence of toxic compounds (Sommer et al., 2012). As a consequence, cyanobacterial blooms are little constrained by zooplankton grazing. BMAA might be one of the many compounds that protect cyanobacteria from losses by grazing and that contribute to the ongoing expansion and intensification of harmful cyanobacterial blooms. The finding of BMAA in diatoms, however, questions whether BMAA indeed plays a substantial role in reducing *Daphnia* fitness in field situations: although BMAA has been found in diatoms (Jiang et al., 2014), diatoms generally do not reduce *Daphnia* fitness (Carotenuto et al., 2005; Lürling and Van Donk, 1997). Diatoms can reduce fecundity in zooplankton, mainly copepods, but these effects are mostly attributed to oxylipins (Carotenuto et al., 2005; Ianora and Miralto, 2010) and not to BMAA. An experiment comparing the fitness of *Daphnia* fed with either diatoms not containing BMAA or those containing it could therefore provide more insight in field-relevant effects of BMAA on *Daphnia*.

5. Conclusions

Direct BMAA exposure negatively affected *D. magna* fitness: it decreased survival, somatic growth, reproduction and subsequently, population growth rates. Although BMAA is maternally transferred, there was no maternal exposure effect on population growth, as neonates from exposed mothers that were raised in clean medium compensated for initial mortality and lower weight with earlier onset of reproduction. Two generation exposure reduced brood viability and neonate weight, which means that the clone used in this study did not adapt to BMAA exposure. We conclude that in our study, BMAA exposure had transgenerational effects, and that these were most pronounced in animals that were exposed to BMAA during two generations. Our results indicate that zooplankton might be an important vector for the transfer of BMAA along the pelagic food chain, but whether BMAA plays a role in pre-

venting zooplankton from controlling cyanobacterial blooms needs further investigation.

Disclosure of interest

The funding agency had no role in the design, performance or analysis of the experiment. Authors declare no other conflict of interest.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: ML, EJJ, MG-A. Performed the experiments: MG-A, MMeM, EJJ. Analysed the data: EJJ, MMeM. Wrote the paper: EJJ, ML.

Acknowledgements

We thank Stephanie Christensen and Thomas Hemscheidt for sharing their ideas on the acid labile BMAA fraction in the extracts. We thank Wendy Beekman-Lukassen for laboratory assistance. EJJ was supported by grant 817.02.019 from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO).

Appendix A.

See Table A1

Appendix B.

See Table B1

Table A1

Life history parameters of F_0 generation *D. magna* kept in clean medium (C) or exposed to BMAA (B). SD means standard deviation. d. means detected, n.d. means not detected.

			C	B	Statistical information
Survival	(%)	<i>n</i>	92 12	83 12	
Final length	(mm)	Mean SD <i>n</i>	3.2 0.07 11	2.8 0.15 10	Independent samples <i>t</i> -test $t_{19} = 7.97, p < 0.001$
Maximum growth rate	(1/day)	Mean SD <i>n</i>	0.32 0.05 11	0.20 0.06 10	Independent samples <i>t</i> -test $t_{19} = 5.00, p < 0.001$
Time of first reproduction	(day)	Mean SD <i>n</i>	9.6 0.81 11	10.4 1.58 10	Mann–Whitney rank sum test $U = 41.50, p = 0.219$
Inter-clutch duration	(day)	Mean SD <i>n</i>	3.1 0.30 11	3.3 ^a 0.71 8	Mann–Whitney rank sum test $U = 28.00, p = 0.083$
Size first brood ^b		Mean SD <i>n</i>	8 2.4 11	6 3.0 10	Independent samples <i>t</i> -test $t_{19} = 1.42, p = 0.173$
Size second brood ^b		Mean SD <i>n</i>	10 2.1 11	6 3.2 9	Independent samples <i>t</i> -test $t_{18} = 3.01, p = 0.007$
Size third brood ^b		Mean SD <i>n</i>	7 2.4 11	4 1.7 8	Mann–Whitney rank sum test $U = 13.50, p = 0.012$
Dry weight neonates	(μg)	Mean SD <i>n</i>	8.7 1.7 11	5.3 1.3 10	Independent samples <i>t</i> -test $t_{19} = 5.14, p < 0.001$
Mortality in broods	(%)	Mean SD <i>n</i>	0 0.0 11	7 11.5 10	Mann–Whitney rank sum test $U = 38.50, p = 0.064$
Population growth rate	(1/day)	Mean SD <i>n</i>	0.25 0.03 12	0.19 0.05 12	Independent samples <i>t</i> -test $t_{22} = 4.06, p < 0.001$
BMAA in adults (F_0)			n.d.	d.	
BMAA in neonates (F_1)			n.d.	d.	

^a One animal only reproduced once, another only twice.

^b Only living offspring are considered.

Table B1

Life history parameters of F_0 generation *D. magna* kept in clean medium (c) or exposed to BMAA (b). SD means standard deviation, $n = 3$ for all treatments.

			c	b	Statistical information
Survival	(%)	Mean SD	98 3.2	61 8.7	Independent samples <i>t</i> -test $t_4 = 6.95, p = 0.002$
Total neonates brood 1 ^a		Mean SD	168 37	75 29.7	Independent samples <i>t</i> -test $t_4 = 3.40, p = 0.027$
Total neonates brood 2 ^a		Mean SD	199 69.1	71 23.5	Independent samples <i>t</i> -test $t_4 = 3.03, p = 0.039$

Table B1 (Continued)

			c	b	Statistical information
Mortality in broods	(%)	Mean	0.5	2.1	Independent samples t-test $t_4 = -0.74, p = 0.499$
		SD	0.22	3.61	

^a Only living offspring are considered.

References

- Agrawal, A.A., Laforsch, C., Tollrian, R., 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401, 60–63.
- Andersson, M., Karlsson, O., Bergström, U., Brittebo, E.B., Brandt, I., 2013. Maternal transfer of the cyanobacterial neurotoxin β -Nl-alanine (BMAA) via milk to suckling offspring. *PLoS One* 8, e78133.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*, 4 ed. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Bell, E.A., 2003. Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2854–2865.
- Bradley, W.G., Mash, D.C., 2009. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotrophic Lat. Scler.* 10, 7–20.
- Carotenuto, Y., Wichard, T., Pohnert, G., Lampert, W., 2005. Life-history responses of *Daphnia pulex* to diets containing freshwater diatoms: effects of nutritional quality versus polyunsaturated aldehydes. *Limnol. Oceanogr.* 50, 449–454.
- Cheng, R., Banack, S.A., 2009. Previous studies underestimate BMAA concentrations in cycad flour. *Amyotrophic Lat. Scler.* 10, 41–43.
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2011. Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Env. Res. Public Health* 8, 3728–3746.
- Christensen, S.J., Hemscheidt, T.K., Trapido-Rosenthal, H., Laws, E.A., Bidigare, R.R., 2012. Detection and quantification of β -methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr. Methods* 10, 891–898.
- Dao, T.S., Do-Hong, L.C., Wiegand, C., 2010. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicol.* 55, 1244–1254.
- Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2014. The fate of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine in freshwater mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 51–58.
- Downing, S., Esterhuizen-Londt, M., Downing, T.G., 2015. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) metabolism in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 88–92.
- Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., 2013. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One* 8, e75376.
- Esterhuizen-Londt, M., Wiegand, C., Downing, T.G., 2015. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the animal model, *Daphnia magna* and subsequent oxidative stress. *Toxicol.* 100, 20–26.
- Faassen, E.J., 2014. Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know? *Toxins* 6, 1109–1138.
- Faassen, E.J., Gillissen, F., Lürling, M., 2012. A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria. *PLoS One* 7, e36667.
- Faassen, E.J., Gillissen, F., Zweers, H.A.J., Lürling, M., 2009. Determination of the neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (α - γ -diaminobutyric acid) by LC-MS/MS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotrophic Lat. Scler.* 10, 79–84.
- Glover, W.B., Mash, D.C., Murch, S.J., 2014. The natural non-protein amino acid N- β -methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. *Amino Acids* 46, 2553–2559.
- Gustafsson, S., Rengefors, K., Hansson, L.A., 2005. Increased consumer fitness following transfer of toxin tolerance to offspring via maternal effects. *Ecology* 86, 2561–2567.
- Ianora, A., Miralto, A., 2010. Toxicogenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes. *A rev. Ecotoxicol.* 19, 493–511.
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L.L., Rasmussen, U., 2014. Diatoms: a novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments. *PLoS One* 9, e84578.
- Jiang, X., Yang, W., Zhao, S., Liang, H., Zhao, Y., Chen, L., Li, R., 2013. Maternal effects of inducible tolerance against the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the grazer *Daphnia carinata*. *Environ. Pollut.* 178, 142–146.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9252–9257.
- Karlsson, O., Jiang, L., Andersson, M., Ilag, L.L., Brittebo, E.B., 2014. Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. *Toxicol. Lett.* 226, 1–5.
- Karlsson, O., Lindquist, N.G., Brittebo, E.B., Roman, E., 2009. Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol. Sci.* 109, 286–295.
- Lampinen Salomonsson, M., Hansson, A., Bondesson, U., 2013. Development and in-house validation of a method for quantification of BMAA in mussels using dansyl chloride derivatization and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 5, 4865–4874.
- Lemaire, V., Brusciotti, S., van Gremberghe, I., Vyverman, W., Vanoverbeke, J., De Meester, L., 2012. Genotype \times genotype interactions between the toxic cyanobacterium *Microcystis* and its grazer the waterflea *Daphnia*. *Evol. Appl.* 5, 168–182.
- Lürling, M., Faassen, E.J., Eenennaam, J.S.V., 2011. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. *J. Plankton Res.* 33, 333–342.
- Lürling, M., Van Donk, E., 1997. Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshwat. Biol.* 38, 693–709.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S., 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology* 67, 1156–1166.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12228–12231.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D.R., 2013. L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.* 131, 217–224.
- Ortiz-Rodríguez, R., Son Dao, T., Wiegand, C., 2012. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. *J. Exp. Biol.* 215, 2795–2805.
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A., Mash, D.C., 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 120, 216–225.
- Sommer, U., Adrian, R., De Senerpont Domis, L., Elser, J.J., Gaedke, U., Ibelings, B., Jeppesen, E., Lürling, M., Molinero, J.C., Mooij, W.M., Van Donk, E., Winder, M., 2012. Beyond the plankton ecology group (PEG) model: mechanisms driving plankton succession. *Annu. Rev. Ecol. Evol. System.* 43, 429–448.
- Spáčil, Z., Eriksson, J., Jonasson, S., Rasmussen, U., Ilag, L.L., Bergman, B., 2010. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* 135, 127–132.
- Spencer, P.S., Kisby, G.E., Ludolph, A.C., 1991. Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region. *Neurology* 41, 62–66.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237, 517–522.
- Tollrian, R., 1993. Neckteeth formation in *Daphnia pulex* as an example of continuous phenotypic plasticity: Morphological effects of *Chaoborus* kairomone concentration and their quantification. *J. Plankton Res.* 15, 1309–1318.
- Van Onselen, R., Cook, N.A., Phelan, R.R., Downing, T.G., 2015. Bacteria do not incorporate β -N-methylamino-L-alanine into their proteins. *Toxicol.* 102, 55–61.
- Vega, A., Bell, E.A., 1967. α -amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 6, 759–762.
- Whiting, M.G., 1963. Toxicity of cycads. *Econ. Bot.* 17, 271–302.
- Zenk, M.H., Juenger, M., 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* 68, 2757–2772.