

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Renan Silva Arruda

Avaliação dos efeitos da aplicação de técnicas para mitigação de florações de cianobactérias na liberação e destino de cianotoxinas em dois sistemas eutróficos tropicais

> Rio de Janeiro 2023

# Renan Silva Arruda

# Avaliação dos efeitos da aplicação de técnicas para mitigação de florações de cianobactérias na liberação e destino de cianotoxinas em dois sistemas eutróficos tropicais



Orientador: Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho Coorientadora: Dra. Natália Pessoa Noyma

> Rio de Janeiro 2023

# CATALOGAÇÃO NA FONTE

# UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

A779	Arruda, Renan Silva.
	Avaliação dos efeitos da aplicação de técnicas para mitigação de
	dois sistemas eutróficos tropicais / Renan Silva Arruda. – 2023.
	287 f. : il.
	Orientador: Marcelo Manzi Marinho.
	Coorientadora: Natália Noyma Pessoa.
	Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do
	Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
	1. Cianobactéria - Teses. 2. Eutrofização - Teses. 3. Biomassa -
	Teses. I. Marinho, Marcelo Manzi. II. Pessoa, Natália Noyma. III.
	Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia
	Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.
	CDU 582.232

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte

Assinatura

Data

Renan Silva Arruda

# Avaliação dos efeitos da aplicação de técnicas para mitigação de florações de cianobactérias na liberação e destino de cianotoxinas em dois sistemas eutróficos tropicais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 15 de dezembro de 2023.

#### Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

#### Coorientadora:

Dra. Natália Pessoa Noyma Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dra. Patrícia Domingos Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Vera Lúcia M. Huszar Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Maíra Nunes Teixeira Mucci Wageningen University

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Becker Universidade Federal do Rio Grande do Norte

> Rio de Janeiro 2023

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Professora Adelir (*in memoriam*), avó amada, a primeira de três gerações de educadores.

#### AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado aos meus pais Rosane Arruda e Jaziel Arruda, pela educação, valores e incondicional amor; aos meus tios Rosaly e Ivan (*in memoriam*), Evandro e Claudia, Rossana e Simplício, e Evaldo, agradeço por sempre estarem presentes e serem meus maiores apoiadores de carreira. Ao meu querido Alessandro Ramos, obrigado por sonhar comigo, por respeitar e apoiar minhas escolhas. Deus foi muito generoso ao me permitir ter vocês nessa vida terrena.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Marcelo Manzi e Natália Noyma; nós trabalhamos, rimos, bebemos, discutimos, choramos por bons e maus motivos, e aprendemos a lidar com as diferenças e limitações uns dos outros. Minha trajetória no doutorado foi uma experiência tremenda ao lado de vocês, e não foi limitada ao profissional. Obrigado por acreditarem em mim e em meu trabalho.

Dr. Miquel Lürling, Dr. Ernani Pinto, Dra. Vera Hurzar, Dra. Patrícia Domingos e Dra Rebecca North, sou imensamente grato pela disponibilidade, pelo suporte técnico/material, mentoria e acima de tudo, pela confiança em meu trabalho.

Aos membros do LabAlgas (UERJ), Laboratório de Ficologia (MN – URFJ) e LTPNA (USP), agradeço o suporte técnico e cumplicidade. Vocês foram essenciais na execução das atividades proposta nesse projeto de pesquisa.

À PPGBV, FAPERJ, CAPES e SIWA, minha gratidão por viabilizar meu projeto de pesquisa e contribuindo para minha formação profissional.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

#### RESUMO

ARRUDA, Renan Silva. **Avaliação dos efeitos da aplicação de técnicas para mitigação de florações de cianobactérias na liberação e destino de cianotoxinas em dois sistemas eutróficos tropicais.** 2023. 287f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

da intensa eutrofização, frequentes florações Resultado de cianobactérias potencialmente tóxicas afetam a qualidade da água em sistemas aquáticos continentais e costeiros. Neste estudo, tendo como modelos um reservatório profundo eutrofizado e uma lagoa rasa costeira hipertrófica, ambos sistemas aquáticos tropicais e cenários de recorrentes eventos de florações de cianobactérias, investigamos a ocorrência e diversidade de microcistinas, outros cianopaptídeos e seus potenciais produtores; bem como, a eficiência de técnicas de floculação e sedimentação visando a remoção segura da biomassa de cianobactérias, ou seja, sem liberação de cianotoxinas na água. Através das análises em LC-MS identificamos compostos pertencentes as classes de microcistinas, aeruginosinas, microgininas, cianopeptolinas e microveridinas para ambos os ambientes; muitos dos quais apresentam sazonalidade entre estação seca e chuvosa. Microcystis aeruginosa, Dolichospermum circinalis e Planktothrix isothrix foram as cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas mais representativas durantes o estudo. Nos testes de remoção de biomassa de cianobactérias com a técnica Floc & Sink, utilizamos combinações entre cloreto de polialumínio (PAC) como floculante, lantânio Phoslock® (LMB) sozinho ou combinado com solo vermelho local (LRS) como lastros e o algicida peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). No reservatório, testando as combinações PAC+LMB e PAC+LMB+LRS, obtivemos resultados de remoção de cianobactérias semelhantes entre micro e mesocosmos, entre 92-100% de remoção de biomassa; com remoção de 94-100% das microcistinas intracelulares. Não observamos indícios de lise celular em nenhum destes experimentos; nos testes em que ocorreu medição de microcistinas (MCs) extracelulares, registramos significativa redução das concentrações da toxina devido ao uso do lastro. Na lagoa, os resultados de remoção de biomassa foram menos expressivos no microcosmos, entre 78-85%. O melhor resultado de remoção foi obtido, em microcosmos, pelo método integrado Kill, Floc & Sink, onde previamente ao PAC e LMB, aplicamos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neste experimento, não identificamos MCs dissolvidas na água, antes ou após tratamentos; além disso, os tratamentos testados reduziram a concentração de MCs intracelulares abaixo do limite de detecção. No teste em mesocosmos, ambas variações de tratamentos testadas removeram quantidades semelhantes de biomassa, entre 92-97% e MCs intracelulares com 95-100% de redução, sem liberação de MCs na água. Ao fim dos diversos experimentos concluímos que, técnicas de floculação e sedimentação são eficientes na remoção de biomassa de cianobactérias e MCs, com baixo risco de lise celular; entretanto sua efetividade é dependente da combinação adequada do floculante e lastro, suas respectivas dosagens, características intrínsecas do ambiente a ser tratado (ex., profundidade, pH) e por fim, das características morfofisiológicas da espécie de cianobactéria dominante (ex., morfotipos).

Palavras-chave: Cianopeptídeos. Microcistinas. Geoengenharia. Remoção de biomassa. Controle de eutrofização.

#### ABSTRACT

**ARRUDA,** Renan Silva. **Effects of cyanobacterial bloom mitigation techniques on cyanotoxin release and fate in two tropical eutrophic systems.** 2023. 287f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

As a result of intense eutrophication, frequent blooms of potentially toxic cyanobacteria affect the water quality in continental and coastal aquatic systems. In this study, using a deep eutrophic reservoir and a hypertrophic shallow coastal lagoon, both tropical aquatic systems, and scenarios of recurrent cyanobacterial bloom events as models, we investigated the occurrence and diversity of microcystins, other cyanopeptides, and their potential producers as well as flocculation and sedimentation techniques aiming for efficient and safe removal of cyanobacterial biomass. Through LC-MS analyses, we identified compounds belonging to microcystins, aeruginosins, microginins, cianopeptolins, and microviridins classes in both environments, many of which exhibit seasonality between dry and rainy seasons. During the study, Microcystis aeruginosa, Dolichospermum circinalis, and Planktothrix isothrix were the most representative potential microcystins producers. In biomass removal tests using the Floc & Sink technique, we employed combinations of polyaluminum chloride (PAC) as a flocculant, lanthanum Phoslock® (LMB) alone or combined with local red soil (LRS) as ballast, and the algaecide hydrogen peroxide  $(H_2O_2)$ . In the reservoir, testing the PAC+LMB and PAC+LMB+LRS combinations, we obtained similar results for cyanobacteria removal between microcosms and mesocosms, with removal rates of 92-100% of biomass and 94-100% of intracellular microcystins. No signs of cell lysis were observed in any of these experiments. In tests where extracellular microcystins (MCs) were measured, a significant reduction in toxin concentrations was recorded due to the ballast used. In the lagoon, the results of biomass removal were less pronounced in the microcosm, ranging from 78-85%. The integrated Kill, Floc & Sink method achieved the best removal result, where H2O2 was applied prior to PAC and LMB. In this experiment, we did not identify dissolved MCs in the water, either before or after treatments. Furthermore, the tested treatments reduced intracellular MC concentrations below the detection limit. In mesocosm tests, both variations of treatments removed similar amounts of biomass, ranging from 92-97%, and intracellular MCs with a 95-100% reduction, with no MCs release into the water column. At the end of the experiments, we concluded that flocculation and sedimentation techniques effectively remove cyanobacterial biomass and MCs, with a low risk of cell lysis. However, their effectiveness depends on the appropriate combination of flocculant and ballast, their respective dosages, intrinsic characteristics of the environment (e.g., depth, pH), and, finally, the morphophysiological characteristics of the dominant cyanobacterial species.

Keywords: Microcystins. Cyanobacteria mitigation. Geo-engineering. Eutrophication control.

# LISTA DE SÍMBOLOS

Al (OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
$CO_2$	Ácido carbônico
Fe	Ferro
Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
L <sup>-1</sup>	Litro
Mn	Manganês
mg	miligrama
ml	mililitro
m²	Metro quadrado
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
mm <sup>3</sup>	milímetro cúbico
μL	Microlitro
μg L <sup>-1</sup>	Micrograma por litro
$N_2$	Gás nitrogênio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon Nitrato
$\mathrm{NH}_4^-$	Íon Amônio
SRP	Fósforo reativo dissolvido
$O_2$	Gás oxigênio
Cl	Cloro
NTU	Unidade Nefelométrica de Turbidez

# LISTA DE ABREVIATURAS

PAC	Policloreto de alumínio
LMB	Bentonita modificada com lantânio
LRS	Solo vermelho
DIN	Nitrogênio inorgânico dissolvido
WT	Temperatura da água
DO	Oxigênio dissolvido
TP	Fósforo total
NT	Nitrogênio total
Chl-a	Clorofila
MC	Microcistinas
MG	Microginina
AER	Aeruginosina
СР	Cianopeptolina
STX	Saxitoxina
φPSII	Eficiência do fotossistema II
Z <sub>eu</sub>	Zona Eufótica
HPLC	Cromatografia de fase líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas in
tandem	
LC <sub>50</sub>	Concentração letal a 50% dos organismos-teste
Adda	Ácido 3- amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico
<i>m/z</i> ,	Razão massa carga

# SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	20
1	ARTIGO: CYANOPEPTIDES OCCURRENCE AND DIVERSITY IN A	
	BRAZILIAN TROPICAL RESERVOIR: EXPLORING	
	RELATIONSHIPS WITH WATER QUALITY PARAMETERS	40
2	ARTIGO: ANNUAL VARIABILITY OF INTRA AND	
	EXTRACELLULAR MICROCYSTINS IN A EUTROPHIC TROPICAL	
	BRACKISH COASTAL LAGOON (BRAZIL)	80
3	ARTIGO: "FLOC AND SINK" TECHNIQUE REMOVES	
	CYANOBACTERIA AND MICROCYSTINS FROM TROPICAL	
	RESERVOIR WATER	113
4	ARTIGO: EFFECTIVENESS OF "FLOC & SINK" TECHNIQUE	
	APPLIED TO REMOVE CYANOBACTERIA FROM TROPICAL	
	RESERVOIR WATER	140
5	ARTIGO: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA "FLOC & SINK" NA	
	REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS EFEITOS SOB A	
	CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINAS E SUA VARIANTES: UM	
	ESTUDO EM MESOCOSMOS, RESERVATÓRIO DO FUNIL	158
6	ARTIGO: EFICÁCIA DE TÉCNICA "KILL, FLOC & SINK" NA	
	REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E MICROCISTINAS DA ÁGUA	
	DE UMA LAGOA SALOBRA, URBANA, RASA E HIPEREUTRÓFICA:	
	ESTUDO EM MICROCOSMOS	187
7	AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS FLOCULAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO NA	
	REMOÇÃO DE FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS	
	EFEITOS SOB MICROCISTINAS E SUA VARIANTES: UM ESTUDO	
	EM MESOCOSMOS, LAGOA DE JACAREPAGUÁ	212
8	ARTIGO: PRIMARY SCREENING OF CYANOBACTERIAL	
	BIOMASS FROM A TROPICAL RESERVOIR: BIOLOGICAL	
	ACTIVITY AND METABOLOMICS ANALYSES	246
	DISCUSSÃO GERAL	272
	CONCLUSÃO GERAL	277
	REFERÊNCIAS	278
	ANEXO - Cyanopeptides other than microcystins found in our samples from	
	Jacarepaguá Lagoon	287

# INTRODUÇÃO GERAL

Com uma população humana atingindo 10 bilhões em meados deste século XXI, a pressão sobre os recursos globais de água potável só aumenta e esforços contínuos em pesquisa, gerenciamento e governança são necessários para reconhecer, compreender e mitigar os riscos à saúde associados ao uso da água assim como os danos aos sistemas aquáticos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece microrganismos infecciosos (bactérias, vírus e protozoários), substâncias geogênicas (arsênio, fluoreto, urânio), industriais e produtos químicos agrícolas (perfluorados [PFCs], pesticidas) e toxinas produzidas por cianobactérias (cianotoxinas) como riscos à saúde através da água (CHORUS; BARTRAM, 1999). Entre os perigos considerados na Guidelines for Drinking Water Quality (WHO, 2017), os microrganismos infecciosos são as causas mais significativas de mortalidade em uma escala global, causando uma carga substancial de doenças, como cólera, criptosporidiose ou enterite retroviral. Em contraste, a contribuição de cianotoxinas na água para a morbidade e mortalidade raramente é aguda. Apenas um número relativamente baixo dos casos registrados de intoxicação humana aguda são claramente atribuíveis a essas toxinas (WOOD, 2016). No entanto, assim como outras toxinas potencialmente encontradas na água potável, a exposição a baixas concentrações é possível porque a água potável é indispensável à dieta humana, tornando a exposição difícil de ser evitada. Bioacumulação de cianotoxinas já foi abordada em diversos estudos, tendo sido detectada em vertebrados e invertebrados aquáticos, incluindo peixes, mexilhões, camarões, zooplâncton e em plantas (KOTAK et al., 1996; MACHADO et al., 2017). Devido à relevância desses achados para alimentação humana, a bioacumulação de cianotoxinas compõe igualmente um risco à saúde.

Assim, as cianobactérias e suas toxinas apresentam-se como um desafio específico, fazendo-se necessário ter amplo conhecimento das condições promotoras do desenvolvimento desses organismos e suas toxinas, além do desenvolvimento de tecnologias eficazes para mitigação de florações tóxicas.

#### Cianobactérias

Com cerca de 3,5 bilhões de anos, as cianobactérias constituem o grupo de organismos mais antigo da Terra e a produção de toxinas é provavelmente uma característica igualmente antiga (WILMOTTE, 1994). Acredita-se que esses organismos sejam os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elemental na atmosfera, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento da vida no planeta; até os dias de hoje, eles continuam desempenhando um papel significativo na manutenção da biosfera (CHORUS; BARTRAM, 1999). Pertencentes ao domínio Cyanobacteria, que consiste em uma única classe chamada Cyanophyceae, elas ocupam uma posição intermediária entre as algas eucarióticas e as bactérias, pois possuem clorofila-*a*, mas não possuem um sistema de membranas. Esses microrganismos são procarióticos, aeróbios e realizam fotossíntese, dependendo de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas como zinco, ferro, cobre, nitrogênio, fósforo, entre outros, e luz para manter seu metabolismo (CARMICHAEL, 1992)

Como procariontes, as cianobactérias não possuem núcleo celular e outras organelas celulares, permitindo sua distinção microscópica da maioria das outras microalgas (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2019). Em particular, as cianobactérias não possuem cloroplastos e, em vez disso, a clorofila para a fotossíntese está contida em tilacóides simples (exceção: Gloeobacter spp. que não possui tilacóides). E é a fotossíntese, responsável pela energia necessária para os processos vitais nestes organismos, que é semelhante àquela encontrada em vegetais superiores e algas verdes. O principal pigmento responsável pela absorção de luz é a clorofila-a (Chl-*a*). As cianobactérias possuem os fotossistemas I e II e são capazes de sintetizar uma variedade de pigmentos acessórios, principalmente ficobiliproteínas, juntamente com alguns carotenoides (TANDEAU DE MARSAC, 2003). Esses pigmentos auxiliam tanto na absorção de luz quanto na proteção da clorofila-a contra a foto-oxidação (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2014). Em face de mudanças ambientais ou outros fatores estressores, a síntese de certos pigmentos nas cianobactérias pode variar, resultando em modificações em seu metabolismo (VIDAL et al., 2021).

Em relação à sua morfologia, as cianobactérias podem apresentar-se de três formas: unicelulares, com formatos esféricos, elipsóides, em forma de barril, cilíndricas, cônicas ou em forma de disco; em colônias; ou como filamentos multicelulares retos ou espiralados, chamados tricomas (VIDAL et al., 2021). Suas células possuem uma parede celular composta por um envelope mucilaginoso, principalmente de

polissacarídeos. O tamanho das cianobactérias varia consideravelmente entre os táxons: células mais ou menos esféricas de cianobactérias unicelulares variam em diâmetro de cerca de 0,2 µm a mais de 40 µm. Consequentemente, o volume celular pode variar por um fator de pelo menos 300.000, tornando a simples contagem de células um parâmetro não confiável para a determinação da biomassa, especialmente quando relatada sem diferenciação entre táxons individuais (PADISÁK et al., 2021).

Algumas cianobactérias possuem estruturas chamadas aerótopos, que são vacúolos de ar compostos por pequenas vesículas, permeáveis apenas a gases. A regulação da flutuabilidade ocorre, em nível celular, através dos aerótopos, uma característica que permite que as cianobactérias ajustem verticalmente sua posição na coluna de água (ex.: *Microcystis, Dolichospermum*, e *Oscillatoria*) (HUISMAN et al., 2004). A vantagem da regulação da flutuabilidade para as cianobactérias é amplamente reconhecida, pois permite a biomassa acesso à luz na superfície, conferindo vantagem competitiva sob outras espécies fitoplanctônicas por meio do sombreamento (DOKULIL; TEUBNER, 2000; PAERL; OTTEN, 2013). Outra forma de regulação de flutuabilidade se dá a nível colonial, promovida por "colônia-formação" que aumenta o raio da colônia, favorecendo assim a flutuabilidade (REYNOLDS; OLIVER; WALSBY, 1987). Em populações naturais, a morfologia das colônias pode mudar durante o ciclo sazonal (REYNOLDS et al., 1981).

A dominância de cianobactérias ocorre quando, no mínimo, suas demandas de energia luminosa e nutrientes, principalmente fósforo (P) e nitrogênio (N), são supridas. Sobretudo porque, ao competirem por tais recursos, suas características fisiológicas e morfológicas específicas as favorecem e que, por sua vez, possibilitam sua proliferação. Algumas estratégias adaptativas são encontradas apenas em um subconjunto restrito de cianobactérias, como a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico ou a regulação da flutuabilidade na coluna de água. Além disso, algumas condições ambientais específicas também favorecem fortemente a dominância de certos gêneros de cianobactérias, as quais podem tornar-se dominantes tais como temperatura, nutrientes, regime de mistura e pH (IBELINGS et al., 2021). A conjunção de todos esses fatores não possibilita apenas o crescimento demasiado desse grupo em curto espaço de tempo (floração) mas a dominância deste em diversos sistemas aquáticos. Florações de cianobactérias são consideradas problemáticas, pois podem produzir odores desagradáveis, matar peixes devido à hipóxia / anoxia, bem como prejudicar os serviços do ecossistema, como

produção de água potável, irrigação, recreação, aquicultura e pesca (PAERL; PAUL, 2012).

A definição de floração, seja para cianobactérias ou outro organismo fitoplanctônico, permanece controversa, sendo definida de acordo com observações visuais (coloração da água), limiares numéricos ou mesmo critérios subjetivos (HUISMAN et al., 2018; ERRATT; CREED; TRICK, 2022). Isso faz com que a forma de lidar com eventos de floração de cianobactérias difira muito entre países, provavelmente associada às grandes desigualdades no desenvolvimento científico, acesso a financiamento e capacidades técnicas entre os atores (AGUILERA et al., 2023). A variação na percepção do que pode ou não ser considerado 'floração' e nas capacidades de monitoramento desses eventos, pode resultar em estimativas imprecisas quanto à ocorrência e seus potenciais efeitos na saúde ambiental e da sociedade.

#### Metabólitos secundários e cianotoxinas

O metabolismo engloba todos os processos pelos quais os organismos adquirem e utilizam energia necessária para suas diversas funções. Isso ocorre por meio de uma combinação de reações exergônicas (catabolismo), que envolvem a oxidação de nutrientes para gerar energia, e processos endergônicos (anabolismo), nos quais moléculas complexas são sintetizadas a partir de moléculas mais simples. Essa interação entre reações exergônicas e endergônicas permite o equilíbrio energético e a manutenção das funções vitais dos organismos (VOET; VOET, 2011).

Além do metabolismo primário, que é responsável pela síntese de substâncias necessárias para as funções vitais, os organismos também possuem o chamado metabolismo secundário. O metabolismo secundário envolve a produção de metabólitos de baixo peso molecular, geralmente presentes em concentrações reduzidas. Embora haja uma ampla variedade desses compostos descritos na literatura, o número de vias biossintéticas é limitado, uma vez que os precursores para sua síntese normalmente derivam das vias do chiquimato, glicólise e ciclo de Krebs (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2014; WINK, 2018).

Entre os metabólitos bioativos, as cianobactérias produzem toxinas de baixo peso molecular, incluindo anatoxina, saxitoxina e cilindrospermopsina, mas também

oligopeptídeos não ribossômicos, denominados cianopeptídeos (WHO, 2017); que em geral podem afetar a atividade de enzimas celulares, interferir nas vias de sinalização intracelular e até mesmo causar a apoptose de tecidos, resultando na mortalidade de organismos afetados (IBELINGS et al., 2021). Devido aos riscos toxicológicos apresentados por vários cianometabólitos, valores limites foram introduzidos por vários países (como UE, EUA, Canadá, Brasil, Austrália, África do Sul, China e Japão) para proteger a população da exposição a cianotoxinas (PICARDO et al., 2019). Além dessas cianotoxinas regulamentadas, mais de 2.000 metabólitos secundários de cianobactérias têm sido identificados estruturalmente até o momento (JONES et al., 2020).

De acordo com sua estrutura química, os cianopeptídeos são classificados em microcistinas, microgininas, aeruginosinas, cianopeptolinas, microviridinas, anabaenopeptinas, entre outras; em cada classe, o número de aminoácidos e a ordem em sua composição são altamente variáveis, sendo possível a ocorrência de diversas variantes em uma mesma classe (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Esses peptídeos são presumivelmente sintetizados por vias híbridas de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) ou NRPS/polyketide sintetase (PKS) e apresentam uma gama considerável de atividades biológicas, muitas ainda desconhecidas (HUANG; ZIMBA, 2019). Apesar de ainda não se ter uma compreensão completa das funções fisiológicas desses compostos, é importante destacar que alguns deles apresentam potencial farmacológico, exibindo atividades antibióticas, imunossupressoras, anticâncer, antivirais e anti-inflamatórias (RASTOGI; SINHA, 2009).

Embora esses metabólitos também sejam reconhecidamente bioativos, informações sobre a co-ocorrência de diferentes classes de cianopeptídeos, concentrações de exposição em águas superficiais, efeitos tóxicos e sinérgicos ainda são pouco exploradas (WELKER; VON DÖHREN, 2006; JANSSEN, 2019). Alguns estudos ecotoxicológicos já sugeriram que os efeitos dos extratos de cianobactérias não podem ser atribuídos apenas as MCs, indicando que outros metabólitos bioativos devem ser estudados e considerados na avaliação de risco (KEIL et al., 2002; BAUMANN; JÜTTNER, 2008; SMUTNÁ et al., 2014; LE MANACH et al., 2016).

Assim, compreender os efeitos dos metabolitos secundários produzidos por cianobactérias, além de trazer à luz o papel ecológico desses compostos, pode proporcionar avanços nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, por exemplo; ou ainda, devido a possíveis efeitos tóxicos, a inclusão desses compostos nas avaliações de risco.

### Microcistinas

As cianotoxinas são produto do metabolismo secundário das cianobactérias. Dentre os aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias descritos, cerca de 40 estão relacionados à produção de cianotoxinas (HUMBERT, 2009). Presentes no interior da célula, as cianotoxinas podem ser liberadas principalmente durante a senescência, morte e lise celular, mas não exclusivamente (CHORUS; BARTRAM, 1999). Situações que promovem lise celular também promovem liberação de cianotoxinas. As cianotoxinas mais conhecidas são quimicamente divididas em peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos. Entretanto, baseado em suas ações farmacológicas, as duas principais classes de cianotoxinas são neurotoxinas e hepatotoxinas. (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Destacam-se dentre os heptapeptídeos cíclicos as microcistinas (MCs), que compreendem um grupo diverso, com mais de 300 congêneres estruturalmente semelhantes (JONES et al., 2020), sendo as cianotoxinas mais encontradas em florações de cianobactérias em sistemas de água doce (DE FIGUEIREDO et al., 2004; O'NEIL et al., 2012a). A estrutura geral das microcistinas é ciclica (-D-Ala-X-D-eritro-p-metil-Asp-Y-Adda-D-Glu-N-metil-dehidro-Ala), onde X e Y são dois aminoácidos variáveis (X= leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y); e Y= arginina (R), alanina (A) ou metionina (M). XY são combinações de heptapeptídeos definidas como LR, LA, YA, YM, YR, RR, e Adda é o ácido 3- amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico (CARMICHAEL et al., 1988). A fórmula estrutural geral da microcistina está representada na Figura 1. O resíduo N-metil dehidroalanina presente na molécula foi caracterizado como um dos responsáveis pela atividade biológica dessas hepatotoxinas, potentes inibidores de proteínas fosfatases da família serina/treonina (PP1 e PP2A) em organismos eucarióticos (MACKINTOSH et al., 1990).

Figura 1- Estrutura geral das Microcistinas



Legenda: A estrutura geral das microcistinas (MCs) e uma visão geral da diversidade estrutural observada.  $R^1 = H$  ou  $CH_3$ ;  $R^2 = H$  ou  $CH_3$ ;  $R^3 = H$ ,  $CH_3$  ou  $C_3H_6OH$ ;  $R^4 = H$ ,  $CH_3$  ou  $COCH_3$ ; X e Z = aminoácidos L variáveis. Fonte: BOUAÏCHA et al., 2019

Em um estudo comparativo, 10 diferentes congêneres de MC foram analisados quanto à sua toxicidade usando camundongos BALB/c via dosagem oral, com MC-LA e MC-LR que finalmente se mostraram altamente tóxico (CHERNOFF et al., 2020). Administração oral de MCs em camundongos revelou atividades elevadas de alanina transferase sérica e aspartato transaminase, aumentando as proporções de entre o fígado/corpo, glicose plasmática diminuída e proteína total (CHERNOFF et al., 2020). Baseado em estudos com animal modelo, MC-LR mostrou efeitos adversos em órgãos como fígado, órgãos reprodutivos e sistema endócrino (CHEN et al., 2016, 2017, 2021). Para a proteção da saúde humana contra MC-LR presente na água, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs um valor-guia para MC-LR, para exposição potencial ao longo da vida através de água potável de 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e 12  $\mu$  gL<sup>-1</sup> para exposição de curto prazo (água potável), e 24  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, para exposição potencial via água recreativa (WHO, 2017). No Brasil, a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, que substituiu o anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, estabelece o valor máximo permitido de 1,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (equivalente de MC-LR, somatório das concentrações de todas as variantes de MC). Embora, a legislação brasileira que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade ainda receba críticas de especialistas, uma vez que o uso de limites numéricos pode ser problemático, dadas as diferenças no conteúdo de toxina por célula entre diferentes espécies de cianobactérias (MEREL et al., 2013), a legislação brasileira é um grande avanço. O Brasil está entre os dois únicos países da América do Sul e Caribenha, que possui regulação para monitoramento em águas de abastecimento, águas para atividade recreacional e limites para biomassa e toxinas (AGUILERA et al., 2023). Entende-se por monitoramento o processo de acompanhamento dos parâmetros químicos, físicos e biológicos da água, pré-estabelecidos através de resolução de Órgãos Públicos Ambientais ou de Saúde para diversos corpos hídricos, como rios, lagos, e águas costeiras. Importante ressaltar ainda que, nossa legislação estabelece limites não só para MC, mas para saxitoxinas (3,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e cilindrospermopsinas (1,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) (Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021)

As cepas de cianobactérias produtoras de microcistinas podem ser encontradas em todos os táxons, especificamente em espécies pertencentes às ordens Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales; os dados da ordem Pleurocapsales, entretanto, são escassos (FASTNER; HUMPAGE, 2021). Um estudo recente mostrou que o Brasil é segundo dos quatro países com o maior número de táxons formadores de floração na América do Sul e Caribenha, sendo 6 dos 7 táxons, potencialmente produtores de MC (AGUILERA et al., 2023). Cabe ressaltar que nem todos os gêneros de uma ordem produzem microcistinas e que nem mesmo todas as cepas de uma espécie são tóxicas. Esse fato levou ao uso do termo "potencialmente produtoras". Cepas produtoras e não produtoras de microcistinas são principalmente espécies de água doce de Microcystis, Planktothrix, Dolichospermum (antes Anabaena) e Nostoc (FASTNER; HUMPAGE, 2021). O gênero Microcystis, especificamente, comum em lagos, reservatórios e rios temperados, tropicais e subtropicais de mais de 100 países espalhados por seis continentes (SVIRČEV et al., 2019), está entre os gêneros de cianobactérias mais comuns e nocivos (DICK et al., 2021). Embora muitas cepas toxigênicas produzam simultaneamente algumas variantes de microcistinas (PUDDICK et al., 2014), cada cepa em particular pode produzir de uma a três variantes (FASTNER; HUMPAGE, 2021). Algumas variantes de microcistinas são mais abundantes em um determinado gênero do que em outros, embora essa afirmação possa estar subestimada ou, ainda, possa ser tendenciosa, uma vez que há limitações na disponibilidade de padrões analíticos e, também, de métodos analíticos usados para identificação dessas MCs (FASTNER; HUMPAGE, 2021). Na América do Sul, as variantes de MC já reportadas em condições naturais são LA, LR, RR, YR, LF, LF, D-Asp<sup>3</sup> e (E)-Dhb<sup>7</sup>-RR (AGUILERA et al., 2023); e considerando que hoje há registros de pelo menos 300 variantes de MC ao redor do mundo (JONES et al., 2020), atribuímos também essa discrepância à realidades contrastantes em perfis científicos e técnicos especializados, entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, e não propriamente à falta de florações tóxicas de cianobactérias em nosso continente (SOARES et al., 2013; AGUILERA et al., 2018; SVIRČEV et al., 2019). No Brasil, mais de 90% dos dados de cianotoxinas foram gerados através do método de ELISA, o que impossibilita, por exemplo, a identificação das variantes de MC (AGUILERA et al., 2023).

Muitas pesquisas têm se dedicado a avaliar o efeito de fatores ambientais, incluindo disponibilidade de nutrientes, luz, limitação de ferro, temperatura e pH no conteúdo celular de MC (SONG et al., 1998a; KAEBERNICK et al., 2000a; OH et al., 2000; SEVILLA et al., 2008; DZIALLAS; GROSSART, 2011; JÄHNICHEN; LONG; PETZOLDT, 2011; TAO et al., 2012; MEISSNER; FASTNER; DITTMANN, 2013; PIMENTEL; GIANI, 2013; PUDDICK et al., 2016). Estudos também demonstram que a interação entre cianobactérias e outros organismos (ex.: dinoflagelados, zooplâncton) também exercem influência na produção de MC (JANG; JUNG; TAKAMURA, 2007; PRINCIOTTA; HENDRICKS; WHITE, 2019; VILAR et al., 2021). Em geral, tem ficado claro que alguns desses fatores estão envolvidos no aumento ou supressão da expressão do gene *mcy*, responsável pela síntese de MC, levando a um aumento ou diminuição da produção de MC (BASHIR et al., 2023). Em geral, as concentrações de MC estão relacionadas tanto com a biomassa quanto com a capacidade de produção de MCs de cianobactérias tóxicas

Os fatores ambientais que levam à formação de florações tóxicas do gênero *Microcystis*, assim como a regulação da produção de MC ainda são motivo de debate e exigem estudos extensos para entender a interação floração-ambiente. Por exemplo, uma das razões plausíveis poderia ser a presença de cepas tóxicas e não tóxicas dentro da mesma floração e a regulação intracelular dos genes que codificam para MCs, levando a uma relação fraca entre as variáveis medidas durante o procedimento de monitoramento e a concentração de MC. Outra questão que também interfere na relação variáveis ambientais e MC é que, uma série de fatores ambientais pode ser responsável tanto pelo crescimento de cianobactérias quanto pela regulação da produção de MC; o

que nos leva ao questionamento se o incremento na concentração de MC se dá pelo estímulo à produção ou é apenas resultado indireto do aumento da biomassa (PENG et al., 2018; WILHELM; BULLERJAHN; MCKAY, 2020). No entanto, a influência de tais fatores na composição relativa de variantes de MC dentro da floração de cianobactérias ou em culturas não foi ainda devidamente explorada. Várias investigações relataram que cepas de cianobactérias em laboratório ou in situ podem produzir vários congêneres de MCs simultaneamente e os perfis de toxinas em função do tempo podem mudar devido a mutações espontâneas em diferentes genes do operon mcy (KAEBERNICK et al., 2001; MIKALSEN et al., 2003; OTTEN et al., 2017). Além disso, a diversidade de MCs pode estar ligada a fatores ambientais que regulam a expressão de genes mcy, como mencionado anteriormente (PENG et al., 2018). A expressão do gene mcyB responsável pela produção de MC mostrou ser regulada por altas temperaturas, estresse por deficiência de N e tratamento com ácido acetilsalicílico (DITTMANN et al., 1997; NISHIZAWA et al., 2000); outro estudo mostrou que nutrientes incluindo N, P e boro (B) afetam a produção de MC e talvez sua diversidade estrutural (HARKE; GOBLER, 2013; SRIVASTAVA et al., 2016). Além disso, a natureza e a concentração dos aminoácidos livres presentes no ambiente também podem influenciar a composição relativa dos congêneres de MCs; a adição de leucina (aminoácido pobre em N) no meio de cultura para Planktothrix agardhii cepa 126/3 aumentou a síntese de MC-LR enquanto a adição de arginina (aminoácido rico em N) levou à produção excessiva de MC-RR (TONK et al., 2008). A intensidade luminosa também desempenha um papel potencial na expressão de mcy na produção de M. aeruginosa e MC. A expressão de mcyB e mcyD na cepa de M. aeruginosa PCC7806 variou sob luz contínua de várias intensidades, ou pouca luz com subsequente exposição de curto prazo a diferentes intensidades de luz e comprimentos de onda (SEVILLA et al., 2012); a expressão de ambos os genes aumentou em resposta às altas intensidades de luz vermelha. No entanto, a exposição à luz azul reduziu a expressão de ambos os genes, sugerindo um papel potencial da qualidade da luz em certas intensidades limiares na expressão da MC sintetase (KOPF et al., 2015). Apesar das informações geradas até o momento, essas relações ainda não são claras; contribuindo para a divergência dos parâmetros ambientais que podem influenciar a ocorrência de MC está a variabilidade natural da produção de toxinas e a natureza altamente dinâmica das florações de fitoplâncton (WU et al., 2008; RINTA-KANTO et al., 2009; LI et al., 2017a).

As microcistinas são quimicamente muito estáveis, permanecendo ativas mesmo depois da ferver a água contendo MC por várias horas (HARADA, 1999). Entretanto são suscetíveis à degradação aeróbica por uma série de bactérias aquáticas (HOLST et al., 2003; EDWARDS et al., 2008). A degradação também está relacionada fortemente com a temperatura, mas também é influenciada pelo tamanho da população microbiana e pela concentração inicial de microcistinas (PARK et al., 2001; BOURNE et al., 2006). Essas características das MCs tornam o processo de tratamento da água uma etapa crítica e cara. Um método de tratamento de água adequado a toxinas tem custo elevado, quando comparado aos métodos tradicionais, tornando-o inexequível em países mais pobres (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). Devido a isso, o processo de mitigação de florações de cianobactérias é a forma mais adequada de evitar a contaminação da água por MC e outros cianopeptídeos.

Um estudo de 2019, que investigou geográfica e historicamente a distribuição de cianotoxinas, mostrou que as cianotoxinas foram encontradas em 6 diferentes países da América do Sul, em 79 sistemas aquáticos distintos e com predominância em reservatórios (22) e lagos (13) (SVIRČEV et al., 2019). O mesmo estudo apontou que dentre as cianotoxinas, as MCs foram mais abundantes mundialmente (63%) e no continente Sul-Americano (66%), com ampla distribuição no Brasil (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição geográfica das cianotoxinas comumente relatadas na América do Sul



Legenda: Distribuição geográfica das principais cianotoxinas registradas na América do Sul. Microcistinas, círculo verde; Nodularinas, quadrado azul; Anatoxinas, círculo lilás; Saxitoxinas, triângulo vermelho; Cilindrospermopsina, estrela rosa. Fonte: SVIRČEV et al., (2019)

Os primeiros relatos de florações no Brasil datam dos anos 80 (DÖRR et al., 2010). Dentre os gêneros formadores de florações, destaca-se *Microcystis* (7 espécies) por possuir o maior número de espécies tóxicas e pelo fato de ter ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do país, ao contrário dos demais gêneros, restritas a apenas uma região climática (SANT'ANNA et al., 2008). A ocorrência mais reconhecida envolvendo cianotoxinas no Brasil, "Síndrome de Caruaru", representa o primeiro caso confirmado de morte humana causada por cianotoxinas (MCs) no mundo (AZEVEDO et al., 2002). Em 1996, 130 pacientes renais crônicos foram intoxicados durante sessões de hemodiálise em uma clínica na cidade de Caruaru, estado de Pernambuco. Mais tarde, 70 pacientes morreram como resultado de exposição a cianotoxinas (JOCHIMSEN et al., 1998; AZEVEDO et al., 2002). Entretanto, outros eventos envolvendo outros diversos gêneros de cianobactérias também foram registrados no país, envolvendo humanos e animais (Quadro 1).

Ano	Local	Cianobactéria	Toxina	Efeitos / Sintomas	Referências
1988	Reservatório de Itaparica, Brasil	Microcystis sp., Anabaena sp.	N.E.	Em humanos. Pelo menos 2.000 casos de gastroenterite; diarréia; incluindo 88 mortes, ocorreram em um período de 42 dias. Pessoas ficaram doentes após beber água fervida da barragem"	(TEIXEIRA et al., 1993)
1996	Reservatório de Tabocas (Caruaru), Brasil	Aphanizomenon sp., Oscillatoria sp., Microcystis, Anabaena, Anabaenopsis, Cylindrospermopsis	MC (LR, YR, AR) CYN	Em humanos. 76 mortes em 131 pacientes após receberem tratamento de diálise usando água clorada. Zumbido; cegueira; náusea; doenças gastrointestinais; vômito; danos no fígado; mortes	(JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998; CARMICHAEL et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002)
2001	Rio de Janeiro, Brasil	Anabaena, Microcystis	МС	Exposição subletal, 44 pacientes envenenados com cianotoxinas em uma clínica de diálise, Rio de Janeiro	(BLÁHA; BABICA; MARŠÁLEK, 2009)
2003	Reservatório de Marechal Dutra, Brasil	C. raciborskii, M. aeruginosa	MC	Animais. Mortandade de peixes	(CHELLAPPA; CHELLAPPA; CHELLAPPA, 2008)
2009	Lagoa dos Patos	M. aeruginosa	D-Leu <sup>1</sup> MC-LR	Irritação da pele	(YUNES, 2009)

Quadro 1 - Intoxicações associadas a cianobactérias no Brasil

Legenda: N.E.: cianotoxinas(s) não especificada; MC: microcistina; CYN: Cilindrospermopsina.

Dessa forma, compreender as condições que favorecem cianobactérias e a produção de cianotoxinas é essencial para o gerenciamento de recursos hídricos, pois permitem estimar qual o panorama favorável às florações toxicas e evitá-las, ou contribuir para elaboração de ações para minimizar suas consequências.

# Mitigação de Florações de Cianobactérias

O aumento da população humana e suas atividades têm levado ao enriquecimento excessivo de nutrientes (N e P) com o consequente aumento de

produtores primários em lagos, lagoas e reservatórios, naturais ou não (O'NEIL et al., 2012a; PAERL, 2018). Denominado eutrofização, este processo tornou-se o principal problema de qualidade da água para a maioria dos ecossistemas aquáticos do mundo (HUDNELL, 2008), gerando impactos ambientais, sociais e econômicos (CARMICHAEL, 1992; CHORUS; BARTRAM, 1999). O sintoma mais notório da eutrofização é a proliferação massiva de cianobactérias formando florações (PAERL; HALL; CALANDRINO, 2011).

A ideia de que N e P são os mais importantes dentre os nutrientes responsáveis pela eutrofização foi proposta em um estudo de Vollenweider (1968) (EDMONDSON, 1970); a discussão sobre o assunto durou algumas décadas (SMITH; SCHINDLER, 2009). Entretanto, em estudo com dados de 56 lagos mostrou que se P pode ser reduzido a baixas concentrações, N provavelmente não seria um fator significante (JEPPESEN et al., 2007). Em outro estudo com 83 lagos rasos na América do Sul, demonstrou que, em uma ampla gama de climas, fatores locais, como uso da terra e hidrologia, têm uma influência mais forte sobre qual nutriente é limitante (KOSTEN et al., 2009). De qualquer forma, o primeiro passo para mitigar a eutrofização é reduzir as entradas externas de nutrientes (P e N), já que agir diretamente na causa do problema é a estratégia de manejo mais lógica no processo de mitigação (PAERL et al., 2016; HUISMAN et al., 2018). Embora a relação direta entre eutrofização e florações de cianobactérias seja conhecida há pelo menos 70 anos, assim como as medidas coerentes para melhoria da qualidade de água (EDMONDSON; ANDERSON; PETERSON, 1956), a eutrofização permanece como um problema generalizado, evidenciando a dificuldade geral na redução adequada das entradas de nutrientes nas águas superficiais (LÜRLING et al., 2020).

A redução das cargas de P em alguns lagos e reservatórios foi alcançada, com sucesso, a partir do emprego de técnicas como i) eliminação ou precipitação de P em tratamento de esgotos; ii) uso apropriado de fertilizantes minerais; iii) redução de fosfatos em detergentes para a roupa ou uma combinação de qualquer uma dessas medidas (IBELINGS et al., 2021). Na prática, a redução da carga de P é muitas vezes considerada a primeira escolha como ferramenta de manejo eficiente para reverter a eutrofização de lagos e reservatórios e, portanto, para controlar as florações de cianobactérias. Embora seja coesa, a redução da entrada de nutrientes externos é a alternativa mais complicada, sobretudo para países em desenvolvimento como, por exemplo, o Brasil, onde o sistema de coleta de esgotos e seu tratamento são ineficientes,

exigindo grandes investimentos (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). Além disso, a agricultura é um dos pilares econômicos do país, inviabilizando a diminuição de fertilizantes ou a utilização de fertilizantes orgânicos (ANDA, 2014 – Agência Nacional para Difusão de Adubos). Mesmo na Europa, com a implementação de todos os tipos de políticas nas últimas décadas, ainda é necessário melhorar o tratamento de águas residuárias, a descarga e a gestão de águas pluviais em muitos países (LÜRLING et al., 2020, apud IBISCH et al., 2016).

Evidentemente, o simples controle de fontes pontuais externas costuma ser insuficiente para reverter a eutrofização e medidas para o controle adicional de nutrientes são necessárias, especialmente divido ao estoque interno de nutrientes no sedimento (PAERL et al., 2016). Dependendo do estado trófico do sistema, faz-se necessário associar outras estratégias para controlar a carga interna de nutrientes, acumulada por décadas, visando acelerar a recuperação do sistema (JEPPESEN et al., 2007; COOKE et al., 2016; PAERL et al., 2016). A técnica de coagulação e precipitação da biomassa de cianobactérias e P - onde é usado coagulantes minerais/metálicos, naturais, orgânicos e sintéticos (LEE; ROBINSON; CHONG, 2014) pode ser considerada para auxiliar na agregação e flutuação da biomassa, associada com lastro (argilas naturais ou modificadas) para afundar efetivamente os agregados celulares no sedimento - originalmente denominada Floc & Lock, não apenas remove a biomassa de cianobactérias da coluna d'água, mas também reduz a liberação de P do sedimento (WAAJEN et al., 2016; VAN OOSTERHOUT et al., 2020). É importante mencionar que a quantidade de lastro utilizado nessa técnica leva em consideração as frações de P dissolvido na água e no sedimento; de modo que a argila, utilizada como latro, forme uma camada sobre o sedimento (recapeamento), aprisionando e inibindo a liberação do P para a coluna d'água (LÜRLING et al., 2020). Já a técnica Floc & Sink, um desdobramento da técnica Floc & Lock, também se mostra como uma medida promissora para gerenciar as consequências da eutrofização, as florações de cianobactérias (PAN; CHEN; ANDERSON, 2011; LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; NOYMA et al., 2016; WAAJEN et al., 2016). Nessa técnica, apenas a biomassa 'de cianobactérias é alvo do tratamento. Tanto as células intactas quanto o P dissolvido são retirados da coluna de água, ligados ao lastro (argilas), em direção ao sedimento. A etapa de coagulação é uma parte crítica desta técnica porque o coagulante pode causar estresse fisiológico ou químico nas células das cianobactérias, resultando na liberação de toxinas intracelulares e P (particulados) na água (LIU et al., 2004; SUN et al., 2012;

MIRANDA et al., 2017). A técnica *Floc & Sink* pode ser mais barata e segura, dependendo da escolha e da concentração dos compostos coagulantes e de lastro a ser usada (MIRANDA et al., 2017; NOYMA et al., 2017b; LUCENA-SILVA et al., 2019; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020a). No entanto, as características individuais do ambiente (ex., profundidade) e das espécies formadoras de florações (ex., morfologia e potencial de produção de toxinas) devem ser consideradas para determinar as combinações e dosagens ideais de cada composto, não apenas considerando a remoção de biomassa, mas principalmente evitando a liberação de toxinas na água. (MIRANDA et al., 2017; NOYMA et al., 2017b; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020a).

Nesse sentido, a abordagem *Floc and Lock* é sugerida para lagos com uma carga interna de P maior que a externa (LÜRLING et al., 2020; VAN OOSTERHOUT et al., 2020), especialmente em lagos profundos e estratificados. A técnica *Floc & Sink*, por sua vez, é recomendada também para lagos profundos e estratificados, porém, onde a carga externa de P que entra no sistema é maior que a carga interna (NOYMA et al., 2016, 2017; LÜRLING et al., 2020)

Em lagos rasos, a eficácia da abordagem *Floc & Sink* ou *Floc e Lock* pode ser limitada em comparação com águas profundas. Isso ocorre porque os flocos formados são leves e facilmente ressuspensos, levando à liberação de cianobactérias destes flocos (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020a). Consequentemente, essas cianobactérias liberadas podem recolonizar rapidamente a coluna de água (LÜRLING et al., 2020). Nesses corpos d'água, torna-se essencial, sobretudo, controlar a carga externa, e a implementação de medidas no lago, como a biomanipulação, pode ajudar a acelerar o processo de recuperação. Alternativamente, em situações onde ocorrem florações perenes ou recorrentes no verão, o uso repetido de algicidas como peróxido de hidrogênio pode ser considerado (MATTHIJS et al., 2016). Em lagos rasos com baixa carga externa, mas uma carga interna relativamente alta, é preferível eliminar as cianobactérias antes que elas se instalem no sedimento. Uma abordagem alternativa envolveria o uso de um adsrorvente de fósforo antes da estação de crescimento, o que limitaria a disponibilidade de nutrientes e reduziria o combustível para a formação da floração (LÜRLING et al., 2020).

Estudos já realizados com sistemas tropicais mostraram a efetividade de técnicas de floculação e sedimentação (MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019; ARRUDA et al., 2021). Em testes com água e biomassa provenientes de um reservatório tropical de água doce do sudeste brasileiro, a biomassa de cianobactérias

flutuantes, sobretudo M. aeruginosa e Dolichospermum circinalis, pôde ser floculada e efetivamente precipitada usando uma combinação de cloreto de polialumínio (PAC) ou quitosana (polímero extraído da casca de crustáceos) com solo natural vermelho (consistindo principalmente de argila caulinita) como lastro (NOYMA et al., 2016, 2017b). Em outro estudo, utilizando água e sedimento provenientes de uma laguna hipereutrófica, a combinação de cloreto de polialumínio (PAC) e argila modificada com lantânio foi eficiente em flocular e precipitar M. aeruginosa e P. agardhii (DE MAGALHÃES et al., 2017). Testes semelhantes também foram realizados com água de um reservatório raso eutrófico da região semiárida do Brasil, além da efetividade na remoção de P e biomassa, registrou-se redução no teor intracelular de MC e nenhum efeito significativo sobre a concentração e MC extracelulares, indicando que não ocorreu lise celular após aplicação da técnica; nenhum efeito sobre as concentrações intracelulares de saxitoxina e cilindrospermopsina foram observados. (LUCENA-SILVA et al., 2019). Entretanto, liberação de cianotoxinas também foi registrado em testes laboratoriais, porém em concentrações baixas e que não inviabilizariam o uso da técnica (MIRANDA et al., 2017; ARRUDA et al., 2021). O uso de peróxido de hidrogênio, um algicida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) precedendo o tratamento *Floc & Sink* se mostrou eficaz, em estudos em escala laboratorial, mantendo as cianobactérias precipitadas e, portanto, fora da coluna d'água (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020). Além disso, o uso do lastro contribui para a redução das MCs extracelulares já presentes e liberadas na água (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020). Reduções nas concentrações de MC já foram registradas em outras estudos com aplicação de técnica de floculação e sedimentação, e foram associadas ao uso de argilas, modificadas ou não (DAIL et al., 2020; ARRUDA et al., 2021).

Embora com resultados promissores, ainda existem divergências sobre o efeito da técnica na libração e destino de cianotoxinas. Dessa forma, ainda é preciso compreender quais são os potenciais efeitos "colaterais" da aplicação das técnicas de floculação e sedimentação de cianobactérias, uma vez que estudos com essa abordagem permanecem sub-explorados, especialmente para sistemas aquáticos tropicais. Portanto, uma abordagem baseada na detecção e avaliação das concentrações de toxinas antes e após a aplicação das técnicas de floculação e sedimentação, fornecerá o embasamento necessário para as autoridades responsáveis pelo gerenciamento de águas adotarem essa medida para controle de florações tóxicas de cianobactérias.

Este trabalho tem como objetivo monitorar a ocorrência de microcistinas, em dois sistemas tropicais – Reservatório do Funil e a Lagoa de Jacarepaguá (RJ, Brasil), seguida por avaliação dos possíveis efeitos de técnicas de mitigação de floração (Floc & Sink, Floc & Lock e Kill, Floc & Lock) em escala laboratorial (microcosmos) e em campo (mesocosmos) para os mesmos ambientes. A escolha dos ambientes justifica-se uma vez que, estes possuem florações tóxicas de cianobactérias recorrentes (FERRÃO-FILHO et al., 2009; GOMES et al., 2009; GUEDES et al., 2014). Os eventos de florações registrados nesses ambientes têm como espécies dominates Raphidiopsis raciborskii (antes Cylindrospermopsis raciborskii), Microcystis aeruginosa, Dolichospermum circinalis (antes Anabaena circinalis) e Planktothrix agardhii. Estas espécies são descritas como potencialmente produtoras de toxinas e registradas em inúmeros sistemas aquáticos brasileiros (DOMINGOS et al., 1999; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000; YUNES, 2009; DÖRR et al., 2010; FONSECA et al., 2015; PASSOS et al., 2022).

Por conseguinte, o presente estudo se propõe a contribuir significativamente para o desenvolvimento do campo de restauração de ecossistemas aquáticos no Brasil, uma vez que a expertise e experiência no controle e mitigação da eutrofização e das florações de cianobactérias em águas superficiais brasileiras são ainda incipientes.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ocorrência de microcistinas e outros cianopaptídeos em dois sistemas aquáticos tropicais eutrofizados, compreender e avaliar a possível liberação e o destino de cianotoxinas após a aplicação de combinações de coagulantes e adsorventes de fósforo em fase sólida (Técnicas: *Floc & Sink*, *Floc & Lock* e *Kill*, *Floc & Sink*) para controle da eutrofização e de florações de cianobactérias nestes mesmos sistemas.

#### **Objetivos específicos**

## Capítulo I

 Avaliar a sazonalidade de microcistinas intra e extracelulares e suas variantes no Reservatório do Funil;

 Identificar a influência das condições abióticas sobre as concentrações de microcistinas e em seu perfil de variantes;

 Avaliar a relação da concentração de microcistinas e suas variantes com espécies potencialmente produtoras;

### Capítulo II

 Avaliar a sazonalidade de microcistinas intra e extracelulares e suas variantes na Lagoa de Jacarepaguá;

- Identificar a influência das condições abióticas sobre as concentrações de microcistinas e em seu perfil de variantes;
- Avaliar a relação da concentração de microcistinas e suas variantes com espécies potencialmente produtoras;

Capítulo III, IV e V

Avaliar quais são os potenciais efeitos de técnicas *Floc & Sink* sobre a liberação e destino das toxinas em pequena escala (microcosmos – Cap. III e IV)

e em larga escala (mesocosmos - Cap. V) no Reservatório do Funil;

Capítulo VI e VII

 Avaliar quais são os potenciais efeitos da técnica *Kill, Floc & Sink* sobre a liberação e destino das toxinas em pequena escala (microcosmos– Cap. VI) e em larga escala (mesocosmos – Cap. VII) na Lagoa de Jacarepaguá;

Capítulo VIII

 Identificar as principais classes de cianopeptídeos e a toxicidade de um extrato complexo de cianobactérias obtido a partir de biomassa coletada em um reservatório eutrófico no sudeste do Brasil através de métodos metabolômicos e quimiométricos;

#### **METODOLOGIA GERAL**

#### Monitoramento sistêmico

O monitoramento ocorreu mensalmente no ano de 2019 no Reservatório do Funil e na Lagoa de Jacarepaguá, onde as concentrações de clorofila-*a* e as variáveis da qualidade d'água, tais como temperatura, pH, condutividade, turbidez e concentração de nutrientes além das concentrações de MC e suas variantes foram avaliados. Características específicas de cada ambiente serão detalhadas em seus respectivos capítulos.

#### Microcosmos

Amostras de água foram coletadas de ambos os ambientes estudados, levadas ao laboratório e dispostas em cores (1L). Os cilindros foram tratados com uma seleção de adsorventes de P em fase sólida (p. ex. betonita modificada com lantânio e solo vermelho do reservatório do Funil), coagulantes (p. ex. cloreto de polialumínio) e algicida ( $H_2O_2$ ). A combinação foi definida de acordo com as condições limnológicas do ambiente e sua respectiva população de cianobactérias. Os testes com os tratamentos foram realizados usando triplicatas dos cilindros. As concentrações de clorofila-*a* e a eficiência do fotossistema II ( $\Phi$ PSII) foram avaliados. Nutrientes (N e P) e pH foram monitorados. A

concentração de MC foi determinada em LC-MS/MS. O detalhamento da metodologia ocorrerá nos respectivos capítulos. Essa etapa serviu como base para escolha e acerto das dosagens dos compostos utilizados nos tratamentos a serem aplicados no experimento de mesocosmos.

#### Mesocosmos

Os estudos em mesocosmos tiveram como objetivo avaliar os potenciais efeitos colaterais sobre liberação e destino das toxinas após a aplicação das técnicas de mitigação de floração em larga escala. No reservatório do Funil e na Lagoa de Jacarepaguá foram instalados mesocosmos em plástico de formato cilíndrico, com diâmetro de 1m e abertos no fundo permitindo as trocas com o sedimento. Os mesocosmos receberam os mesmos tratamentos utilizados em laboratório nos testes de microcosmos. As mesmas avaliações descritas no item 3.2.1 foram realizadas nesta etapa. O detalhamento das metodologias utilizadas encontra-se nos respectivos capítulos.

# **1** ARTIGO: CYANOPEPTIDES OCCURRENCE AND DIVERSITY IN A BRAZILIAN TROPICAL RESERVOIR: EXPLORING RELATIONSHIPS WITH WATER QUALITY PARAMETERS

#### Abstract

Microcystin (MC) is a toxic secondary metabolite produced by some cyanobacteria strains that endanger aquatic and terrestrial organisms in various freshwater systems. Although patterns in MC occurrence are being recognized, divergences in the global data still hamper our ability to predict the toxicity of cyanobacterial blooms. This study aimed to determine the occurrence, concentrations, and dynamics of MCs, as well as the presence of other cyanopeptides in a tropical reservoir. Additionally, the study aims to investigate the correlation between MCs variants and potential cyanotoxin producers while identifying the possible abiotic factors that influence the occurrence and concentration of each MC variant. We analyzed, monthly, the total MC concentrations, with eight MC variants (MC-RR, -LA, LF, -LR, -LW, -YR, [D-Asp3]-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]-LR), and other peptides beyond MCs in 48 water samples from two sampling sites in a tropical eutrophic freshwater reservoir, in southeastern Brazil. The cyanopeptides were assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Also, the biomass of potential cyanobacterial producers and water quality variables were measured. MC was detected in both sampling sites year-round; the total MC concentration varied from 0.21 to 4.04  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, and three MC variants were identified and quantified (MC-RR, [D-Asp3]-RR, -LR). Additionally, we identified 28 compounds belonging to three more cyanopeptides classes: aeruginosin, microginin, cyanopeptolin. As the potential MC producer, Microcystis spp. and and Dolichospermum circinalis were dominants during the study, representing up to 75% of the total phytoplanktonic biomass. The correlational and redundancy analysis suggested positive effects of dissolved oxygen, nitrate, and total phosphorus on MC concentration, while temperature above 27°C appears to affect MC negatively. A comparison between our results and historical data showed a reduction in total phosphorus and cyanobacterial biomass, suggesting an increase in water quality in the reservoir; however, the current MC concentrations indicate a rise in cyanobacterial toxicity over the last eight years. Moreover, our study underscores the pressing need to explore cyanopeptides beyond MCs in tropical aquatic systems.

### **INTRODUCTION**

Harmful cyanobacteria and their toxins have raised as a global environmental challenge for modern society (CHORUS; WELKER, 2021). Blooms of cyanobacteria in freshwater systems have increased in frequency and intensity with anthropogenic eutrophication, resulting in ecosystem degradation and adverse consequences on human health and global economies (PAERL; HUISMAN, 2008; O'NEIL et al., 2012).

Cyanobacteria blooms are often accompanied by production of a variety of cyanotoxins typically classified according to the organ they target: hepatotoxins (liver), neurotoxins (nervous system), and dermatotoxins (skin). It appears that the most hazardous group of cyanotoxins found in cyanobacterial blooms is hepatotoxic and tumor promoting microcystins (MCs) (SIVONEN; JONES, 1999; BOUAÏCHA et al., 2019; SVIRČEV et al., 2019). These toxins are widely present throughout the world, representing 79% of total cases of cyanotoxins records in Asia, 55% in Australia and New Zealand, 58% in Europe, 57% in North and Central America, and 63% in South America (SVIRČEV et al., 2019). Various genera of cyanobacteria, such as *Microcystis*, *Planktothrix, Nostoc, and Dolichospermum* are known to produce microcystins (MCs) (FASTNER; HUMPAGE, 2021). However, genus or species may contain both producing (toxigenic) and non-producing strains (OKSANEN et al., 2004; MOWE et al., 2014; HARKE et al., 2016; MERILUOTO; SPOOF; CODD, 2016; BURATTI et al., 2017, 2017). In addition, about 300 MC variants have already been recognized (JONES et al., 2020) and many MC variants can be synthesized by one toxigenic strains simultaneously (PUDDICK et al., 2014), although usually in most genera, one to three variants tend to be more prevalent than the others (FASTNER; HUMPAGE, 2021).

In general, the seasonal succession of cyanobacteria is strongly related to the presence and temporal variation of MC by the fluctuation of toxic and non-toxic genotypes (MEISSNER; FASTNER; DITTMANN, 2013). On the other hand, there is a significant influence of environmental factors selecting toxic strains, and on the MC biosynthesis (WU et al., 2006; MEISSNER; FASTNER; DITTMANN, 2013; BASHIR et al., 2023). Field observations associated with laboratory evaluations have provided a framework for the typical conditions in which a toxigenic cyanobacterial bloom may occur: nutrient availability, light, iron limitation, temperature, and pH (SONG et al.,

1998; KAEBERNICK et al., 2000; OH et al., 2000; SEVILLA et al., 2008; DZIALLAS; GROSSART, 2011; PUDDICK et al., 2016). Nevertheless, the global data indicates a wide variability in conditions most related to MC occurrence (KOTAK et al., 2000; BILLAM et al., 2006; WU et al., 2006; DUONG et al., 2013; GONZÁLEZ-PIANA et al., 2017; BULEY et al., 2022; AGUILERA et al., 2023). In this way, systematic monitoring is an essential tool to measure temporal variations of MC in aquatic environments, providing vital data for the elaboration of public policies, in addition to efficient contingency plans during toxic bloom events (CHORUS; WELKER, 2021).

It is known that, in waterbodies containing the genera Microcystis and Planktothrix, MC were detected in 80–100% of the samples; when other genera, such as Dolichospermum were present, MC were less frequently detected (CHORUS, 2001; GRAHAM et al., 2010; GKELIS; ZAOUTSOS, 2014; CHORUS; WELKER, 2021). Usually reported as total MC concentrations (SIVONEN; JONES, 1999), few studies have examined the MC variants on a temporal and spatial scale in tropical aquatic systems, especially in Latin America; the cost of detecting cyanotoxins is expensive, and the necessary equipment for some methods is not typically found in most laboratories in developing and underdeveloped countries (AGUILERA et al., 2023). In Latin America the most frequently detected MC variants are LA, LR, RR, YR, LF, D-Asp<sup>3</sup>, and (E)-Dhb<sup>7</sup>]-MC-RR, but data from 35% of countries are unavailable (AGUILERA et al., 2023); although, identification of MC variants is an important consideration, since the dominance of one variant over another in a bloom event will influence overall toxicity (CERASINO; SALMASO, 2012; MONCHAMP et al., 2014). In addition, there is a lack of data concerning the diversity, occurrence, (eco)toxicology, and effects of numerous cyanometabolites other than MC on recreational areas and drinking water supplies (JANSSEN, 2019; JONES et al., 2020).

Recent developments in analytical methods have enabled researchers to detect numerous cyanopeptides, expanding beyond the widely recognized MC class. These newly identified compounds encompass cyanopeptolins, anabaenopeptins, aerucyclamides, aeruginosins, and microginins (WELKER; VON DÖHREN, 2006), among others. Nevertheless, our understanding of the occurrence and concentrations in surface waters of various cyanopeptides classes remains limited and underexplored, especially in tropical aquatic systems (JONES et al., 2020). Ecotoxicological
investigations have hinted that the impacts of cyanobacterial extracts cannot be solely ascribed to MCs, emphasizing the importance of studying and considering other bioactive metabolites when evaluating potential risks (BAUMANN and JÜTTNER, 2008; KEIL et al., 2002; LE MANACH et al., 2016; SMUTNÁ et al., 2014).

Thus, this study aimed: (i) determine the occurrence, concentrations, dynamics of MCs variants (extracellular and intracellular), and the occurrence of other cyanopeptides in a tropical reservoir; (ii) investigate the correlation between MCs variants with potential cyanotoxin producer's; (iii) identify the possible abiotic factors that influence the occurrence and concentration of each MC variant.

## MATERIALS AND METHODS

#### Study area

The Funil Reservoir (4000 ha) is considered a eutrophic system in Rio de Janeiro state, southern Brazil (22°30'S, 44°45'W; Fig. 1), at 440 m of altitude, in a warm-rainy tropical climate area (Aw in the Köppen, ALVARES et al., 2013). The reservoir has an area of 40 km<sup>2</sup>. It presents a total volume of 8.9 billion m<sup>3</sup>, a maximum depth of 70 m, and an average of 22 m, which may vary according to rainfall and water residence time (SOARES et al., 2009). The Funil reservoir is part of the hydraulic system of the Paraíba do Sul River, a complex of reservoirs distributed in cascades, which operates in an orchestrated manner to regularize the flow of the Paraíba do Sul River, mitigating the impacts of floods and allowing the transposition of the volume of water as the primary source of water supply for the metropolitan region of Rio de Janeiro (SANTOS-NEVES et al., 2023).

# Sampling and analysis

Samples were collected monthly during 2019 from two different sites (FL35 and FL50), both already monitored in previous studies (SOARES et al., 2009; GUEDES et al., 2014). FL35 is in the main body of the reservoir, in a post-transition region; it has a historical average depth of 36m and higher chlorophyll concentration during the rainy season. On the other hand, FL50 is located close to the dam, has an average depth of 47m and higher concentrations of chlorophyll in the dry season. (Fig. 1). Water transparency at each sampling site was estimated by Secchi depth (SD), and euphotic zone (Z<sub>eu</sub>), estimated as 2.7 times the SD (COLE, 1994). Water temperature (WT), pH, and dissolved oxygen (DO), saturation O<sub>2</sub>, conductivity, turbidity, alkalinity were measured with a multiparameter sonde (YSI model 600R) throughout the water column. Chlorophyll, cyanobacteria, cyanopeptides and nutrients samples were obtained from integrated sampling of the euphotic zone (Z<sub>eu</sub>), when the reservoir was not stratified. During stratified conditions, the samples were integrated from epilimnion. Integrated analyzer

sampling was carried out using a Van Dorn bottle every 0.5m.; samples were collected and homogenized in a container before being aliquoted for toxins and other analyses. Phytoplankton samples were immediately preserved with Lugol's solution. Cvanobacterial species and other phytoplankton populations were enumerated according to the settling technique (Utermöhl 1958) in random fields (Uhelingher 1964), using an inverted microscope (Zeiss Oberkochen, Axiovert10). Biovolume (mm<sup>3</sup>  $L^{-1}$ ) was estimated by multiplying the density of each species by the average volume of its cells (Hillebrand et al., 1999). Total and cyanobacterial chlorophyll-a concentrations  $(\mu g L^{-1})$  was determined using a PHYTO-PAM phytoplankton (HeinzWalzGmbH, Effeltrich, Germany). Total nitrogen (TN), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); nitrite  $(NO_2-)$ , ammonium  $(NH_4^+)$ , dissolved inorganic nitrogen (DIN), total phosphorus (TP), and soluble reactive phosphorus (SRP) concentrations were analyzed by an automated colorimetric flow injection analysis system (FIA) equipped with an autosampler (model FIAlab-2500, FIALab Instruments Inc., Seattle, Washington) according to the manufacturer protocols. Samples for dissolved nutrients were filtered through GF-3 filters (Macherey-Nagel). Samples for total nutrients were first digested with potassium persulfate, then analyzed as SRP and nitrate (GROSS; BOYD, 1998). The dissolved inorganic nitrogen (DIN) was considered as the sum of N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, and N-NH<sub>4</sub><sup>-</sup>. Approximately 900 ml of samples were filtered (GF-3 filters (Macherey-Nagel) in the laboratory, the filters were used for quantification of the intracellular MC and other cyanopeptides. The filtrates (8 ml) were used to analyze the extracellular MC. Sample

processing for toxin analysis was performed as described in Arruda et al., (2021). Rainfall data were obtained from the free database of the Instituto Nacional de Meteorologia (https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos).



## Fig. 1. Geographic location of the Funil Reservoir

Subtitle: Geographic location of the Funil reservoir and sampling sites are showed: FL35 in the main body of reservoir and FL50 close to the dam.

## LC-MS/MS Parameters - Microcystins Quantification

MC were quantified using a 1260 Infinity chromatographic system, consisting of a 1290 VL pump, coupled with a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (HPLC-QqQ) (Agilent Technologies,Santa Clara, USA). The electrospray ionization source (ESI) was utilized in the positive mode at 3500 V. Nitrogen was used as the nebulizer (45 psi) and drying gas (5 mL min<sup>-1</sup> at 300 °C). A total of 10  $\mu$ L of each and blank samples were injected, and the chromatographic separations were carried out on a Luna C18 column (2) ( $150 \times 2 \text{ mm} \times 3 \mu \text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), performed at a 0.25 mLmin<sup>-1</sup> flow rate at 40 °C following a gradient ratio between phases A and B, with acetonitrile gradients ranging from 25 to 95 %. The mobile phases encompassed: Phase A - water containing 0.1% formic acid, and Phase B - acetonitrile. The initial composition started at 75% A, followed by a linear gradient reaching 95% B over 10 minutes. Subsequently, a holding period of 1.5 minutes at 95% B was observed. The initial composition of 75% A was then restored in 0.5 minutes and maintained for 6 minutes to permit column re-equilibration before the subsequent injection.

Prior to sample injection, the needle was washed in the flush port using acetonitrile/water (50:50, v/v) for 5 seconds. The QqQ instrument functioned in both full scan mode and selected reaction monitoring (SRM) mode, with the selection of specific m/z transitions. Monitoring took place in the positive ion mode for both single and double-charged ions. The retention times of eluted peaks were cross-referenced with the MC standards. Characteristic precursor ions in SRM were established as follows: m/z 519 (RR), m/z 512 ([D-Asp3], RR), m/z 995 (LR), m/z 981 ([D-Asp3], LR), m/z 910 (LA), m/z 1045 (YR). Furthermore, diagnostic MC ions, specifically 135 m/z for Adda and 213 m/z for Glu-Mdha, were subjected to continuous monitoring.

Calibration standards of non-demethylated MCs were obtained from Abraxis (Eurofins®, Nantes, France) and prepared in methanol 75%. MC quantitation employed calibration curves, with linearity assessed using standard solutions ranging from 0.5  $\mu$ gL<sup>-1</sup> to 4  $\mu$ gL<sup>-1</sup> for MC-RR, [D-Asp3]MC-RR, MC-LR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LA, MC-LF, and MC-YR. Quantification of the demethylated MC structures was performed by relative quantification using the corresponding non-demethylated MC as analytical standards. Data processing was carried out using the Mass Hunter Qualitative Analysis Software and Mass Hunter Quantitative Analysis Software from Agilent Technologies, USA.

# LC-MS/MS Parameters - Metabolomics to cyanopeptides

Analyses were carried out on an LC-20D Shimadzu Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, USA) equipped with an electrospray source and controlled by a Bruker Compass/HyStar workstation. Intracellular extract samples and blank samples (MeOH 100%) were injected (10 µL) onto a Luna C18 (2) column  $(150 \times 2.1 \text{ mm}, 2.6 \text{ }\mu\text{m})$  (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of ultra-pure water obtained from a direct-Q8 water purification system (Millipore, Billerica, USA) (A) and acetonitrile (Sigma-Aldrich) (B), both containing 0.2% formic acid (Sigma-Aldrich). All solvents used in the study were HPLC grade. Chromatographic separation was performed at a 0.4 mL.min<sup>-1</sup> flow rate with a linear gradient of solvent B, from 5% to 90%, over 25 min. Ionization source conditions were as follows: positive ionization, capillary potential of 4000 V, drying gas temperature (N2) 200°C at a flow rate of 8 mL/min, and nebulizer pressure of 45 psi. Mass spectra were acquired using electrospray ionization in positive mode over an m/z range of 50– 1800. QTOF operated in MS scan mode and auto MS/MS mode, performing MS/MS experiments on the three most intense ions from each MS survey scan. The mass calibration was performed with sodium formate (Sigma-Aldrich). High-resolution MS (HRMS) data were processed using Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonics, Germany).

LC-MS/MS data were converted to .mzXML format with DataAnalysis<sup>©</sup> software and pre-filtered in  $MSConvert^{\odot}$ . The data were entered into the  $GNPS^{\odot}$ platform (https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp) to generate the molecular network using the Classical Molecular Networking tool. Along with the sample data, data of MS2 internal standard of known compounds were also introduced into the GNPS and seeded into the molecular network (aeruginosin NAL2 m/z 587.3571  $[M+H]^+$ ; guanitoxin m/z 253.1051  $[M+H]^+$ ; cyanopeptolin 1020 m/z 1021.5368  $[M+H]^+$ ; cyanostatin B m/z 754.4426  $[M+H]^+$ ; mycosporins-lysine m/z 317.1368  $[M+H]^+$ ; microginin KR787 *m/z* 788.4016  $[M+H]^+$ ; namalide B *m/z* 576.3391  $[M+H]^+$ ; namalide C m/z 562.3235 [M+H]<sup>+</sup>; namalide D m/z 560.3561 [M+H]<sup>+</sup>; nodularin-R m/z825.4490 [M+H]<sup>+</sup>; Dhb5-nodularin *m/z* 811.4328 [M+H]<sup>+</sup> porphyra 334 *m/z* 347.1431  $[M +H]^+$ ; shizopeptin 791 m/z 792.4802  $[M+H]^+$ ; shinorine m/z 333.128  $[M+H]^+$  and spumigin 638 m/z 639.3109  $[M+H]^+$ ). Cytoscape<sup>©</sup> software was used to visualize molecular networks. The SIRIUS<sup>©</sup> and ChemCalc<sup>©</sup> platforms were used to search for prospective molecular formulas. The search for known compounds took place in the databases PubChem<sup>©</sup>, Chemspider<sup>©</sup>, Metlin<sup>©</sup>, NPAtlas<sup>©</sup>, Dictionary of Natural Products<sup>©</sup>, GNPS, MetaboScape 4.0 (Bruker Daltonics, Germany) software and CyanoMetDB (JONES et al., 2020).

## **Statistical Analysis**

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis performed using Canoco® 5.0 software aiming to find patterns in the data matrix. Normality Test (Shapiro-Wilk), Equal Variance Test (Brown-Forsythe), ANOVA (Two-way) and post-hoc test (Holm-Sidak) was performed using Sigmaplot® software, aiming investigate variance between groups besides univariate dimension with a possible interaction

hoc test (Holm-Sidak) was performed using Sigmaplot® software, aiming investigate variance between groups besides univariate dimension with a possible interaction between the source of variation; non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis performed using Canoco® 5.0 software; Pearson's correlation Analysis and Redundance Analysis (RDA) performed with R Studio® 4.0.2 and Canoco® 5.0 software, respectively, were applied to the dataset to explore relationships between variables.

# RESULTS

Firstly, we used non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis to recognize and interpret patterns in our data matrix; MC data was used as a response variable, and environmental data was the explanatory variable. The two axes of the matrix segregated two groups, months in which MC concentration was below  $0.6 \,\mu g \, L^{-1}$  (Feb – Jul) and months in which MC concentration was above  $0.80 \,\mu g \, L^{-1}$  (Aug – Jan), resulting in 97.05% of cumulative percentage variance of response data (Fig. 2). The stress obtained for the data was < 0.03. From this analysis, we assume two different periods of time in the reservoir regarding MC, one of low MC and another one of high MC. It was evident that the months with a high concentration of MC coincided with the period of high rainfall, ~ 142.66 mm<sup>3</sup> (Aug-Jan), but not necessarily with the tropical rainy season (Oct-Mar). The accumulated volume of rain is exhibited in the table 1. This is due to the anticipation of rainfall in the year of the study due to the El Niño phenomenon.

Fig. 2. Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) of the data matrix of environmental variables measured in the Funil Reservoir.



Subtitle: Ellipsis contain temporal units similar to each other within the 95% confidence interval: months with microcystins concentration under 0.6  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Feb – Jul) (open circles) and months with MC concentration above 0.80  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Aug – Jan) (filled circles).

Regarding environmental variables, the two-way ANOVA was performed considering as factors sampling sites and the two MC periods exhibited previously in NMDS analysis. No significant differences in  $Z_{eu}$ , WT, DO, Saturation O<sub>2</sub>, pH, Conductivity, Turbidity, Alkal, NO<sub>3</sub>-, NO<sub>2</sub>-, NH<sub>4</sub>-, DIN, TN, SRP, TP, and N:P between sampling sites. Thus, we exhibit the median of variables for the two sites in Table 1. The reservoir has a median of 18 µg L<sup>-1</sup> TP, ranging from 4 to 102 µg L<sup>-1</sup>, and the TN ranged from 232 to 2807 µg L<sup>-1</sup>, with a median of 1341 µg L<sup>-1</sup>; an annual median of 4.7 µg L<sup>-1</sup> of total chlorophyll-a, being the highest value, 29.2 µg L<sup>-1</sup>, recorded in January. The system was turbid, with the lowest light availability in January ( $Z_{eu} = 1.4$  m) and the highest in June ( $Z_{eu} = 8.1$  m), corresponding to the variation in total chlorophyll-*a*.

Cyanobacteria chlorophyll presented spatial variance; the mean recorded in FL35 was 8.2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, while FL50 presented 3.2  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (F<sub>1,20</sub> = 7.89; P < 0.05). The water column depth also varied according to the sampling sites; FL35 presented a mean of 39.5 (± 2.9) m of deep, and FL50 had 53.2 (± 3.3) m (F<sub>1,20</sub> = 129.30; P < 0.05).

The average of environmental variables of two groups defined in NMDS analysis also are showed in table 1. Regarding the months with high MC, we recorded an accumulated rainfall volume of 142.66 mm<sup>3</sup>, and a significative increase of mean in cyanobacteria chlorophyll (9.9  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), pH (8.3), turbidity (25.8 NTU) and TP (43.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and reductions of Z<sub>eu</sub> (3.0 m). In contrast, months with low MC presented 62 mm<sup>3</sup> of accumulated rainfall, 1.4  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and reduction in the mean of cyanobacteria chlorophyll, with the highest Z<sub>eu</sub> values, and consequently low turbidity (12.4 NTU), neutral pH, and low TP (17.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup>).

Table 1. Medians and range of euphotic limnological variables, measured in Funil Reservoir and a mean of euphotic limnological variables from months with high and low microcystins concentration.

Limnological variables								
	Year	High MC	Low MC	F value				
Zeu (m)*	3.7 1.4 - 8.1	3.0	5.0	13.9				
Water Temp (°C)	25.6 21.3 - 30.8	25.5	26.5	0.4				
DO (mg $L^{-1}$ )	8.0 3.4 - 12.8	9.6	7.5	3.4				
Saturation $O_2$ (%)	90.7 40.2 - 156.3	98.5	86.0	3.7				
pH*	7.3 5.0 - 10.2	8.7	7.1	6.6				
Conductivity ( $\mu$ S cm <sup>-1</sup> )	85.5 70 - 145	73.0	89.5	4.0				
Turbidity (NTU)*	13.3 3.8 - 59.4	22.8	7.7	6.7				
Alkalinity (µEq L <sup>-1</sup> )	412.7 88 - 647.5	445.7	395.8	0.1				
$NO_{3}$ - (µg $L^{-1}$ )	531.1 22.5 - 915.4	450.7	642.7	2.3				
$NO_{2}$ - (µg L <sup>-1</sup> )	4.2 1.6 - 37.4	8.2	4.2	0.2				
$NH_{4}$ - (µg $L^{-1}$ )	62.1 24.7 - 448.9	50.7	74.1	1.0				
DIN ( $\mu g L^{-1}$ )	656.9 50.7 - 1109.1	527.2	789.8	3.2				
NT ( $\mu g L^{-1}$ )	1340.9 232.4 - 2807.1	1388.2	1182.3	0.2				
SRP ( $\mu g L^{-1}$ )	5.6 3 - 42.3	5.3	5.3	0.0				
TP (µg L-1)*	17.8 3.9 - 102	35.0	14.7	6.6				
N:P	48.9 7 - 366	39.1	69.4	0.6				
Rainfall (mm <sup>3</sup> )	48.9 7 - 366	142.7	62.0	20.6				
Chl- <i>a</i> Total ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )	4.8 1 91 – 29 18	7.1	7.9	0.1				
Chl- <i>a</i> Cyano ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )*	2.4 1 - 26.64	8.9	1.0	22.4				

Subtitle:  $Z_{eu}$  euphotic zone, WT water temperature, DO dissolved oxygen, Saturation O<sub>2</sub>, pH, Cond electrical conductivity, Turbidity, Alkal alkalinity, NO<sub>3</sub>- nitrate; NO<sub>2</sub>- nitrite and NH<sub>4</sub>- ammonium, DIN dissolved inorganic nitrogen, TN total nitrogen, SRP soluble reactive phosphorus, TP total phosphorus, N:P rate nitrogen/phosphorus; Rainfall; Chl-*a* Total, total chlorophyll-a; Chl-*a* Cyano, cyanobacteria chlorophyll.

\* Significant difference between months with high and low MC concentration (P < 0.05).

### Spatio-temporal microcystins variation

We detected MC in 47 samples collected during the study (2 sampling sites x intra and extracellular samples for one year). The total MC varied from 0.2 to 4.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, mean 1.25  $\pm$  1.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 3). The two-way ANOVA showed no differences between sampling sites (F<sub>1,19</sub> = 2.61; P > 0.05), but presented differences regarding MC periods (F<sub>1,19</sub> = 15.20; P < 0.05); The total MC concentrations from August to January presented a mean of 1.69  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, while from February to July the mean was 0.49  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Although the two-way ANOVA no show interaction between sampling sites and MC periods (F<sub>1,19</sub> = 2.76; P > 0.05), the highest MC concentration was recorded in October at FL35.

Fig. 3. Total microcystins concentrations in FL35 and FL50 sampling sites at Funil Reservoir.



Subtitle: Months with high microcystins ( $\geq 0.80 \ \mu g \ L^{-1}$ ; gray shadow); months with low MC concentration ( $\leq 0.80 \ \mu g \ L^{-1}$ ; white shadow). NA – not analyzed.

Three MC variants (MC-RR, [D-Asp<sup>3</sup>]-RR, -LR) were quantified in water samples from FL35 and FL50. MC-RR was the most abundant in the intracellular (mean 0.60  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and extracellular (mean 0.12  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) samples, followed by [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR (mean 0.15  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and 0.08  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) (Fig. 4). The MC-LR had the lowest abundance and only appeared in the intracellular samples when the total MC was above 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. In addition to the three quantified MC variants, we identified in the intracellular samples the MCs [D-Asp<sup>3</sup>]LR, -LY, -LA, and -LF but below quantification limit.

The FL35 site had an intra-MC mean of 1.11 ( $\pm$  1.28) µg L<sup>-1</sup> and the FL50 site of 0.62 ( $\pm$  0.45); there were no significant differences between sites (F<sub>1,19</sub> = 1.14; P > 0.05) (Fig. 4a, c). From Aug-Jan a mean of 1.4 µg L<sup>-1</sup> was recorded, representing seven times more intra-MC than recorded from Feb-Jul (F<sub>1,19</sub> = 15.24; P < 0.05), but there was no interaction between sampling sites and period s of time (F<sub>1,19</sub> = 2.79; P > 0.05).

Fig. 4. Concentrations of intracellular and extracellular microcystins variants in FL35 (a, b) and FL50 (d, e) sampling sites at Funil Reservoir.



Subtitle: NA - not analyzed.

The extracellular MC concentration mean was similar in both sites  $(0.21 \pm 0.007 \ \mu g \ L^{-1})$  and ranged from 0.20  $\mu g \ L^{-1}$  to 0.23  $\mu g \ L^{-1}$  throughout the study (F<sub>1,19</sub> =; P > 0.05) (Fig. 4b, d). The MC-RR variant had 1.5 times higher concentrations than the [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR in extracellular samples. There were no differences between MC periods (F<sub>1,19</sub> = 0.76; P > 0.05), and no interactions between sites and time (F<sub>1,19</sub> = 0.11; P > 0.05). The MC-RR variant ranged from 0.12 to 0.15 at both sites, while [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR ranged from 0.08 to 0.1  $\mu g \ L^{-1}$ .

# Potential microcystin producer's

Cyanobacteria dominated the reservoir year-round, representing a mean of 85.21  $(\pm 14)$  % of the total phytoplankton biovolume. Among cyanobacteria, the potential MC producers represented 73% of the biovolume in FL35 and 65% in FL50. *Dolichospermum circinalis, Microcystis aeruginosa,* and *Microcystis flos-aquae* were more representative of potentially MC-producing species (Fig. 5). *Synechococcus* 

*nidulans* represented 0.8% and 0.4% of MC-producing biovolume in FL35 and FL50, respectively.

Statistical analysis did not show spatial variation in cyanobacteria biovolume ( $F_{1,20} = 2.11$ ; P > 0.05) and potential MC producers' biovolume ( $F_{1,20} = 0.63$ ; P > 0.05), as well as individual biovolume of *D. circinalis* ( $F_{1,20} = 0.11$ ; P > 0.05), *M. aeruginosa* ( $F_{1,20} = 0.09$ ; P > 0.05), *M. flos-aquae* ( $F_{1,20} = 0.98$ ; P > 0.05), and *S. nidulans* ( $F_{1,20} = 0.03$ ; P > 0.05). However, temporally, in time with higher MC, cyanobacteria presented 8.4 (± 4.9) mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>, three times more biovolume than months with lower MC, 2.9 (± 2.1) mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> ( $F_{1,20} = 11.06$ ; P < 0.05). It was particularly due to increase of *M. aeruginosa* ( $F_{1,20} = 10.83$ ; P < 0.05) and *S. nidulans* ( $F_{1,20} = 3.89$ ; P < 0.05); while *D. circinalis* did not presented significative variation over year ( $F_{1,20} = 0.23$ ; P > 0.05), *Microcystis* spp. and *S. nidulans* rise their biovolume ~13 times in Aug-Jan.

Fig 5. Potential microcystins producer biovolume (mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>) in FL35 (a) and FL50 (b) sites at Funil Reservoir in 2019.



Relationship between microcystins and environmental factors

The total MC, intra-MC, and the variants -RR and  $[D-Asp^3]$ -RR were significantly and positively correlated with cyanobacteria chlorophyll, potential MC producer's ' biovolume, NO<sub>3</sub>- and DIN; TP presented positive correlation with total MC, intra-MC, and MC-LR (P <0.05; Fig. 6); TN was positively correlated with MC-LR (P <0.05; Fig. 6); DO, in your turn, showed a positive correlation with total MC, intra-MC, and the variants -RR and -LR (P <0.05; Fig. 6). A negative correlation was observed between Secchi and total MC, intra-MC, and -RR (P <0.05; Fig. 6). Extra-MC had no significant correlation with any of the parameters. Cyanobacteria density and MC producer's density showed no significant correlations with MCs (total, intra, extra, variants).



Fig. 6. Pearson correlation analysis among microcystins and environmental variables.

Subtitle: Biov\_Cyan – cyanobacteria biovolume; Biov\_Prod – microcystins producer's biovolume; Cyan\_Chla – cyanobacteria chlorophyll-a; Dens\_Cyan – cyanobacteria density; Dens\_Prod – microcystins producer's density; WT – water temperature; DO – dissolved oxygen; pH – hydrogen potential; Cond conductivity; Secchi secchi disc; TP total phosphorus; TN total nitrogen; NO<sub>3</sub>- nitrate; NO<sub>2</sub>- nitrite and NH<sub>4</sub>- ammonium, DIN dissolved inorganic nitrogen, SRP soluble reactive phosphorus: Rain – rainfall; MC\_Total – total microcystins; Intra\_MC – intracellular MC; Extra\_MC – extracellular MC; Pearson correlation coefficients can range from -1 (perfect negative correlation) to +1 (perfect positive correlation). Asterisks indicate a significant correlation between two variables (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P< 0.001).

In the RDA, we determined the effect of environmental variables specifically on the MC variants (sum of intra and extra-MC). The first two axes explained 63.84% of the data variability (axis 1 = 54.03%; axis 2 = 9.81%, Fig. 7). All MC variants were

associated with axis 1. The MC-LR was correlated positively with TP and TN; the MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR was positively correlated to NO<sub>3</sub>- and rainfall. On the other hand, all MC variants were negatively correlated with Secchi, conductivity, NO<sub>2-</sub>, and WT.

Fig. 7. Ordination diagram of redundancy analysis (RDA) encompassing MC variants and environmental variables.



Subtitle: (a) microcystins variants associated with environmental factors. WT – water temperature;  $Z_{eu}$  – euphotic zone; DO – dissolved oxygen; pH – hydrogen potential; NO<sub>3</sub>-nitrate; NO<sub>2</sub>- nitrite and NH<sub>4</sub>- ammonium, SRP soluble reactive phosphorus; Rain – rainfall; MC-RR, MC-LR and [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR – microcystins variants.

#### Other cyanopeptides

The intracellular samples were additionally analyzed for oligopeptides other than MCs. We identified 28 compounds belonging to three more cyanopeptides classes: aeruginosin, microginin, and cyanopeptolin. All oligopeptides besides MC and their respective m/z are listed in table 2; their presence for both sampling sites also are show

in the Tab.2. Here we highlight, among 18 aeruginosins found in the samples, five of them were restrict to the rainy season; the aeruginosin - Spumigin 654 (m/z 655) and aeruginosin (m/z 593) were present year-round in both sampling sites; aeruginosin 618 (m/z 621), aeruginosin (m/z 635, 642) were detected only in FL50, while aeruginosin 602 was only presents in FL35. Eight different microginins and two cyanopeptolins were identified in the particulate samples and their presence randomly varied during the study, being present in the dry and rainy seasons.

Table 2. Cyanopeptides other than microcystins in FL35 and FL50 sampling sites at Funil Reservoir.

D .: 1 .01	,	<i>m/z</i> meas. Putative compound	Sites	Time											
reptide Class m/z mea	m/z meas.			JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC
	671.337	Aeruginosin	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	277 <b>6</b>	11020	6887	3391
			FL 50	1584	0	0	0	0	0	0	0	380	0	0	0
685.3	685.352	Aeruginosin	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	1935	10159	0	1771
			FL 50	1247	500	0	616	0	0	0	0	217	178	0	0
	655.389	Aeruginosin - Spumigin 654	FL 35	9184	3720	393	2383	1731	764	1189	5727	7853	10260	20320	11568
			FL 50	9146	3875	7 <b>6</b> 5	1598	0	1062	3242	3774	9532	4618	0	2640
621.405	621.405	Aeruginosin 618	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			FL 50	51795	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	635.375	Aeruginosin	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			FL 50	10291	4541	649	0	0	0	0	0	1246	1174	0	23306
603.347	603.347	Aeruginosin 602	FL 35	1018	13134	857	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			FL 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	635.422	Aeruginosin	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			FL 50	62931	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	605.365	Aeruginosin - Aeruginosin 298A	FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	8373	9748	0	0
			FL 50	104381	5806	650	0	0	0	0	0	1954	1988	0	42241
	689.273	Aeruginosin - Spumigin 654	FL 35	14426	0	0	0	376	0	0	0	0	359	0	0
		Aeruginosin 98-A	FL 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aeruginosin	609.433		FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6020
643.276 711.339		Aeruginosin	FL 50	0	11209	320	0	0	0	0	0	0	0	0	7806
	643.276		FL 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			FL 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3202	0	0
	711.339	Aeruginosin GE642	FL 35	12432	0	0	0	0	0	0	1357	1282	1788	1079	902
			FL 50	1917	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	693.396	Aeruginosin	FL 35	0	0	1359	2671	0	0	1691	4384	0	486	0	8631
			FL 50	0	12563	5326	2407	402	0	6173	16929	10141	0	0	3622
	677.401	Aeruginosin	FL 35	0	3 <mark>6741</mark>	18255	2958	1650	0	0	0	0	0	2944	52003
735.4			FL 50	107937	747 <mark>4</mark> 3	22359	5627	0	240	852	215	0	794	0	82256
	735.407	Aeruginosin - Aeruginosin KB676	FL 35	0	<b>3</b> 5150	12662	0	0	0	0	0	0	735	988	11352
			FL 50	35218	<mark>4</mark> 4939	31076	0	0	0	374	0	692	0	0	23854
677.37	677.37	Aeruginosin	FL 35	0	0	2809	0	348	0	0	0	5540	0	0	11766
			FL 50	26419	679	2156	1184	257	0	0	0	0	341	0	14534
593.32	593.328	Aeruginosin	FL 35	11951	13511	5737	9368	6874	3260	6054	13917	16718	17741	18931	21245
			FL 50	19397	15157	5034	7473	2459	5361	12004	13239	19980	19564	0	12595
	767.279	Aeruginosin	FL 35	8111	2962	0	2738	1845	477	3886	0	7397	23172	0	0
			FL 50	5958	2416	2007	1296	744	0	2648	4451	8867	9831	0	9129
575.353 591.374 768.454 754.437 Microginin 625.335 788.398 639.382 802.563	575 353	Microginin - Microginin KR604	FI 35	0	5862	3418	3216	0	0	840	6309	0	27838	6470	27081
	575.555	Macrogania - Macrogania relevot	FL 50	20106	3678	15699	3064	122	0	1405	7214	1133	5001	0	23032
	591 374	Microginin	FL 35	20100	6917	314	3130		216	2268	13173		138010	8260	29551
	551.574	incrogumi	FL 50	86509	5767	15716	5106	0	377	1317	12310	3376	6872	0200	28540
	768 454	Microginin - Microginin 767	FL 35	0	890	1227	0	0	0	0	864	4650	8058	15872	12642
		incrogram incrogram (o)	FL 50	8817	0	0	0	0	0	2348	4693	2377	0	0	0
	754 437	Microginin - Cyanostatin B	FL 35	0	2327	817	0	0	0	0	4541	0	75158	24001	30006
		FL 50	25643	0	0	272	0	0	4489	8714	10923	2130	0	6286	
	625,335	Microginin	FL 35	0	7785	1231	1014	0	171	2022	9310	0	120979	10107	24449
			FL 50	28399	6405	4503	1890	0	267	1000	8858	4372	3689	0	18055
	788,398	Microginin - Microginin GH787	FL 35	0	2969	0	0	0	0	0	3071	0	83252	26967	24070
			FL 50	14457	0	300	0	0	0	2632	5969	9424	0	0	2758
	639.382	Microginin	FL 35	2538	321	0	0	0	0	0	1417	11857	2842	2580	1187
			FL 50	0	238	232	0	0	0	0	0	15096	4471	0	0
	802.563	Microginin	FL 35	37096	2382	853	3158	4719	500	3829	9232	39158	39712	30270	7444
			FL 50	0	2099	711	2531	6190	4682	17560	21391	50476	56371	0	0
987.551 Cyanopeptolin	987.551	Cyanopeptolin	FL 35	0	2182	7277	0	6604	1579	5387	3209	3026	8356	65350	32423
			FL 50	6243	5363	0	12828	4261	2730	5074	0	0	12509	0	2618
	1,001,565	Cyanopeptolin	FL 35	0	5712	8280	7323	10673	127	7 <b>6</b> 40	0	5105	2045	32354	24498
			FL 50	7984	27396	0	14573	14741	6785	24164	19088	6426	4916	0	7797

Subtitle: The barplot refers to features compounds detected in the FL35 and FL50 sampling sites, with the respective identified peptide class, Mass-to-charge ratio (m/z) are means of experimental masses seen as positive ionization mode (ESI+). Bars represent the mean area intensities (n=3).

### DISCUSSION

This study provided a detailed description of microcystins' and other cyanopeptides occurrence and diversity in a Brazilian tropical reservoir. Our analysis identified year-round MCs, aeruginosins, microginins, and cyanopeptolins in the reservoir. MC was the only class that were quantified; other class beyond MC were compared by relative area and presented spatial and temporal variation. We did not record spatial heterogeneity in MC concentrations in the main reservoir body but observed remarkable temporal variation. Three MC variants were identified in the samples from reservoir, -RR, [D-Asp<sup>3</sup>]-RR and -LR; the highest MC concentrations were recorded between Aug-Jan, where we also recorded the increase of rainfall, cyanobacteria chlorophyll by rise of 9-fold of *M. aeruginosa* and *S. nidulans* species, or 13-fold regarding biovolume; but in the months with low MC concentrations, D. circinalis was dominant. Cyanobacteria chlorophyll was the biological parameter best associated with total MC, intracellular MC, and the three identified MC variants. At the same time, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and DO were the physicochemical parameters best associated with the MCs. The limited significance within the other 19 variables tested in this study comes as no surprise, considering our limited understanding of the function of most cyanobacterial secondary metabolites, including MC, and the factors responsible for their production (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; SIVONEN, 2009; HOLLAND; KINNEAR, 2013; NEILAN et al., 2013; HENAO; RZYMSKI; WATERS, 2019; IBELINGS et al., 2021; BASHIR et al., 2023).

## **Microcystins**

A recent study about cyanobacterial monitoring and assessment in Latin America showed the scarcity of data on toxic blooms in the region, reflecting not only the precariousness of current environmental policies in this continent part but also the limited technical-scientific resources (AGUILERA et al., 2023). In this way, we furthered our knowledge of tropical reservoirs by monitoring MC and other cyanopeptides for a year in Funil Reservoir (Brazil).

Historically, we have observed an increase in intra-MC concentrations in the studied reservoir; the mean intra-MC concentration recorded in the rainy season in this study ( $1.8 \ \mu g \ L^{-1}$ ) was 5 times more than recorded in 2011/12 ( $0.2 \ \mu g \ L^{-1}$ ) in the same season (GUEDES et al., 2014). However, even recording this sharp increase in MC concentration in Funil Reservoir, this value remains below the concentrations recorded in the studies carried out in Valle Bravo reservoir (Mexico) (NANDINI; SÁNCHEZ-ZAMORA; SARMA, 2019), Pañe reservoir (Peru) (MUNOZ et al., 2021), Laguna Lo Galindo (Chile) (ALMANZA et al., 2016), Abreo-Malpaso reservoir (Colombia) (LEÓN; PEÑUELA, 2019); San Roque, Palmar and Bonet reservoirs (Argentina) (CONTI; GUERRERO; REGUEIRA, 2005; RUIZ et al., 2013; GONZÁLEZ-PIANA et al., 2017); Salto Grande Reservoir (Uruguay) (GANGI et al., 2022); and other Brazilian reservoirs: Billings Reservoir also in the Southeast (PASSOS et al., 2022), and Jucurutu, São Rafael, Itans, Itajá, Passagem das Traíras e Gargalheiras in Northeast region (FONSECA et al., 2015).

The statistical analysis of MC concentration allowed us to recognize a pattern of MC variation, grouping months with low MC, with a mean of  $0.48 (\pm 0.04) \mu g L^{-1}$  (Feb – Jul), 4.2 times lower than months with higher MC, that reached a mean of  $1.7 (\pm 1.1) \mu g L^{-1}$  (Aug – Jan); the last one coinciding with the period of increased of rainfall explicitly observed for the year in which the study was carried out. Similar to this temporal pattern, Fonseca et al. (2015) showed that the mean of total MC recorded in the rainy season for six Brazilian reservoirs was 4.7 to 15.36 times higher than in the dry season. The San Roque reservoir in Argentina also shows the highest MC concentrations during the rainy season (AMÉ; DEL PILAR DÍAZ; WUNDERLIN, 2003; RUIZ et al., 2013). But, contrary, monitoring data from three Colombian reservoirs (Abreo Malpaso, El Peñol, Playas) showed the highest MC concentration in months with low precipitation; according to the authors, rainfall has dilution effects on nutrients, affecting cyanobacteria and MC concentration (LEÓN; PEÑUELA, 2019).

These differences may be associated with several reasons, such as the type of the reservoir (whether it is a damming of a river or it was already a lake), the primary source of pollution (whether it is diffuse, direct contribution by the river), the type of occupation of the drainage basin, or even the size of the drainage basin.

Besides the temporal pattern in MC concentration, we also recognize no spatial variation in the reservoir. Spatial, as well temporal, fluctuation in MC concentrations, MC variants, and other peptides also occur mainly due to the seasonal succession of cyanobacteria; this succession is thought to be primarily a consequence of changes in genotype compositions of toxic versus non-toxic strains and low versus high producers (WU et al., 2006; SABART et al., 2010; MEISSNER; FASTNER; DITTMANN, 2013). In the Funil Reservoir, for example, several Microcystis genotypes with a wide proportion variation among potentially toxic cells have already been recorded (GUEDES et al., 2014). Nevertheless, even though changes in the proportion of MCproducing cells must be taken into account, sometimes they couldn't fully explain temporal or spatial variation in MC (SABART et al., 2010; GUEDES et al., 2014); the selection process between MC-producing and non-MC-producing genotypes is relative and likely influenced by numerous local environmental factors and processes (SABART et al., 2010). Spatial variation in MC concentration is associated with different environmental conditions between different reservoir areas, especially in large reservoirs and in those with complex morphology (MICHALAK et al., 2013; CHUNG et al., 2014). However, homogeneity in the concentration of MC across the reservoir is common; as observed in our study, Conradie and Barnard (2012) did not observe significant differences in MC concentrations across two South African reservoirs.

On the other hands, extra-MC showed no significant spatial or temporal variation in this study. Even in the months with high intra-MC concentrations, the extra-MC remained at about 0.21  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. In natural populations, as cyanobacteria cells enter the stationary phase, the increased rate of cell death may raise the extra-MC fraction (ROHRLACK; HYENSTRAND, 2007). However, the MC concentration dissolved in water depends on dilution, adsorption, and degradation (WELKER; STEINBERG; JONES, 2001). Since, in our study, the moment with higher intra-MC overlaps with the rainy season, we suppose the increase in the water column by Paraíba do Sul River contribution and the local rainfall could dilute the extra-MC. Water input can also bring considerable suspended organic matter, contributing significantly to MC adsorption

(LAHTI, 1997; MORRIS et al., 2000; LIU et al., 2008). An alternative hypothesis for the constant values of extra-MC could be that these toxins accumulated in the sediment due to senescence and the potential settling of intact cells within the water column (WÖRMER; CIRÉS; QUESADA, 2011).

Still, regarding spatial differences in MC concentration and MC variants, another survey using water collected in a branch of the same reservoir (Aug/19) recorded different MC variants profile in the intra and extracellular portion (-RR, -LR, -YR, FR, WR, [D-Asp3]-RR); also different abundance but with similar MC-producing species composition to our data was recorded (ARRUDA et al., 2021). It is suggested that the spatial variation of MC may occur in Funil reservoir, but not in the main body of reservoir. Thus, more studies aiming to evaluate the dynamic of MC and contemplating more sampling sites, are necessary to understand the MC dynamic in Funil Reservoir.

## Cyanobacteria and the potential MC producer's

Cyanobacteria still dominate the reservoir, representing 85% of the total phytoplankton community, even with 7.6-fold reductions in TP and 4-fold in DIN, and a slight 1.2-fold increase in SRP in the rainy season over the last eight years (GUEDES et al., 2014). Potential MC producers were also highly representative 72% among cyanobacteria biovolume throughout the study in the reservoir; however, the population of potential MC-producers tends to increase even more in the months of high rainfall, reaching 84% of the relative abundance among cyanobacteria. Regarding specie, we observed an increase in *Microcystis* spp. biovolume in the rainy time in this study. The previous literature pointed out that the high availability of light provided by longer spring/summer days and water column stratification promoted due to the high temperatures also may favor *Microcystis* (REYNOLDS; DESCY; PADIS K, 1994; DOKULIL; TEUBNER, 2000; PAERL; HUISMAN, 2008; IBELINGS et al., 2021). Unexpectedly, the water temperature average observed in the dry season months was 1°C warmer than recorded in the rainy months; however, in the dry season, the reservoir

showed lower depth and absence of thermal stratification during the study (unpublished data). Reduction of the mixing zone has been pointed out as an essential key factor in promoting *M. aeruginosa* in Funil Reservoir (SOARES et al., 2009) and other tropical reservoirs (LI et al., 2023).

Another important variable in our study was the N:P; we recorded a N and P ratio of 1.7 times lower during the rainy season. Cyanobacteria is influenced by N:P, which tends to be a good competitor when the N/P ratio is low (SMITH, 1983; BULGAKOV; LEVICH, 1999); this lower N:P ratio is also considered a consequence of high uptake capacity and relatively greater uptake rates of N than P observed in *Microcystis* spp. (XIE et al., 2003; MARINHO; DE OLIVEIRA E AZEVEDO, 2007). This idea is supported by observations on biomass variation in our study, specifically linked to the contribution of cyanobacteria; total chlorophyll was similar between the seasons, but the cyanobacterial chlorophyll varied ~9 times from one period to another, especially due to *Microcystis* contribution, as aforementioned. In Dongzhong Reservoir (China), a similar phenomenon was observed in the growth of *Microcystis*; the proliferation was accelerated as the N:P ratio decreased, ultimately resulting in the formation of cyanobacterial blooms (LI et al., 2023).

Besides that, in our study, the high *Microcystis* spp. biomass overlapped with the moment of high MC concentration in the reservoir; high MC concentration has already been found in Funil Reservoir during the *M. aeruginosa* bloom (FERRÃO-FILHO et al., 2009). *Microcystis* strains capable of producing MC are frequently found in stratified lakes and reservoirs (DAVIS et al., 2009). It could be linked with the temperature, which can cause upregulation of the *mcyB* gene in *M. aeruginosa*, which is responsible, in part, for MC concentration (KIM et al., 2005; SCHERER et al., 2017). In turn, *D. circinalis*, although present year-round in the reservoir during the study, was more representative in the dry season, not necessarily due to increased biomass, but because *Microcystis* presented reductions in density. Although, *Dolichospermum* spp. are commonly associated with blooms and are considered potential MC producer's (EKMAN-EKEBOM et al., 1992; DREHER et al., 2019), a survey from Funil Reservoir samples did not identify *mcyE* for *Dolichospermum* (*Anabaena*) during rainy season but recorded a high proportion of *Microcystis* toxic genotypes when *Dolichospermum* was not dominant (GUEDES et al., 2014). While this data does not

rule out that *Dolichospermum* was an MC producer through our study, it does suggest that the leading MC producers in the reservoir in the rainy season were *Microcystis* spp.

## Relationship between microcystins, biological and chemical factors

The ubiquity of MC has led several studies to assess the effects of environmental factors on toxic bloom; however, observations across the world indicate high variability in the documented conditions related to MC occurrence and cell content (SONG et al., 1998; KOTAK et al., 2000; BILLAM et al., 2006; SEVILLA et al., 2008; RINTA-KANTO et al., 2009; GRAHAM et al., 2010; DZIALLAS; GROSSART, 2011; TAO et al., 2012; DUONG et al., 2013; PIMENTEL; GIANI, 2014; PUDDICK et al., 2014; GONZÁLEZ-PIANA et al., 2017).

In our study, just cyanobacteria chlorophyll and potential MC producer's biovolume presented a positive correlation with MCs (variants, total and intra-MC), and the correlation coefficient varied between them. In contrast, a study with global data showed that chlorophyll-a had the most significant positive correlation slope (r = 0.45) to total MC among several parameters (BULEY et al., 2022). Here we found the higher coefficients, MC producer's biovolume presented r = 0.59 with total MC, followed by the cyanobacteria chlorophyll with a correlation coefficient of 0.55. In general, the lack of correlation between some cyanobacteria biomass proxies and MC can be assigned to the variation in the relative genotype dominance (toxic and non-toxic), as well as the abundance and diversity of cyanobacteria has already observed in Funil Reservoir and other systems across the world (WU et al., 2008; DAVIS et al., 2009; RINTA-KANTO et al., 2009; MARTINS; VASCONCELOS, 2011; CONRADIE; BARNARD, 2012; GUEDES et al., 2014; LI et al., 2017, 2023). This may be the reason for the absence of a significative correlation between MC producer density and MCs in this study.

We also observed other significant correlations between MC and environmental variables. Secchi depth was the only variable in this study to present a negative correlation with MCs; the total-MC, intra-MC, and MC-RR had coefficients similar to those recorded for tropical systems (r = -0.55) and higher when compared with North temperate and Southern temperate regions (r = -0.16; r = -0.06) (BULEY et al., 2022).

The reduction of Secchi deep occurred in the rainy season, parallel to the rise of *Microcystis* spp. and the increase of MC in Funil Reservoir. The Secchi reduction can equate to very different ecological stressors or processes in freshwater systems (SWIFT et al., 2006). However, in the Funil Reservoir, we suggest the Secchi reduction occurs mainly due to the increase of *Microcystis* biomass, favored by rainfall, as discussed before. The link between Secchi and rain was evidenced by RDA (Fig. 8), showing a negative trend, and rainfall and MC variants positively. In addition, considering the high turbidity recorded in the rainy season, we may suggest that a significant amount of suspended organic matter and other suspended solids brought by rainfall, reducing the light availability and consequently favoring potential toxic *Microcystis* spp.; some studies suggest the selection of toxic-genotypes of *Microcystis* and other MC-producers under unfavorable environmental conditions (KARDINAAL et al., 2007; BRIAND et al., 2008, 2009; MARTINS; VASCONCELOS, 2011).

On the other hand, DO presented a positive correlation with total MC (r = 0.46), intra-MC (r = 0.44), MC-RR (r = 0.47), and -LR (r = 0.43). Although surveys show a negative correlation between DO and MCs for temperate regions, we have observed the opposite in tropical areas (BILLAM et al., 2006; TE; GIN, 2011; HARTNELL et al., 2020; BULEY et al., 2022). This positive correlation may be related to biomass growth and consequent increases in primary productivity and not a direct connection with MC.

Regarding nutrients, TN has been associated with cyanobacterial bloom formations (PAERL et al., 2001; PAERL; OTTEN, 2013) and has even been identified as the most crucial driver of MC concentration in some systems (GIANI et al., 2005; PAERL; OTTEN, 2013). Despite that, a recent meta-analysis showed a positive correlation between TN and MC for tropical regions (r = 0.30) and a negative in the temperate areas (r = -0.03) (BULEY et al., 2022). However, our data showed no significant correlation between TN and MC. On the other hand, among the nitrogen forms, NO<sub>3</sub>- presented a positive correlation with total-MC (r = 0.53), intra-MC (r =0.49), and all variants (r ranged from 0.43 to 0.59). Although field studies in the tropical regions as well as in the north temperate areas, show this correlation tends to be negative (r = -0.31; r = -0.11); in southern temperate areas, a positive but weak correlation has been recorded (r = 0.06) (BULEY et al., 2022). Since MC is a nitrogenrich metabolite, a mesocosm study verified that an increase in NO<sub>3</sub>- and urea in a hypertrophic lake increases total MC concentration by up to 13-folds (DONALD et al., 2011, 2013); furthermore, a laboratory study demonstrated that  $NO_3^-$  supply increase MC cell quotas in *M. aeruginosa* strain, being the MC-RR the most significantly affected (VAN DE WAAL et al., 2009). This would explain the significant correlation between MC-RR and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in our study (r = 0.59); in addition, the RDA performed here suggested positive and synergic effects of  $NO_3^-$  and rainfall on MC-LR and [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR (Fig. 8). Still, the absence of correlation between NO<sub>3</sub>- and MC producer biovolume suggest the increase of MC is not directly related to the cyanobacteria biomass growth but due to the rise of MC biosynthesis. Regarding NH<sub>4</sub>, it has been negatively correlated with MC in studies from tropical areas (r= -0.16) (BULEY et al., 2022), but no significant relationship with MC was identified in our study. Similarly, a survey performed in three lakes in Canada showed that NH<sub>4</sub><sup>-</sup> did not present a correlation with MC, although it is considered important in structuring cyanobacterial communities (MONCHAMP et al., 2014); the authors assigned the absence of correlation to the low and constant  $NH_4^-$  concentrations in the studied systems. However, in Funil Reservoir NH<sub>4</sub> presented significant variation, and their concentration cannot be considered low during the study (Tab. 1). NO<sub>2</sub><sup>-</sup> also did not correlate with MCs, but in the RDA, it was negatively associated with MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]-RR, going against the global trend, which has shown a positive relationship with MCs (BULEY et al., 2022).

Our data still showed a positive correlation between TP, total MC, and intra-MC, in line with the literature (KOTAK et al., 2000; RINTA-KANTO et al., 2009; BULEY et al., 2022), but we did not observe any correlation between the TP and the biomass proxies'. It indicates that the availability of P may favor toxic strains and/or induce the production of MC without necessarily increasing the cyanobacteria biomass. Studies have shown that at higher SRP concentrations, the growth rates of toxic *Microcystis* exceeded non-toxic strains and influenced MC concentration in laboratory experiments (VÉZIE et al., 2002) and fields study (DAVIS et al., 2009; SU et al., 2015). In Funil Reservoir, the TP concentration was not different between seasons; however, we observed ~2.5 times more TP when total MC exceeded 0.8  $\mu$ g L<sup>-1</sup> than in months with a concentration under 1.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. The same pattern was observed in MC producer's biovolume, with a difference of ~2.4 more biovolume when total MC exceeded 0.8  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and increased *Microcystis* species. Regarding the SRP, the concentration was low, with slight variation throughout the study (9.04  $\pm$  8 µg L<sup>-1</sup>), which suggests that the primary producers rapidly absorbed dissolved phosphorus when available; and justified the absence of correlation between this variable and MC.

Unexpectedly, we did not observe significant correlations in Pearson analysis between WT and MCs or biomass proxies. However, in RDA this variable was negatively associated with MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]-RR. Warmer temperatures generally increase toxic cyanobacterial growth and toxin production (PAERL; HUISMAN, 2008). Whether optimizing the formation of toxic blooms or causing an upregulation of the mcyB gene in some species, there is generally a positive relationship between warm temperature and MCs. For instance, a meta-analysis survey containing 87 studies from tropical areas showed that temperature had the greatest positive and significant relationship to MC (r= 0.30). Meantime, Bui et al. (2018) demonstrated that when the temperature was above 27°C, the total MC concentration decreased by 35% in tropical Microcystis strains with MC-LR as the dominant variant, and by 94% in strains with MC-RR; and, most important, the effect of temperature on MC is strain dependent and seems more pronounced in strains producing less toxic MC variants (dmMC-RR, MC-RR). The temperature also apparently influences the MC profile; a higher proportion of MC-LR at higher temperatures (28 °C) than at lower temperatures (20 °C), and the opposite for MC-RR was recorded for Microcystis aeruginosa population, concentrated from a field sample of the reservoir in Córdoba, Argentina (AMÉ; DEL PILAR DÍAZ; WUNDERLIN, 2003). According to the mentioned study, we observed an abrupt decrease in total MC in Funil Reservoir when water temperature exceeded 27° C (February – April 2019); the increase in total MC was only observed from July when the temperature approached 21°C.

These contradictory reports, both within the global dataset and in our findings, do not necessarily undermine the significance of variables with low or non-correlation with MCs; instead, they underscore the challenges in extrapolating promoting conditions to MC occurrences.

#### **Other cyanopeptides**

For more information, we have considered exploring other oligopeptides and their spatial variations in addition to the MCs recorded in our study. These data are unprecedented for Brazilian aquatic systems. Three different peptide classes were found aeruginosin, cyanopeptolin, and microginin; these compounds were compared by relative area. MC was the only class that were quantified, which standards were available. It was possible to identify that some compounds are present at only one of the sampling sites during the study (e.g., Aeruginosin 618, Aeruginosin 602), others cyanopeptides may also vary over the months. Temporal variation in cyanopeptides beyond MC has already described in freshwater reservoirs in the United Kingdom (FILATOVA et al., 2021) and in six eutrophic lakes in the USA (BEVERSDORF et al., 2017); spatial and temporal variation was identified in Lake Vegoritis, Greece (ZERVOU et al., 2021).

The Aeruginosin class was the most abundant in our study concerning the number of compounds. Aeruginins have been observed to cause toxic effects in the brine shrimp Thamnocephalus platyurus only at high concentrations with LC<sub>50</sub> values ranging from 10 to 41 mg/L (SCHERER; BEZOLD; GADEMANN, 2016); also showed inhibit human serine proteases related to blood clotting at IC<sub>50</sub> values varying from 4 to 93 µg/L (HANESSIAN et al., 2006; KOHLER et al., 2014). Additionally, in toxicity tests with crude extracts of cyanobacterial biomass and fractions from the Funil reservoir, Aeruginosin 298A (m/z 605.36) showed activity scores similar to MC-RR (MEDICE et al., 2023 - under review). As well, Cyanopeptolins are recognized for their ability to inhibit proteases associated with metabolism and blood coagulation (FUJII et al., 2002; JANSSEN, 2019); compounds from this class were identified in 50% of samples collected from six eutrophic Wisconsin lakes (USA) (BEVERSDORF et al., 2017); meanwhile, we found these compounds in 80% of our samples, but always present in the reservoir. This holds great significance because even though they are not currently classified as toxins, Aeruginosins, Cyanopeptolin, as well Microginins could potentially contribute to the overall toxicity of cyanobacterial blooms (CHORUS, 2001; BEVERSDORF et al., 2017; JANSSEN, 2019) (MEDICE et al., 2023 - under review). In addition, the simultaneous production of several cyanopeptides alongside MC underscores the importance of providing reference standards to promote further research on their presence in blooms, persistence, and potential toxicity (NATUMI; JANSSEN, 2020).

Therefore, the impacts of cyanobacterial metabolites, particularly within tropical freshwater ecosystems, concerning potential risks to human health and ecotoxicology, still need to be addressed (JONES et al., 2020). The distinctive ecological and environmental attributes of tropical freshwater ecosystems can influence the production and prevalence of these cyanometabolites. Moreover, this study emphasizes that MC levels reflect increased cyanobacterial toxicity over the past eight years in the Funil reservoir. In addition, recent data indicates the presence of a range of harmful secondary compounds beyond cyanotoxins (JACINAVICIUS et al., 2023). Therefore, this study demonstrates the availability of these compounds in reservoirs, highlighting associated risks linked to exposure to theses metabolites. This study underscores the urgency of comprehending and addressing the growing cyanobacterial threat in aquatic environments.

### CONCLUSION

In this study, we investigated the dynamics of microcystins in Funil Reservoir, a large and deep tropical reservoir. Our analysis revealed a notable temporal pattern in MC concentrations, where high concentrations were recorded during months with significant rainfall, and a lower N:P ratio. Correlation and redundancy analyses showed the positive correlation between nitrate levels and MC concentration, while temperatures exceeding 26°C exhibited a negative impact. During this period, *Microcystis* spp. emerged as the dominant species, suggesting its role as the primary MC producer in the reservoir. However, a comparison with historical data indicated a decrease in total phosphorus, overall biomass, and cyanobacteria populations, hinting at improved water quality. Nonetheless, this contrasted with increased cyanobacterial toxicity observed over the past eight years.

Moreover, our study underscores the pressing need to further explore cyanopeptides beyond MCs in tropical aquatic systems. Additionally, it highlights the significance of establishing reference standards to facilitate extended research on these compounds' presence, persistence, and potential toxicity.

## REFERENCES

AGUILERA, A. et al. Cyanobacterial Bloom Monitoring and Assessment in Latin America. *Harmful Algae*, v. 125, p. 102429, jun. 2023.

ALMANZA, V. et al. Occurrence of Toxic Blooms of Microcystis Aeruginosa in a Central Chilean (36° Lat. S) Urban Lake. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 89, n. 1, p. 8, dez. 2016.

AMÉ, M. V.; DEL PILAR DÍAZ, M.; WUNDERLIN, D. A. Occurrence of Toxic Cyanobacterial Blooms in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina): A Field and Chemometric Study: Toxic Cyanobacterial Blooms, A Field and Chemometric Study. *Environmental Toxicology*, v. 18, n. 3, p. 192–201, 2003.

ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

BASHIR, F. et al. Cyanotoxins, Biosynthetic Gene Clusters, and Factors Modulating Cyanotoxin Biosynthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 9, p. 241, set. 2023.

BEVERSDORF, L. et al. Variable Cyanobacterial Toxin and Metabolite Profiles across Six Eutrophic Lakes of Differing Physiochemical Characteristics. *Toxins*, v. 9, n. 2, p. 62, 10 fev. 2017.

BILLAM, M. et al. SEASONAL VARIATIONS IN THE CONCENTRATION OF MICROCYSTIN-LR IN TWO LAKES IN WESTERN TEXAS, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 2, p. 349, 2006.

BOUAÏCHA, N. et al. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, v. 11, n. 12, p. 714, 7 dez. 2019.

BRIAND, E. et al. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystinproducing strains in a bloom-forming Planktothrix agardhii (Cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, 2008.

BRIAND, E. et al. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming Microcystis aeruginosa (cyanobacteria) population. *ISME Journal*, v. 3, n. 4, 2009.

BUI, T. et al. Warming Affects Growth Rates and Microcystin Production in Tropical Bloom-Forming Microcystis Strains. *Toxins*, v. 10, n. 3, p. 123, 14 mar. 2018.

BULEY, R. P. et al. Can Correlational Analyses Help Determine the Drivers of Microcystin Occurrence in Freshwater Ecosystems? A Meta-Analysis of Microcystin and Associated Water Quality Parameters. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 194, n. 7, p. 493, jul. 2022.

BULGAKOV, N. G.; LEVICH, A. P. The Nitrogen: Phosphorus Ratio as a Factor Regulating Phytoplankton Community Structure. *Fundamental and Applied Limnology*, v. 146, n. 1, p. 3–22, 16 set. 1999.

BURATTI, F. M. et al. Cyanotoxins: Producing Organisms, Occurrence, Toxicity, Mechanism of Action and Human Health Toxicological Risk Evaluation. *Archives of Toxicology*, v. 91, n. 3, p. 1049–1130, mar. 2017.

CERASINO, L.; SALMASO, N. Diversity and Distribution of Cyanobacterial Toxins in the Italian Subalpine Lacustrine District. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, v. 41, n. 3, p. 54–63, 1 set. 2012.

CHORUS, I. (ed.). Cyanotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water. [s.l: s.n.]

CHUNG, S. W. et al. The Influence of Physical and Physiological Processes on the Spatial Heterogeneity of a Microcystis Bloom in a Stratified Reservoir. *Ecological Modelling*, v. 289, p. 133–149, out. 2014.

CONRADIE, K.; BARNARD, S. The dynamics of toxic Microcystis strains and microcystin production in two hypertrofic South African reservoirs. *Harmful Algae*, v. 20, p. 1–10, 2012.

CONTI, A. L. R.; GUERRERO, J. M.; REGUEIRA, J. M. Levels of Microcystins in Two Argentinean Reservoirs Used for Water Supply and Recreation: Differences in the Implementation of Safe Levels. *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 3, p. 263–269, jun. 2005.

DAVIS, T. et al. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, v. 8, p. 715–725, 2009.

DOKULIL, M. T.; TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, v. 438, n. 1/3, p. 1–12, 2000.

DONALD, D. B. et al. Comparative Effects of Urea, Ammonium, and Nitrate on Phytoplankton Abundance, Community Composition, and Toxicity in Hypereutrophic Freshwaters. *Limnology and Oceanography*, v. 56, n. 6, p. 2161–2175, nov. 2011.

DONALD, D. B. et al. Phytoplankton-Specific Response to Enrichment of Phosphorus-Rich Surface Waters with Ammonium, Nitrate, and Urea. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e53277, 17 jan. 2013.

DREHER, T. W. et al. Anabaena/Dolichospermum as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. *Toxicon: X*, v. 1, 2019.

DUONG, T. T. et al. Seasonal Variation of Cyanobacteria and Microcystins in the Nui Coc Reservoir, Northern Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, n. 4, p. 1065–1075, ago. 2013.

DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic Microcystis Sp. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25569, 28 set. 2011.

EKMAN-EKEBOM, M. et al. Toxic Cyanobacteria in Some Finnish Lakes. *Environmental Toxicology & Water Quality*, v. 7, n. 2, p. 201–213, maio 1992.

FASTNER, J.; HUMPAGE, A. HEPATOTOXIC CYCLIC PEPTIDES – MICROCYSTINS AND NODULARINS. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Ingrid Chorus and Martin Welker, 2021. p. 156–162.

FERRÃO-FILHO, A. da S. et al. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL: DINÂMICA SAZONAL E CONSEQÜÊNCIAS PARA O ZOOPLÂNCTON. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 346–365, jun. 2009.

FILATOVA, D. et al. Cyanobacteria and Their Secondary Metabolites in Three Freshwater Reservoirs in the United Kingdom. *Environmental Sciences Europe*, v. 33, n. 1, p. 29, dez. 2021.

FONSECA, J. R. et al. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 27, n. 1, p. 78–92, mar. 2015.

FUJII, K. et al. Structural Elucidation of Cyanobacterial Peptides Encoded by Peptide Synthetase Gene in Anabaena Species. *Tetrahedron*, v. 58, n. 34, p. 6863–6871, ago. 2002.

GANGI, D. et al. Integrating Field and Satellite Monitoring for Assessing Environmental Risk Associated with Bacteria in Recreational Waters of a Large Reservoir. *Science of The Total Environment*, v. 818, p. 151714, abr. 2022.

GIANI, A. et al. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 62, n. 9, 2005.

GKELIS, S.; ZAOUTSOS, N. Cyanotoxin Occurrence and Potentially Toxin Producing Cyanobacteria in Freshwaters of Greece: A Multi-Disciplinary Approach. *Toxicon*, v. 78, p. 1–9, fev. 2014.

GONZÁLEZ-PIANA, M. et al. Dynamics of Total Microcystin LR Concentration in Three Subtropical Hydroelectric Generation Reservoirs in Uruguay, South America. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 99, n. 4, p. 488–492, out. 2017.

GRAHAM, J. L. et al. Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environmental Science & Technology*, v. 44, n. 19, p. 7361–7368, 1 out. 2010.

GROSS, A.; BOYD, C. E. A Digestion Procedure for the Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Pond Water. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 29, n. 3, p. 300–303, set. 1998.

GUEDES, I. A. et al. Fluctuations in microcystin concentrations, potentially toxic Microcystis and genotype diversity in a cyanobacterial community from a tropical reservoir. *Harmful Algae*, v. 39, 2014.

HANESSIAN, S. et al. Total Synthesis and Structural Confirmation of Chlorodysinosin A. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 32, p. 10491–10495, 1 ago. 2006.

HARKE, M. J. et al. A Review of the Global Ecology, Genomics, and Biogeography of the Toxic Cyanobacterium, Microcystis Spp. *Harmful Algae*, v. 54, p. 4–20, abr. 2016.

HARTNELL, D. M. et al. Cyanobacterial Abundance and Microcystin Profiles in Two Southern British Lakes: The Importance of Abiotic and Biotic Interactions. *Toxins*, v. 12, n. 8, p. 503, 5 ago. 2020.

HENAO, E.; RZYMSKI, P.; WATERS, M. A Review on the Study of Cyanotoxins in Paleolimnological Research: Current Knowledge and Future Needs. *Toxins*, v. 12, n. 1, p. 6, 20 dez. 2019.

HOLLAND, A.; KINNEAR, S. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*, v. 11, n. 7, p. 2239–2258, 27 jun. 2013.

IBELINGS, B. W. et al. Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Chorus I and Welker M, 2021.

JACINAVICIUS, F. R. et al. Toxicological Effects of Cyanobacterial Metabolites on Zebrafish Larval Development. *Harmful Algae*, v. 125, p. 102430, jun. 2023.

JANSSEN, E. M. L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on cooccurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, v. 151, 2019.

JONES, M. R. et al. Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. *bioRxiv*, 2020.

KAEBERNICK, M. et al. Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3387–3392, ago. 2000.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and Molecular Investigations of Cyanotoxin Production. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35, n. 1, p. 1–9, mar. 2001.

KARDINAAL, W. et al. Microcystis Genotype Succession in Relation to Microcystin Concentrations in Freshwater Lakes. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 48, p. 1–12, 20 jun. 2007.

KIM, H. R. et al. Effects of Temperature and Light on Microcystin Synthetase Gene Transcription in Microcystis Aeruginosa. *Key Engineering Materials*, v. 277–279, p. 606–611, jan. 2005.

KOHLER, E. et al. The Toxicity and Enzyme Activity of a Chlorine and Sulfate Containing Aeruginosin Isolated from a Non-Microcystin-Producing Planktothrix Strain. *Harmful Algae*, v. 39, p. 154–160, out. 2014.

KOTAK, B. G. et al. Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 57, n. 8, 2000.

LAHTI, K. Persistence of Cyanobacterial Hepatotoxin, Microcystin-LR in Particulate Material and Dissolved in Lake Water. *Water Research*, v. 31, n. 5, p. 1005–1012, maio 1997.

LEÓN, C.; PEÑUELA, G. A. Detected Cyanotoxins by UHPLC MS/MS Technique in Tropical Reservoirs of Northeastern Colombia. *Toxicon*, v. 167, p. 38–48, set. 2019.

LI, D. et al. Seasonal dynamics of photosynthetic activity of Microcystis, genotype abundances and microcystin concentrations in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Acta Ecologica Sinica*, v. 37, p. 284–289, 2017.

LI, J. et al. Dynamic Characteristics of Total and Microcystin-Producing Microcystis in a Large Deep Reservoir. *Environmental Pollution*, v. 335, p. 122256, out. 2023.

LIU, G. et al. Adsorption of Microcystin LR and LW on Suspended Particulate Matter (SPM) at Different PH. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 192, n. 1–4, p. 67–76, jul. 2008.

MARINHO, M. M.; DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S. M. F. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by Microcystis aeruginosa and Aulacoseira distans. *Aquatic Ecology*, v. 41, n. 4, p. 525–533, 2007.

MARTINS, A.; VASCONCELOS, V. Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology*, v. 193, p. 615–627, 2011.

MEISSNER, S.; FASTNER, J.; DITTMANN, E. Microcystin Production Revisited: Conjugate Formation Makes a Major Contribution: Production of Cyanobacterial Toxins Strongly Underestimated. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1810– 1820, jun. 2013.

MERILUOTO, J.; SPOOF, L.; CODD, G. A. (ed.). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.

MICHALAK, A. M. et al. Record-Setting Algal Bloom in Lake Erie Caused by Agricultural and Meteorological Trends Consistent with Expected Future Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 16, p. 6448–6452, 16 abr. 2013.

MONCHAMP, M.-E. et al. Nitrogen Forms Influence Microcystin Concentration and Composition via Changes in Cyanobacterial Community Structure. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e85573, 10 jan. 2014.

MORRIS, R. J. et al. The Adsorption of Microcystin-LR by Natural Clay Particles. *Toxicon*, v. 38, n. 2, p. 303–308, fev. 2000.

MOWE, M. A. D. et al. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology*, v. 73, n. AoP, 30 dez. 2014. Disponível em:

<http://jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2014.1005>. Acesso em: 14 ago. 2022.

MUNOZ, M. et al. Overview of Toxic Cyanobacteria and Cyanotoxins in Ibero-American Freshwaters: Challenges for Risk Management and Opportunities for Removal by Advanced Technologies. *Science of The Total Environment*, v. 761, p. 143197, mar. 2021.

NANDINI, S.; SÁNCHEZ-ZAMORA, C.; SARMA, S. S. S. Toxicity of Cyanobacterial Blooms from the Reservoir Valle de Bravo (Mexico): A Case Study on the Rotifer Brachionus Calyciflorus. *Science of The Total Environment*, v. 688, p. 1348–1358, out. 2019.

NATUMI, R.; JANSSEN, E. M.-L. Cyanopeptide Co-Production Dynamics beyond Mirocystins and Effects of Growth Stages and Nutrient Availability. *Environmental Science & Technology*, v. 54, n. 10, p. 6063–6072, 19 maio 2020.

NEILAN, B. A. et al. Environmental Conditions That Influence Toxin Biosynthesis in Cyanobacteria: Regulation of Cyanobacterial Toxin Biosynthesis. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 1239–1253, maio 2013.

OH, H.-M. et al. Microcystin Production by *Microcystis Aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 176–179, jan. 2000.

OKSANEN, I. et al. Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* Sp. Strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 5756–5763, out. 2004.

O'NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, v. 14, 2012.

PAERL, H. W. et al. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World JOURNAL*, v. 1, p. 76–113, 2001.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate: Blooms like it hot. Science, 2008.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, v. 65, n. 4, p. 995–1010, maio 2013.

PASSOS, L. S. et al. Cyanotoxins and Water Quality Parameters as Risk Assessment Indicators for Aquatic Life in Reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 241, p. 113828, ago. 2022. PIMENTEL, J. S. M.; GIANI, A. Microcystin Production and Regulation under Nutrient Stress Conditions in Toxic Microcystis Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 18, p. 5836–5843, 15 set. 2014.

PUDDICK, J. et al. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Marine Drugs*, v. 12, n. 11, 2014.

PUDDICK, J. et al. Modulation of Microcystin Congener Abundance Following Nitrogen Depletion of a Microcystis Batch Culture. *Aquatic Ecology*, v. 50, n. 2, p. 235–246, jun. 2016.

REYNOLDS, C. S.; DESCY, J.-P.; PADIS K, J. Are Phytoplankton Dynamics in Rivers so Different from Those in Shallow Lakes? *Hydrobiologia*, v. 289, n. 1–3, p. 1–7, 1994.

RINTA-KANTO, J. et al. Lake Erie Microcystis: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae*, v. 8, p. 665–673, 2009.

ROHRLACK, T.; HYENSTRAND, P. Fate of Intracellular Microcystins in the Cyanobacterium Microcystis Aeruginosa (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, v. 46, n. 3, p. 277–283, maio 2007.

RUIZ, M. et al. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-Occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 224, n. 6, p. 1593, jun. 2013.

SABART, M. et al. Spatiotemporal Variations in Microcystin Concentrations and in the Proportions of Microcystin-Producing Cells in Several Microcystis aeruginosa Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 14, 2010.

SCHERER, M.; BEZOLD, D.; GADEMANN, K. Investigating the Toxicity of the Aeruginosin Chlorosulfopeptides by Chemical Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 32, p. 9427–9431, ago. 2016.

SCHERER, P. I. et al. Influence of Temperature, Mixing, and Addition of Microcystin-LR on Microcystin Gene Expression in *Microcystis Aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, v. 6, n. 1, p. e00393, fev. 2017.

SEVILLA, E. et al. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 10, 2008.

SIVONEN, K. Cyanobacterial Toxins. Em: Encyclopedia of Microbiology. [s.l: s.n.]

SIVONEN, K.; JONES, G. J. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. [s.1: s.n.]

SMITH, V. H. Low Nitrogen to Phosphorus Ratios Favor Dominance by Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. *Science*, v. 221, n. 4611, p. 669–671, 12 ago. 1983.

SOARES, M. et al. Changes in Species Composition during Annual Cyanobacterial Dominance in a Tropical Reservoir: Physical Factors, Nutrients and Grazing Effects. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 57, p. 137–149, 6 out. 2009.

SOARES, M. C. S. et al. The Effects of Water Retention Time and Watershed Features on the Limnology of Two Tropical Reservoirs in Brazil. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, v. 13, n. 4, p. 257–269, dez. 2008.

SONG, L. et al. Microcystin Production of *Microcystis Viridis* (Cyanobacteria) under Different Culture Conditions. *Phycological Research*, v. 46, n. s2, p. 19–23, dez. 1998.

SU, X. et al. Spatiotemporal Dynamics of Microcystin Variants and Relationships with Environmental Parameters in Lake Taihu, China. *Toxins*, v. 7, n. 8, p. 3224–3244, 18 ago. 2015.

SVIRČEV, Z. et al. Global Geographical and Historical Overview of Cyanotoxin Distribution and Cyanobacterial Poisonings. *Archives of Toxicology*, v. 93, n. 9, p. 2429–2481, set. 2019.

SWIFT, T. J. et al. Water Clarity Modeling in Lake Tahoe: Linking Suspended Matter Characteristics to Secchi Depth. *Aquatic Sciences*, v. 68, n. 1, p. 1–15, mar. 2006.

TAO, M. et al. Use of a Generalized Additive Model to Investigate Key Abiotic Factors Affecting Microcystin Cellular Quotas in Heavy Bloom Areas of Lake Taihu. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e32020, 23 fev. 2012.

TE, S. H.; GIN, K. Y.-H. The Dynamics of Cyanobacteria and Microcystin Production in a Tropical Reservoir of Singapore. *Harmful Algae*, v. 10, n. 3, p. 319–329, mar. 2011.

VAN DE WAAL, D. B. et al. The Ecological Stoichiometry of Toxins Produced by Harmful Cyanobacteria: An Experimental Test of the Carbon-Nutrient Balance Hypothesis: Ecological Stoichiometry of Toxin Production. *Ecology Letters*, v. 12, n. 12, p. 1326–1335, dez. 2009.

VÉZIE, C. et al. Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic Microcystis Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations. *Microbial Ecology*, v. 43, n. 4, p. 443–454, jun. 2002.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial Peptides — Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 530–563, jul. 2006.

WELKER; STEINBERG; JONES. Release and persistence of microcystins in natural waters. Em: *Cyanotoxins: occurrence, causes, conse-quences*. Berlin, Heidelberg: Chorus I, 2001. p. 85–103.

WÖRMER, L.; CIRÉS, S.; QUESADA, A. Importance of Natural Sedimentation in the Fate of Microcystins. *Chemosphere*, v. 82, n. 8, p. 1141–1146, fev. 2011.

WU, S. et al. Field Studies on the Environmental Factors in Controlling Microcystin Production in the Subtropical Shallow Lakes of the Yangtze River. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, n. 4, p. 329–334, abr. 2008.

WU, S. K. et al. Relationships between Microcystins and Environmental Parameters in 30 Subtropical Shallow Lakes along the Yangtze River, China. *Freshwater Biology*, v. 51, n. 12, p. 2309–2319, dez. 2006.

XIE, L. et al. The Low TN:TP Ratio, a Cause or a Result of Microcystis Blooms? *Water Research*, v. 37, n. 9, p. 2073–2080, maio 2003.

ZERVOU, S.-K. et al. Cyanobacterial Toxins and Peptides in Lake Vegoritis, Greece. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 394, 1 jun. 2021.
# 2 ARTIGO: ANNUAL VARIABILITY OF INTRA AND EXTRACELLULAR MICROCYSTINS IN A EUTROPHIC TROPICAL BRACKISH COASTAL LAGOON (BRAZIL)

#### Abstract

Microcystin (MC) is a noxious secondary compound produced by certain strains of cyanobacteria, posing a threat to both aquatic and terrestrial organisms within diverse aquatic ecosystems. However, the global data from coastal lagoons and other estuarine water systems still need to be more comprehensive to accurately predict occurrence of cyanobacteria blooms and changes in their toxicity. The aim of this study is to establish a comprehensive and year-round inventory of potential microcystin (MC) producers, MC concentrations, and other cyanopeptides in the Jacarepaguá Lagoon. Additionally, the study seeks to explore the relationship between MC, the composition of the cyanobacterial community, and environmental factors. So, we conducted a monthly analysis of Microcystins (MCs), including eight distinct variants (MC-RR, -LA, LF, -LR, -LW, -YR, [D-Asp3]-RR, and [D-Asp3]-LR), as well other peptides apart from MCs in 48 water samples (four samples for month) from a hypertrophic brackish coastal lagoon in the southeastern region of Brazil. The cyanopeptides were evaluated using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The physicochemical parameters and the potential MC producer cyanobacteria were evaluated and quantifying. An annual TP median of 825.78  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, TN of 4.74 mg L<sup>-1</sup>, and total chlorophyll of 103.08  $\mu$ g L<sup>-1</sup> show the level of degradation of the lagoon. Cyanobacteria dominated the lagoon year-round, representing up to 96.96% of phytoplankton biomass during the rainy season. MC was present in all samples in dissolved and intracellular form. The total MC concentration varied from 0.44 to 0.63  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, and two MC variants were identified (MC-RR, [D-Asp<sup>3</sup>]-RR,). No significant seasonality and spatial variation in MC were recorded in the study. Although *Microcystis aeruginosa* has been pointed as the main MC-producer in the lagoon, Planktothrix isothrix was the leading representative cyanobacteria during the study; members of picoplankton (here considered  $> 5\mu$ m) Aphanocapsa spp. and Synechococcus nidulans were also associated with MC concentration. The correlational and redundancy analysis results indicated that rainfall, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+,</sup> SRP, and water temperature influenced MC concentration.

#### **INTRODUCTION**

Coastal lagoons are transitional ecosystems between land and sea. These complex environments exhibit pronounced physical, chemical, and biological attributes, consequently playing an important role in the transport, recycle, and storage of nutrients, mediating their fluxes in land-sea interface (KJERFVE, 1994; KNOPPERS; KJERFVE, 1999; PÉREZ-RUZAFA; PÉREZ-MARCOS; MARCOS, 2020). Currently, the effects of disorderly population growth, associated to the disposal of waste materials, eutrophication, and sprawling urban growth, are having a negative impact on these aquatic systems, including those in Brazil (BRUUN, 1994; KJERFVE, 1994; HÅKANSON; BRYHN, 2008). Eutrophication is one of the most significant problem affecting water quality worldwide (DOWNING, 2014); since the process promote the massive increase in cyanobacteria (bloom), affecting aquatic biota, and human health, mainly due to the potential contamination by cyanotoxins (HUISMAN et al., 2018; CHORUS; WELKER, 2021a). Furthermore, cyanobacterial blooms become more frequent and persistent due to climate change, specifically global warming (VISSER et al., 2016). Cyanobacteria exhibit significant metabolic adaptability when exposed to UVR, including the synthesis and differential expression of various secondary metabolites (JACINAVICIUS et al., 2021). In addition to cyanotoxins, this adaptability extends to other peptides such as cyanopeptolins, anabaenopeptins, aerucyclamides, aeruginosins, and microginins. More than 2000 secondary metabolites have been identified from cyanobacteria (JONES et al., 2020)

Among the cyanotoxins, the hepatotopeptide microcystin (MC) is the most notable, ubiquitous in aquatic systems, and the most observed cyanobacterial toxin worldwide (CHORUS; WELKER, 2021a). About 300 MC variants have already been recognized (JONES et al., 2020) and many MC variants can be synthesized by one toxigenic strains simultaneously (PUDDICK et al., 2014). Microcystin has been found to inhibit protein phosphatase and cause oxidative stress, genotoxicity, and abnormal functioning of hepatocytes, resulting in liver damage (MACHADO et al., 2018; CHORUS; WELKER, 2021b).

Microcystins are a cyanopeptide typically produced by the genera Anabaena (Dolichospermum), Aphanizomenon, Microcystis, Planktothrix, and less frequently by Anabaenopsis, Aphanocapsa, Raphidiopsis (Cylindrospermopsis), Fischerella, Gleotrichia, Gomphosphaeria, Hapalosiphon, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Pseudanabaena, and Synechococcus. (FASTNER; HUMPAGE, 2021; and references therein). Nevertheless, the Microcystis genus is the commom MC producer in blooms across every continent except Antarctica. (CARMICHAEL, 1992). Yet, the rise of toxic blooms in brackish waters has been reported (PAERL; PAUL, 2012); but, MCs and other peptides have not been sufficiently studied in estuarine waters (PREECE et al., 2017) and data on the diversity, occurrence and ecotoxicology are lacking (JANSSEN, 2019; JONES et al., 2021). Beside MC, recent advancements in analytical techniques have facilitated the detection of a multitude of cyanopeptides. These newly identified compounds include cyanopeptolins, anabaenopeptins, aerucyclamides, aeruginosins, and microginins (WELKER; VON DÖHREN, 2006), among others. However, our comprehension of the occurrence and concentrations of various cyanopeptide classes in surface waters remains limited and underexplored, particularly in tropical aquatic systems (JONES et al., 2020). Ecotoxicological investigations suggest that the impacts of cyanobacterial extracts cannot be solely attributed to MCs, underscoring the importance of studying and considering other bioactive metabolites when assessing potential risks (BAUMANN and JÜTTNER, 2008; KEIL et al., 2002; LE MANACH et al., 2016; SMUTNÁ et al., 2014).

Despite the importance of nutrients for the occurrence of toxic blooms, no single environmental factor, or only anthropic influence, has been considered to cause blooms. Studies have suggested the availability of resources (nutrients and light), temperature, mixing regime, residence time, and pH are key abiotic conditions that determine cyanobacteria growth rates and the outcome of competition between species (JACINAVICIUS et al., 2019; IBELINGS et al., 2021). In addition, these same environmental factors may select toxic strains, affect the MC biosynthesis, and consequently influence the MC concentration in water. (WU et al., 2006; DZIALLAS; GROSSART, 2011; MEISSNER; FASTNER; DITTMANN, 2013). By understanding the link between environmental conditions and MC occurrence, resource managers may be better equipped to select the environmental parameters to monitor and/or mitigate to reduce the risks posed by the toxin. The Jacarepaguá Lagoon, a coastal brackish water lagoon, located in Rio de Janeiro (Brazil), has suffered from the high apport of nutrients by disposal of sewage (domestic and industrial waste), promoting an annual contribution of approximately 55t of untreated sewage (MERCEDES, 2020). As a result of the eutrophication process, cyanobacterial blooms have been recorded since 1986 (SAIEG-FILHO, 1986; GOMES et al., 2009); cyanobacteria can reach up to 90% of total phytoplankton biomass, and dominance of *Microcystis aeruginosa* are frequently (FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; GOMES et al., 2009). MCs in the Jacarepaguá Lagoon have been detected in surface waters, zooplankton, and fish tissues consumed by humans (FREITAS DE MAGALHÃES; MORAES SOARES; AZEVEDO, 2001; FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; MAGALHÃES et al., 2003; GOMES et al., 2009; HAUSER-DAVIS et al., 2015).

Since Jacarepaguá Lagoon has ecological, scenic, cultural, and economic significance, it is critical to better understand toxic blooms dynamics. Thus, the purpose of this study was to create a comprehensive and all-season inventory of potential MC-producers, MC concentration and other cyanopeptides in the Jacarepaguá Lagoon; and to investigate the relationship between MC, the composition of the cyanobacterial community and environmental factors.

### MATERIALS AND METHODS

#### Study area

The Jacarepaguá Lagoon is part of a coastal lagoon complex located in Rio de Janeiro, RJ, Brazil ( $22^{\circ}59'00.4''$  S,  $43^{\circ}24'36.2''$  W). It is a shallow (average depth of 3.0), oligohaline (0.8–9.0) lagoon with slightly acid to alkaline conditions (pH 5.2–9.2) and warm water (18–31.4 °C) (GOMES et al., 2009).

## Sampling

Samplings were carried out monthly, from January to December, during 2019 in two different sites at Jacarepaguá Lagoon, defined as JAC18 (S 22° 58' 36.8", W 43° 22' 48.5") and JAC20 (S 22° 59' 14.1", W 43° 24' 9.6") (Fig. 1). The salinity, pH and dissolved oxygen (DO) of the water were measured using a multiparametric probe (YSI model 600 QS) in the subsurface (0.5 m); water transparency was measured through the disappearance depth of the Secchi disk and the euphotic zone estimated as 2.7 times the extinction depth of the Secchi disk (COLE, 1994). Integrated samples of the water column from each sampling site were obtained with a PVC collection tube 1.0 m high x 4.2 cm in diameter, packed in plastic bottles, cooled, and taken to the laboratory for chlorophyll-a analysis (100 ml), nutrients (500 ml) and microcystins (8 ml). The phytoplankton samples (100 mL) were immediately preserved with acid Lugol's solution. Phytoplankton populations were enumerated according to the settling technique (Utermöhl 1958) in random fields (Uhelingher 1964), using an inverted microscope (Olympus, CKX41). The biovolume  $(mm^3 L^{-1})$  was estimated by multiplying the density of each species by the average volume of its cells (Hillebrand et al., 1999). The chlorophyll-a concentration was measured using a PHYTOPAM phytoplankton analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The total nitrogen (NT), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), dissolved inorganic nitrogen (DIN), total phosphorus (TP) and soluble reactive phosphorus (SRP) concentrations were measured using flow injection analysis according to manufacturer instructions (FIAlab 2500, FIALab Instruments Inc., Seattle, Washington). The SRP samples underwent filtration using GF-3 filters (Macherey-Nagel), while TP was initially treated with potassium persulfate and subsequently assessed as SRP (GROSS & BOYD in 1998).

The cyanotoxins samples were filtered in the laboratory, the filters were used for quantification of the intracellular MC content and the filtrate for the extracellular MC. The microcystins analysis and other peptides was performed as describe in the chapter I. Rainfall data were consulted in the free database of the Instituto Nacional de Meteorologia, Jacarepaguá Station (A636).

Fig. 1. Geographic location of sampling sites at Jacarepaguá Lagoon



Subtitle: Geographic location of sampling sites at Jacarepaguá Lagoon, located in Rio de Janeiro, Brazil. Source: Google earth.

#### LC-MS/MS Parameters - Microcystins Quantification

MC were quantified using a 1260 Infinity chromatographic system, consisting of a 1290 VL pump, coupled with a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (HPLC-QqQ) (Agilent Technologies,Santa Clara, USA). The electrospray ionization source (ESI) was utilized in the positive mode at 3500 V. Nitrogen was used as the nebulizer (45 psi) and drying gas (5 mL min<sup>-1</sup> at 300 °C). A total of 10  $\mu$ L of each and blank samples were injected, and the chromatographic separations were carried out on a Luna C18 column (2) (150 × 2 mm × 3  $\mu$ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), performed at a 0.25 mLmin<sup>-1</sup> flow rate at 40 °C following a gradient ratio between phases A and B, with acetonitrile gradients ranging from 25 to 95 %. The mobile phases encompassed: Phase A - water containing 0.1% formic acid, and Phase B - acetonitrile. The initial composition started at 75% A, followed by a linear gradient reaching 95% B over 10 minutes. Subsequently, a holding period of 1.5 minutes at 95% B was observed. The initial composition of 75% A was then restored in 0.5 minutes and maintained for 6 minutes to permit column re-equilibration before the subsequent injection.

Prior to sample injection, the needle was washed in the flush port using acetonitrile/water (50:50, v/v) for 5 seconds. The QqQ instrument functioned in both full scan mode and selected reaction monitoring (SRM) mode, with the selection of specific m/z transitions. Monitoring took place in the positive ion mode for both single

and double-charged ions. The retention times of eluted peaks were cross-referenced with the MC standards. Characteristic precursor ions in SRM were established as follows: m/z 519 (RR), m/z 512 ([D-Asp3], RR), m/z 995 (LR), m/z 981 ([D-Asp3], LR), m/z 910 (LA), m/z 1045 (YR). Furthermore, diagnostic MC ions, specifically 135 m/z for Adda and 213 m/z for Glu-Mdha, were subjected to continuous monitoring.

Calibration standards of non-demethylated MCs were obtained from Abraxis (Eurofins®, Nantes, France) and prepared in methanol 75%. MC quantitation employed calibration curves, with linearity assessed using standard solutions ranging from 0.5  $\mu$ gL<sup>-1</sup> to 4  $\mu$ gL<sup>-1</sup> for MC-RR, [D-Asp3]MC-RR, MC-LR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LA, MC-LF, and MC-YR. Quantification of the demethylated MC structures was performed by relative quantification using the corresponding non-demethylated MC as analytical standards. Data processing was carried out using the Mass Hunter Qualitative Analysis Software and Mass Hunter Quantitative Analysis Software from Agilent Technologies, USA.

## LC-MS/MS Parameters - Metabolomics to cyanopeptides

Analyses were carried out on an LC-20D Shimadzu Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, USA) equipped with an electrospray source and controlled by a Bruker Compass/HyStar workstation. Intracellular extract samples and blank samples (MeOH 100%) were injected (10  $\mu$ L) onto a Luna C18 (2) column (150 × 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of ultra-pure water obtained from a direct-Q8 water purification system (Millipore, Billerica, USA) (A) and acetonitrile (Sigma-Aldrich) (B), both containing 0.2% formic acid (Sigma-Aldrich). All solvents used in the study were HPLC grade. Chromatographic separation was performed at a 0.4 mL.min<sup>-1</sup> flow rate with a linear gradient of solvent B, from 5% to 90%, over 25 min. Ionization source conditions were as follows: positive ionization, capillary potential of 4000 V, drying gas temperature (N2) 200°C at a flow rate of 8 mL/min, and nebulizer pressure of 45 psi. Mass spectra were acquired using electrospray ionization in positive mode over an *m/z* range of 50–

1800. QTOF operated in MS scan mode and auto MS/MS mode, performing MS/MS experiments on the three most intense ions from each MS survey scan. The mass calibration was performed with sodium formate (Sigma-Aldrich). High-resolution MS (HRMS) data were processed using Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonics, Germany).

LC-MS/MS data were converted to .mzXML format with DataAnalysis<sup>©</sup> software and pre-filtered in MSConvert<sup>®</sup>. The data were entered into the GNPS<sup>®</sup> platform (https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp) to generate the molecular network using the Classical Molecular Networking tool. Along with the sample data, data of MS2 internal standard of known compounds were also introduced into the GNPS and seeded into the molecular network (aeruginosin NAL2 m/z 587.3571  $[M+H]^+$ ; guanitoxin m/z 253.1051  $[M+H]^+$ ; cyanopeptolin 1020 m/z 1021.5368  $[M+H]^+$ ; cyanostatin B m/z 754.4426  $[M+H]^+$ ; mycosporins-lysine m/z 317.1368  $[M+H]^+$ ; microginin KR787 *m/z* 788.4016  $[M+H]^+$ ; namalide B *m/z* 576.3391  $[M+H]^+$ ; namalide C m/z 562.3235 [M+H]<sup>+</sup>; namalide D m/z 560.3561 [M+H]<sup>+</sup>; nodularin-R m/z825.4490 [M+H]<sup>+</sup>; Dhb5-nodularin *m/z* 811.4328 [M+H]<sup>+</sup> porphyra 334 *m/z* 347.1431  $[M +H]^+$ ; shizopeptin 791 m/z 792.4802  $[M+H]^+$ ; shinorine m/z 333.128  $[M+H]^+$  and spumigin 638 m/z 639.3109  $[M+H]^+$ ). Cytoscape<sup>©</sup> software was used to visualize molecular networks. The SIRIUS<sup>©</sup> and ChemCalc<sup>©</sup> platforms were used to search for prospective molecular formulas. The search for known compounds took place in the databases PubChem<sup>©</sup>, Chemspider<sup>©</sup>, Metlin<sup>©</sup>, NPAtlas<sup>©</sup>, Dictionary of Natural Products<sup>©</sup>, GNPS, MetaboScape 4.0 (Bruker Daltonics, Germany) software and CyanoMetDB (JONES et al., 2020).

### **Statistical Analysis**

Normality Test (Shapiro-Wilk), Equal Variance Test (Brown-Forsythe), ANOVA (Two-way) and post-hoc test (Holm-Sidak) was performed using Sigmaplot<sup>®</sup> software, aiming investigate variance between groups besides univariate dimension with a possible interaction between the source of variation; Pearson Analysis and Redundance Analysis (RDA) performed with R Studio<sup>®</sup> 4.0.2 and Canoco<sup>®</sup> 5.0 software, respectively, were applied to the dataset to explore relationships between variables.

## RESULTS

The Jacarepaguá Lagoon presented an annual depth median of 1.4 m, with a euphotic zone ( $Z_{eu}$ ) of 0.7 m, salinity of 2.2, and water temperature (WT) of 26.9 (± 3.1) °C. We recorded an annual TP median of 825.78  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, ranging from 497.13  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 1177.34  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; TN presented a median of 4740  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, ranging from 2217.19  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 8641.95  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; total chlorophyll had a median of 103.08  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, ranging from 28.10  $\mu$ g  $L^{-1}$  to 196.09 µg  $L^{-1}$  (Fig. 2). The lagoon was monitored at two different sampling sites; there were no significant spatial differences in Z<sub>eu</sub>, Rainfall, WT, DO, Saturation O<sub>2</sub>, pH, Cond, turbidity, Alkal, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, DIN, TN, SRP, TP, N:P, total chlorophyll and cyanobacteria chlorophyll. Thus, we combined the data for the two sampling sites (Table 1). In the meantime, we recorded differences for some environmental variables considering climatic seasons; rainy season (Oct-Mar) presented warms WT (+5°C;  $F_{1,20} = 34.39$ ; p <0.05), pH more basic 1.1 times (9.04 (±1.3);  $F_{1,20} =$ 8.40; P <0.05), reduction of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (2.2 times;  $F_{1.20} = 6.78$ ; p <0.05), decrease of Z<sub>eu</sub> (1.5 times;  $F_{1,20} = 3.1$ ; p <0.05), and increase of TP (1.2 times;  $F_{1,20} = 7.51$ ; p <0.05) than dry season (Apr - Sep). There were no interactions between sampling sites and climatic seasons for any measured variable (p < 0.05).

variable	, measure	u III 2	m m	
Jacarepaguá Lagoon.				
Variables	Year			
	Median	Min	Max	
Secchi (m)*	0.28	0.11	0.75	
Zeu (m)*	0.74	0.30	2.03	
Rainfall (mm <sup>3</sup> )	2.07	1.56	2.55	
Water Temp (°C)	27.18	22.45	32.39	
DO (mg L <sup>-1</sup> )	8.53	3.17	20.29	
Saturation $O_2$ (%)	112.70	41.60	258.10	
pH*	8.15	6.94	11.12	
Conductivity (µS cm <sup>-1</sup> )	4289.50	767.00	9004.00	
Salinity	2.22	0.32	5.03	
Alkalinity ( $\mu Eq L^{-1}$ )	2225.97	1489.98	2765.12	
$NO_{3}^{-}$ (µg L <sup>-1</sup> )	166.82	40.28	982.66	
$NO_2^-$ (µg L <sup>-1</sup> )	99.93	6.32	540.71	
$NH_4^+ (\mu g L^{-1})$	1710.85	94.29	5014.42	

Tab 1. Medians and range of limnological variables, measured in 2019 in

DIN (µg L <sup>-1</sup> )	2240.09	160.37	5069.98
TN (μg L <sup>-1</sup> )	4748.29	2217.29	8641.95
SRP ( $\mu g L^{-1}$ )	581.81	334.50	1468.43
TP (μg L-1)	825.78	497.13	1177.34
N:P	6.33	3.03	9.40
Chl-a Total (µg L <sup>-1</sup> )	103.08	28.10	196.09
Chl-a Cyano (µg L <sup>-1</sup> )	78.24	0.00	196.09

Subtitle: Secchi,  $Z_{eu}$  euphotic zone, WT water temperature, DO dissolved oxygen, Saturation O<sub>2</sub>, pH, Cond electrical conductivity, Salinity, Alkal alkalinity, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nitrate; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nitrite and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ammonium, DIN dissolved inorganic nitrogen, TN total nitrogen, SRP soluble reactive phosphorus, TP total phosphorus, N:P rate nitrogen/phosphorus; Chl-*a* Total, total chlorophyll-a; Chl-*a* Cyano, cyanobacteria chlorophyll.

\* Significant difference between rainy and dry seasons (P < 0.05).

Fig. 2. Variation of total phosphorus (a), total nitrogen (b) and chlorophyll-a (c) concentrations in the water column in Jacarepaguá Lagoon during 2019.



Subtitle: Variation of total phosphorus (a), total nitrogen (b) and chlorophyll-a (c) concentrations in the water column in Jacarepaguá Lagoon during 2019. Mesotrophic, eutrophic and hypereutrophic were classified by Nürnberg (1996). The lines in the boxes indicate the median values, and the limits of the boxes, traces, and dots encompass, respectively, 75, 90, and 95% of the data. Outliers were excluded to avoid the flattening of the graphs.

#### Cyanobacteria and Potential microcystin producer's

Cyanobacteria dominated the lagoon year-round, representing a mean of 66.5% ( $\pm$  37) of the total phytoplankton, and were the dominant group for nine months in JAC18 and eight in JAC20 (Fig. 3a,b). Among cyanobacteria, the potential MC-producers represented 34% of biovolume in JAC18 and 43% in JAC20 during the study. *Planktothrix isothrix, Microcystis aeruginosa,* and *Synechococccus nidulans* were the most representative of potential MC-producer species during the study (Fig. 3c,d). However, we also recorded the presence of *Aphanocapsa* sp. (Mar-19) and *Pseudanabaena minima* (Apr-19) as potential MC producer. The rmANOVA showed significative temporal variation in Cyanobacteria biovolume (F = 24.40; p < 0.05) and MC producer's biovolume during the study (F = 20.61; p > 0.05). But there are no differences between rainy and dry seasons, sampling sites, or interaction between them for cyanobacteria biovolume (F<sub>1,20</sub> = 0.0025; F<sub>1,20</sub> = 0.11; F<sub>1,20</sub> = 0.0003; P > 0.05) and MC producer's biovolume (F<sub>1,20</sub> = 0.18; F<sub>1,20</sub> = 0.17; F<sub>1,20</sub> = 0.002; P > 0.05).

Fig 3. Relative abundance of phytoplanktonic groups, cyanobacteria biovolume and microcystins producer biovolume at Jacarepaguá Lagoon in 2019.



Subtitle: Proportion of phytoplanktonic groups biovolume, cyanobacteria biovolume in JAC18 (a) and JAC20 (b), and microcystins producer biovolume  $(mm^3 L^{-1})$  over time in JAC18 (c) and JAC20 (d) at Jacarepaguá Lagoon in 2019. \*Others in figure 3a,b represents Euglenophyceae, Xanthophyceae and Chromulinaceae.

## Dynamics of microcystins and other cyanopeptides

The total MC recorded in Jacarepaguá Lagoon varied from 0.44 to 0.62  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, mean of 0.49 (± 0.05)  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 4). The two-way ANOVA showed no differences between sampling sites (F<sub>1,18</sub> = 0.66; P > 0.05), climatic seasons (F<sub>1,18</sub> = 1.85; P > 0.05), and interactions between them (F<sub>1,18</sub> = 0.11; P > 0.05). The rmANOVA did not show significant variation over time in the total MC (F = 0.44; P > 0.05).

> Fig. 4. Total microcystins concentrations in the two sampling sites at Jacarepaguá Lagoon in 2019.

91



Subtitle: Total microcystins concentrations in JAC18 and JAC20 sites at Jacarepaguá Lagoon. \* Not analyzed.

Six MC variants (MC-RR, [D-Asp<sup>3</sup>]-RR, [Leu<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>]MC -HibleR1. ,- [LBeu1,Glu(OMe)6]MC -,Land [ADMAdda5 ,MeSer7]MC-LR) NMeSer7]MC were identified in water samples at Jacarepaguá Lagoon, but [Leu<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>]MC -HphR -Land [ADMAdda5, MeSer7]MC-LR NMeSer7]MC - **[Beu1**,Glu(OMe)6]MC was under quantification limit. We quantified MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]-RR in both intra and extracellular samples. The MC-RR was the most abundant variant, representing a mean of 56% (0.15  $\pm 0.02 \ \mu g \ L^{-1}$ ) of the intra-MC amount and 60% (0.13  $\pm 0.005 \ \mu g \ L^{-1}$ ) <sup>1</sup>) of extracellular MC (Fig. 5). January presented the highest intra-MC concentration, a mean of 0.40 ( $\pm$  0.008) µg L<sup>-1</sup> for both sites during the study; this value was 1.6 times more than the mean recorded from the other months, 0.25 ( $\pm$  0.04) µg L<sup>-1</sup> (Fig. 5a,b). The extra-MC presented a mean of 0.21 ( $\pm$  0.006 µg L<sup>-1</sup>); there were no differences between climatic season ( $F_{1,20} = 0.12$ ; P > 0.05), but we recorded differences between sampling sites ( $F_{1,20} = 6.96$ ; P < 0.05) and significant interaction between sampling sites and climatic seasons ( $F_{1,20} = 5.78$ ; P < 0.05) (Fig. 5c,d). The intra-MC concentration presented no differences between sampling sites ( $F_{1,18} = 0.27$ , P > 0.05), climatic season  $(F_{1,18} = 1.75; P > 0.05)$ , and no interactions between them  $(F_{1,18} = 1.26; P > 0.05)$ . Also, no significant temporal variations were identified in the intra and extra-MC during the study (F = 0.03, F = 0.01; P > 0.05).



Fig. 5. Intracellular and extracellular microcystins variants concentrations at Jacarepaguá Lagoon in 2019.

Subtitle: \* Sample not analyzed.

## Relationship between microcystins and environmental factors

The Pearson correlation revealed that there were some statistically significant correlations. (Fig. 6a,b). Total chlorophyll, cyanobacteria chlorophyll, MC-producers biovolume, and MC-producers density had positively correlation with each other (P < 0.05) (Fig. 6a). However, among biomass proxies' variables, just cyanobacteria chlorophyll presented a correlation with total MC (r = 0.41; P < 0.05). Among MC-producers, *M. aeruginosa* and *Aphanocapsa* sp. biovolume were positively correlated with the intra-MC (r = 0.42, r = 0.49; P < 0.05), but just *M. aeruginosa* presented correlation with total MC (r = 0.41; P <0.05) (Fig. 6a). Regarding the MC variants, *M. aeruginosa* was associated with the MC-RR, while [D-Asp<sup>3</sup>]-RR was associated with *Aphanocapsa* sp. (Fig. 6a). The extra-MC shows no correlations with any biomass proxy or MC-producer species.

Regarding physicochemical factors, the total MC negatively correlated with  $NH_4^+$  and DIN (r = -0.48, r = - 0.54; P <0.05) (Fig. 6b); the variant MC-RR was positively correlated with pH (r = 0.52) and negatively correlated with  $NO_3^-$  (r = -0.42), while [D-Asp<sup>3</sup>]-RR variant was negatively associated with SRP (r = -0.40) (Fig. 6b). The extra-MC shows no correlations with any physicochemical factors.

Fig. 6. Pearson correlation analysis with biological, physicochemical variables and microcystins from Jacarepaguá Lagoon. (a) (b)



Subtitle: Pearson correlation analysis. Correlation between (a) MC, biomass proxies and MC-producers; (b) MC and physicochemical factors. Biov\_Producer – microcystins producers biovolume; Cyan\_Chla – cyanobacteria chlorophyll; Dens\_MC-producer – microcystins producers density; WT – water temperature; DO – dissolved oxygen; pH – hydrogen potential; Secchi secchi disc; TP – total phosphorus; TN – total nitrogen;  $NO_3^-$  nitrate;  $NO_2^-$  nitrite and  $NH_4^+$  ammonium, DIN dissolved inorganic nitrogen, SRP soluble reactive phosphorus: Rain – rainfall; MC\_Total – total microcystins; Intra\_MC – intracellular MC; Extra\_MC – extracellular MC; Asterisks indicate a significant correlation between two variables (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P< 0.001).

We also assessed the effects of environmental factors on the MC variants (sum of intra and extra-MC) by redundancy analysis (Fig. 7). The interpretation rate for the first two axes of RDA was 53.84% which can better explain the relationships investigated. The first axes clarified 39.39% of the data, and the second was 14.45%. Both MC variants were associated with axes one. WT temperature was positively correlated with MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]-RR variants, but pH, Alkal., and salinity was only correlated to MC-RR. Conversely,  $Z_{eu}$ , rainfall, TN, TP,  $NH_4^+$  SRP, and  $NO_3^-$  were negatively correlated with both MC variants.

Fig. 7. Ordination diagram of redundancy analysis (RDA) for microcystins variants associated with environmental factors.



Subtitle: WT – water temperature; DO – dissolved oxygen; pH – hydrogen potential; TP – total phosphorus; TN – total nitrogen;  $NO_3^-$  nitrate;  $NO_2^-$  nitrite and  $NH_4^+$  ammonium, DIN dissolved inorganic nitrogen, SRP soluble reactive phosphorus: Rain – rainfall; MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR – microcystins variants.

## Other peptides

The intracellular samples were additionally analyzed for oligopeptides other than MCs. We identified eight compounds belonging to three more cyanopeptides classes: aeruginosin, cyanopeptolin, and microviridins. All oligopeptides besides MC and their respective m/z are listed in ANEXO A.

## DISCUSSION

In the present study, we provided a description of microcystins' occurrence in the Jacarepaguá Lagoon. The system has been characterized as a hypertrophic system due to the high concentrations of nutrients and total chlorophyll (FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; GOMES et al., 2009; MERCEDES, 2020). However, unexpectedly, we observed a reduction in TP and total chlorophyll; TP presented an annual median of 825.78  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and a total chlorophyll median of 103.08 L<sup>-1</sup>, both variables half of the registered in 2015 (DE MAGALHÃES et al., 2017a). Meanwhile, cyanobacteria still dominate the system, representing more than 90% of biomass (chlorophyll and biovolume) for at least seven months, similar to those observed in previous studies (GOMES et al., 2009).

It is important to highlight that our investigation contemplated other cyanopeptides classes (aeruginosins, cyanopeptolins, microginins, microviridins, spumigins and namalides), but only MC class was quantified in our samples. The analysis identified year-round MC in the lagoon, with two dominating variants (-RR and [D-Asp<sup>3</sup>] RR), without temporal, seasonal, or spatial variation in total MC concentration and intra-MC during the study. Meanwhile, extra-MC, although varied between sampling sites, did not present temporal or seasonal significant fluctuation. Among potential MC-producers *M. aeruginosa* and *Aphanocapsa* sp. showed a positive correlation with MC; while *P. isothrix* and *S. nidulans*, although representative in the studied system, presented no significant correlation with MC. Nitrogen compounds, soluble reactive phosphorus, and warm water temperature appeared to be the main regulatory drive factor of MC concentration in the lagoon.

### **Potential MC producer's**

Although our investigation identified a slight improvement in some water quality variables (e.g., TP and chlorophyll), cyanobacteria remain dominating Jacarepaguá Lagoon. While most freshwater cyanobacteria struggle to endure in saline waters over prolonged periods, specific genera exhibit notable salt tolerance; some wellknown genera that produce microcystins (e.g., *Dolichospermum, Anabaenopsis, Microcystis*, and *Oscillatoria*) might even exhibit accelerated growth rates within saline habitats (ROBSON; HAMILTON, 2003; ROSS; SANTIAGO-VÁZQUEZ; PAUL, 2006; TONK et al., 2007; MILLER et al., 2010). In our study, the months where cyanobacteria were not dominant coincided with a reduction of the total phytoplankton community. At this time, we observed a reduction in salinity (- 1.5), conductivity, an increase of Z<sub>eu</sub>, and the representativity of Chlorophyceae, Cryptophyceae, and Bacillariophyceae groups. The reductions in cyanobacteria biomass and the other changes forementioned may result from increased of rainfall in the days before the sampling day. This phenomenon is well-established and known in coastal lagoons and works as a freshwater flush in the system (PAERL, 2014; PREECE et al., 2017). Apparently, in Jacarepaguá Lagoon, the runoff after precipitation carrying the cyanobacteria biomass out of the lagoon and favors other phytoplankton groups, as well as replacement in the dominant cyanobacteria specie; as the salinity level decrease, the M. aeruginosa, one of the highest salt tolerances of all cyanophytes (ORR; JONES; DOUGLAS, 2004; VERSPAGEN et al., 2006), was replaced by S. nidulans. Contrary to what we observed in our study, other studies have shown that temporary increases in freshwater flow into estuarine environments conduce a massive bloom of M. aeruginosa; it occurred in Patos Lagoon, located in the subtropical region of Brazil (MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999; LEMES et al., 2008) and also in Australian, North American, and Turkish estuaries (ROBSON; HAMILTON, 2003; PAERL et al., 2006; TAŞ; OKUŞ; ASLAN-YILMAZ, 2006). Although the immediate effects of rainfall on the cyanobacteria biomass and some environmental variables (e.g., salinity, conductivity) were notable in our study, our statistical analysis did not show differences between the rainy and dry seasons regarding cyanobacteria or MC-producers biomass.

Still, our results highlighted changes in the main dominant cyanobacteria specie in the studied lagoon; the potential MC-producer *P. isothrix* was a leading representative cyanobacteria during the study, dominating for seven and eight months in JAC18 and JAC20, respectively. This is intriguing since *M. aeruginosa* has been pointed out as the main dominant and prominent potential MC-producer in Jacarepaguá Lagoon (GOMES et al., 2009; DE MAGALHÃES et al., 2017a). From 1996 to 1999, a study on the phytoplankton community from the same system mentioned long-lasting blooms of *M. aeruginosa* (FREITAS DE MAGALHÃES; MORAES SOARES; AZEVEDO, 2001). The first record of the dominance of *Planktothrix* genera in the studied system was in 2006 for three months (*P. agardhii*, 10<sup>5</sup> trichomes L<sup>-1</sup>) (GOMES et al., 2009). After that, *P. agardhii* represented an average of  $\pm$  8% of total biovolume between November 2014 and January 2015 (DE MAGALHÃES et al., 2017b). Similarly, this gradual increase of *Planktothrix* dominance was described in Curonian Lagoon, Baltic Sea (PILKAITYTĖ et al., 2021). Indeed, records of *Planktothrix* spp. have become common in Brazilian eutrophic and hypereutrophic waterbodies (DA SILVA, 2009).

Regarding *M. aeruginosa*, during our study, it was dominant in January in both sampling sites, when the water temperature was above 32 °C, and in October in JAC20, when the water temperature exceeded 27 °C. These observations agree with former studies that showed *M. aeruginosa* strains are favored in elevated temperatures (LÜRLING et al., 2013; PENG et al., 2018; YANG et al., 2018). Still, an ecophysiology study performed with *M. aeruginosa* strain (MIC-08) from Jacarepaguá Lagoon showed the preference of this strain to grow in the high tested temperature, 30 °C (MESQUITA et al., 2020). On the other hand, we observed that when the P. isothrix was dominant, the average water temperature was 26 (±2.5) °C; although a tropical *Planktothrix* strain from Jacarepaguá Lagoon (Plank-09), as well as temperate strains (NIVA-CYA116 and NIVA-CYA126), also adapt to a wide range of temperatures, their optimum growth rate is around 27 °C (LÜRLING et al., 2013; GOMES; AZEVEDO; LÜRLING, 2015; MESQUITA et al., 2020). The filamentous Planktothrix spp. is a frequently reported genera in eutrophic and hypertrophic shallow, turbid, and polymictic lakes (RÜCKER; WIEDNER; ZIPPEL, 1997; SCHEFFER et al., 1997; NIXDORF; MISCHKE; RÜCKER, 2003), and are considered a potential MC-producer (IBELINGS et al., 2021). We also recorded the dominance of S. nidulans in February and April, in a situation of the greatest  $Z_{eu}$  and the lowest  $NO_2^-$  concentration. Even though there are no records of Synechococcus producing MC in Jacarepaguá Lagoon, toxic strains have been reported (SKULBERG et al., 1993; VARELI et al., 2013). All three dominant cyanobacteria genera in Jacarepaguá Lagoon during the study, Planktothrix, Microcystis, and Synechococcus, are considered potential MC-producer (BLÁHA; MARŠÁLEK, 1999; SIVONEN; JONES, 1999; OKSANEN et al., 2004; BRIAND et al., 2008; FURTADO et al., 2009; MOWE et al., 2014; HARKE et al., 2016; BURATTI et al., 2017; GIN et al., 2021); and although not dominant, Aphanocapsa spp. are recognized as well as MC-producer (DOMINGOS et al., 1999; SIVONEN; JONES, 1999).

### Microcystins and their variants

Historically, Jacarepaguá Lagoon has been presenting high MC concentrations, mainly during *M. aeruginosa* blooms, reaching frightening values of 979  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of MC in the seston (GOMES et al., 2009); the highest MC concentrations have been recorded in estuaries worldwide (PREECE et al., 2017). In this study, we recorded a considerable reduction in total MC concentration in Jacarepaguá Lagoon; the highest total MC concentration was 0.60  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in January when *M. aeruginosa* was dominant. *Microcystis* has always been identified as the main MC-producer specie in Jacarepaguá Lagoon (FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; GOMES et al., 2009). In addition, isolated *M. aeruginosa* strain MIC-08 from Jacarepaguá Lagoon is a recognized producer dmMC-LR and MC-LR in batch cultures (MESQUITA et al., 2020). Also, higher MC concentrations have been associated with the dominance of *M. aeruginosa* in other coastal lagoon and estuary environments in Colombia, Uruguay, Turkey, and United States (MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999; ALBAY; MATTHIENSEN; CODD, 2005; PICCINI et al., 2006; TAŞ; OKUŞ; ASLAN-YILMAZ, 2006; MANCERA; VIDAL, 2016).

Few studies record cyanobacterial blooms in coastal lagoons and they usually do not report MC concentrations (PREECE et al., 2017). However, based on available data, we can consider the MC concentration recorded in this study is low ( $0.44 - 0.62 \ \mu g \ L^{-1}$ ), compared with Patos Lagoon also in Brazil ( $0.16 - 244.8 \ \mu g \ L^{-1}$ ) (MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999; LEMES et al., 2008), Kucukcekmece Lagoon in Turkey (0.06- $24.2 \ \mu g \ L^{-1}$ ) (ALBAY; MATTHIENSEN; CODD, 2005) and La Albufera in Spain (0.05-  $9.34 \ \mu g \ L^{-1}$ ) (BRADT, 2001). In Curonian Lagoon in the south-eastern (SE) Baltic Sea, the total MC concentration also presented higher MC concentrations than the values recorded in Jacarepaguá Lagoon; in addition, the study showed the presence of 48 variants of cyanometabolites belonging to seven different classes and recognized spatial heterogeneity in the system (PILKAITYTÉ et al., 2021). We also found eight metabolites besides MC, from three different classes, aeruginosins, microviridins and cyanopeptolins. However, due to the lack of commercial analytical standards, metabolites were not quantified. Furthermore, no significant variation in MC concentration was perceived between the two monitored sites.

Although the low values of total MC recorded in our study do not represent risks to recreational water (US EPA,  $8 \mu g L^{-1}$ ), low MCs concentration have been found to cause adverse impacts to the aquatic food web and can reach humans (FREITAS DE MAGALHÃES: SOARES: AZEVEDO, 2001; FERRÃO-FILHO: MORAES DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; MAGALHÃES et al., 2003; SOARES; MAGALHÃES; AZEVEDO, 2004; LEHMAN et al., 2010; POSTE; HECKY; GUILDFORD, 2011). In fish, for instance, high levels of MC can accumulate in the muscle, thereby creating a route of MC exposure for humans; (FREITAS DE MAGALHÃES; MORAES SOARES; AZEVEDO, 2001; POSTE; HECKY; GUILDFORD, 2011). The first report of MCs in fish from coastal areas was in tilapia (Tilapia rendalli) harvested from the Jacarepaguá Lagoon in September of 1999; the MCs measured in fish muscle was  $337.3 \mu g / kg$ , approximately 42 times higher than WHO recommended consumption guidelines (FREITAS DE MAGALHÃES; MORAES SOARES; AZEVEDO, 2001).

Regarding MC variants, many toxigenic strains can produce several MC variants simultaneously, but usually, only one to three of them are dominant in any particular strain (PUDDICK et al., 2014; FASTNER; HUMPAGE, 2021). The literature points out some patterns, *in situ* and laboratory conditions, for de most studied cyanobacteria species concerning MC variant produce. *Microcystis* strains and field samples dominated by *Microcystis* spp. are reported to contain mostly microcystin-LR, -RR and -YR (SIVONEN; JONES, 1999; GKELIS et al., 2005; KEMP; JOHN, 2006; FAASSEN; LÜRLING, 2013; MOWE et al., 2014; BEVERSDORF et al., 2015; PILKAITYTĖ et al., 2021). These studies corroborate our findings once Pearson analysis suggests *M. aeruginosa* as a leading producer of MC-RR in the Jacarepaguá Lagoon. *Microcystis* was the only specie correlated with total MC and intra-MC, possibly because the MC-RR variant represented a significant amount of total MC (56-60%). In this way, we can suppose the reduction in MC concentration recorded in this study can result from changes in the dominant cyanobacteria species, as *Microcystis* is no longer representative in the lagoon.

In turn, *P isothrix*, the most representative potential MC-producer is Jacarepaguá Lagoon, was not correlated with MC or MC variants. However, a study has already shown a *Planktothrix* strain (Plank-09) from Jacarepaguá lagoon producing dmMC-RR, MC-RR, and MC-YR in batch culture (MESQUITA et al., 2020). In Curosian Lagoon

(Baltic Sea), the shift of MC-RR (2003) to [Asp<sup>3</sup>]MC-RR (2015 – 2017) was associated with reductions in Microcystis spp. and an increase in Planktothrix (PILKAITYTE et al., 2021). Other studies also have shown strains of *Planktothrix* producing demethylated [Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>] MC variants (PUDDICK et al., 2014; IBELINGS et al., 2021). There are also records of [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR and [D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>] MC-RR as a major MC in cultured strains and field samples from European Planktothrix (SIVONEN et al., 1995; FASTNER et al., 1999; BRIAND et al., 2005; KURMAYER et al., 2005; CERASINO et al., 2016). The [Asp<sup>3</sup>]MC-RR demonstrates nearly a 3-fold higher toxicity than its methylated MC-RR (CHORUS; WELKER, 2021b). In Europe, field populations of P. agardhii and P. rubescens have never been observed without MC concentration (KURMAYER; GUMPENBERGER, 2006). However, in Brazil, the occurrence of *P. isothrix* in a reservoir did not lead to the detection of MCs in this water body (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014). P. isothrix has already been recorded in all Brazilian territory; still, there was no direct association between the specie and MC concentration in a field population (DA SILVA, 2009). Frequently, P. isothrix and P. agardhii co-occur in Brazilian waters, making it difficult to distinguish between them and inducing both to be identified as P. agardhii, the best-known in the country (DA SILVA, 2009). This misunderstanding may have led to a lack of information associating *P. isothrix* and MC.

Yet, our statistical analysis correlated [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR with *Aphanocapsa* sp.; considered potential MC producers, *Aphanocapsa* spp. has been associated with MC in a Reservoir in the Northeast of Brazil (MAGALHÃES; LUZ; AGUIAR JUNIOR, 2019). And although our statistical analysis did not show any correlation, MC has also been detected for the halophilic *Synechococcus* in Salton Sea, USA (MC-YR) and Lake Bogoria, Kenya (KRIENITZ et al., 2003; CARMICHAEL; LI, 2006); Furthermore, a *Synechococcus* strain isolated from a waste stabilization pond (WSP) in Brazil produced MC in laboratory conditions (FURTADO et al., 2009). Associated with these surveys, we observed months in our study where we detected MC in the intracellular samples, but *M. aeruginosa* or other potential MC-producer was not present, except *S. nidulans*. In February and April *S. nidulans* represented 100% of the *potential MC-producer*, and the MC concentration at that time was 0.25  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (± 0.01). In May and August at JAC20, we observed only the presence of *S. nidulans* and *P. isothrix* and the MC concentration for this sampling site exceeded the annual average by 14% in the

and, or *P. isothrix* were producing MC in Jacarepaguá Lagoon.

## Relationship between microcystins and environmental factors

The cellular MC content has been evaluated in several studies to determine the effect of environmental factors such as nutrient availability, light, temperature, and pH (SONG et al., 1998; OH et al., 2000; DZIALLAS; GROSSART, 2011; JÄHNICHEN; LONG; PETZOLDT, 2011; TAO et al., 2012; PIMENTEL; GIANI, 2014; PUDDICK et al., 2016). However, few field studies address the issue in coastal ecosystems (PREECE et al., 2017). Data collected during our study showed the influence of nutrients in MC concentrations in Jacarepaguá Lagoon; in line with the literature, the decrease of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and SRP induced the increment of total MC, MC-RR, and [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR respectively. According, a mesocosm study verified that an increase in  $NO_3^{-1}$  and urea in a hypertrophic lake could lead to a 13-fold increase in total MC concentration (DONALD et al., 2011, 2013); and a laboratory study showed that  $NO_3^{-1}$ supply can increase MC cell quotas in M. aeruginosa strain, with the MC-RR being the most significantly improved (VAN DE WAAL et al., 2009). The WT, in turn, was positively associated with MC in this study; once warm temperatures increase in toxic cyanobacterial growth and toxin production due to an upregulation of the mcyB gene, which partially aids in controlling MC synthesis in *Microcystis* (KIM et al., 2005; PAERL; HUISMAN, 2008; SCHERER; BEZOLD; GADEMANN, 2016; SCHERER et al., 2017); or even select toxic Microcystis strains (DZIALLAS; GROSSART, 2011). Positive association between WT and MC (-RR, -LR, -YR) also was recorded in Curonian Lagoon (SE Baltic Sea) and Indian River Lagoon (Florida, USA) (LAUREANO-ROSARIO et al., 2021; PILKAITYTĖ et al., 2021).

Regarding salinity, very few studies have looked into the relationship between this variable and microcystin, despite numerous studies that have focused on the effects of other environmental factors (e.g., nutrients, light, temperature) on microcystin production (SELLNER; LACOUTURE; PARRISH, 1988; OTSUKA et al., 1999; ORR; JONES; DOUGLAS, 2004; MARTÍN-LUNA, BEATRIZ et al., 2015). In our study, a positive association between salinity and MC-RR was found. Similarly, in Kucukcekmece Lagoon (Turkey), it was observed that the highest MC concentration and highest salinity (8.8) were recorded concurrently, and not less importantly, *Microcystis* was dominating the system (ALBAY; MATTHIENSEN; CODD, 2005). However, a reverse scenario has been observed in the Indian River Lagoon (Florida, USA), where high MC concentrations are registered in lower salinity areas of the system, especially in the rainy season when *Microcystis* are dominant (LAUREANO-ROSARIO et al., 2021). Laboratory study using natural biomass of *Microcystis* spp. showed the cultures were salt-tolerant up to 9.8 g L<sup>-1</sup> and suggested preferential lysis of genotypes with lower salinity tolerance and toxigenicity; this increased the toxicity of the *Microcystis* spp. population and the apparent microcystin cell quota (ORR; JONES; DOUGLAS, 2004). But the high salt concentrations also can cause a decrease in the transcript levels of *mcyD*, one of the genes involved in microcystin synthesis, reducing the MC content in *M. aeruginosa* strain (PCC 7806) (MARTÍN-LUNA, BEATRIZ et al., 2015).

Despite the possible limitations of correlational analyses when drawing direct and generalist conclusions between environmental parameters and MC, the wealth of information found in correlation analyses should not be disregarded; this information is critical in helping to determine which parameters should be included in a monitoring program, for example. Thus, this study highlights the constraints MC occurrence presence in coastal lagoons, underscoring the significance of broadening the scope of research and surveillance concerning MC-producing cyanobacteria and environmental parameters. This investigation involves complexities, with likely divergent results depending on the geographic context. However, a better understanding of the interaction between environmental elements and MC levels in coastal waters will enable scientists, water resource managers, and public health authorities to take the necessary steps to protect the environment and human well-being.

#### CONCLUSION

Potential synergistic associations are suggested by the current study between MC concentrations, environmental and biological parameters in Jacarepaguá Lagoon. MC concentrations was low in this study; it presented no seasonality or spatial heterogeneity, but the highest values were recorded majority in the rainy season when *M. aeruginosa* also showed the highest biomass. We highlight the connection between rainfall (e.g., run-off), *M. aeruginosa*, and MC, as well nutrients (e.g., NH<sub>4</sub>+, NO<sub>3</sub>-, SRP), water temperature, and MC; appearing to be the main regulatory drive factor of MC concentration in the lagoon. Although *M. aeruginosa* has been pointed as the main MC-producer in the lagoon, *P. isothrix* was the leading representative cyanobacteria during the study; members of picoplankton *Aphanocapsa* spp. and *S. nidulans* were also associated with MC concentration. Furthermore, our samples also contain other peptide class than MC.

These findings suggest that the potential effects of MC on environmental health exist not necessarily when a bloom occurs since MC is present year-round, impacting the aquatic food web and potentially reaching humans. With this information, future efforts should focus on more frequent and long-term monitoring of cyanopeptides and their associated toxicity, including effects on ecosystem dynamics and human health.

#### REFERENCES

ALBAY, M.; MATTHIENSEN, A.; CODD, G. A. Occurrence of toxic blue-green algae in the Kucukcekmece Lagoon (Istanbul, Turkey). Em: Environmental Toxicology, 3, *Anais*...2005.

BEVERSDORF, L. et al. Microcystin mcyA and mcyE Gene Abundances Are Not Appropriate Indicators of Microcystin Concentrations in Lakes. *PLoS ONE*, v. 10, 2015. Disponível em:

<a href="https://www.semanticscholar.org/paper/da2a74756077ff6b80bc414da600f76ba2b2a1d">https://www.semanticscholar.org/paper/da2a74756077ff6b80bc414da600f76ba2b2a1d</a> c>.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. C. et al. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 1, p. 297–310, mar. 2014.

BLÁHA, L.; MARŠÁLEK, B. Microcystin Production and Toxicity of Picocyanobacteria as a Risk Factor for Drinking Water Treatment Plants. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, v. 92, p. 95–108, 19 mar. 1999. BRIAND, E. et al. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystinproducing strains in a bloom-forming Planktothrix agardhii (Cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, 2008.

BRIAND, J.-F. et al. Variations in the Microcystin Production of Planktothrix Rubescens (Cyanobacteria) Assessed from a Four-Year Survey of Lac Du Bourget (France) and from Laboratory Experiments. *Microbial Ecology*, v. 50, n. 3, p. 418–428, out. 2005.

BRUUN, P. Engineering projects in coastal lagoons. Em: *Coastal lagoon processes*. Amsterdam: Kjerfve B., 1994. p. 507–533.

BULEY, R. P. et al. Can Correlational Analyses Help Determine the Drivers of Microcystin Occurrence in Freshwater Ecosystems? A Meta-Analysis of Microcystin and Associated Water Quality Parameters. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 194, n. 7, p. 493, jul. 2022.

BURATTI, F. M. et al. Cyanotoxins: Producing Organisms, Occurrence, Toxicity, Mechanism of Action and Human Health Toxicological Risk Evaluation. *Archives of Toxicology*, v. 91, n. 3, p. 1049–1130, mar. 2017.

CARMICHAEL, W. W. et al. Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria (Blue-Green Algae). *Toxicon*, v. 26, n. 11, p. 971–973, jan. 1988.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxinsJournal of Applied Bacteriology. [s.l: s.n.].

CARMICHAEL, W. W.; LI, R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Systems*, v. 2, n. 1, p. 5, 2006.

CERASINO, L. et al. Multiannual Trend of Microcystin Production in the Toxic Cyanobacterium *Planktothrix Rubescens* in Lake Garda (Italy). *Chemistry and Ecology*, v. 32, n. 5, p. 492–506, 27 maio 2016.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water. [s.l: s.n.]

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. 2005.

DAWSON, R. M. The Toxicology of Microcystins. *Toxicon*, v. 36, n. 7, p. 953–962, jul. 1998.

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*, v. 40, n. 1, 2017a.

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*, v. 40, n. 1, p. 121–133, jan. 2017b. DOMINGOS, P. et al. First Report of Microcystin Production by Picoplanktonic Cyanobacteria Isolated from a Northeast Brazilian Drinking Water Supply. *Environmental Toxicology*, v. 14, n. 1, p. 31–35, fev. 1999.

DONALD, D. B. et al. Comparative Effects of Urea, Ammonium, and Nitrate on Phytoplankton Abundance, Community Composition, and Toxicity in Hypereutrophic Freshwaters. *Limnology and Oceanography*, v. 56, n. 6, p. 2161–2175, nov. 2011.

DONALD, D. B. et al. Phytoplankton-Specific Response to Enrichment of Phosphorus-Rich Surface Waters with Ammonium, Nitrate, and Urea. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e53277, 17 jan. 2013.

DOWNING, J. A. Limnology and oceanography: Two estranged twins reuniting by global change. *Inland Waters*, v. 4, n. 2, 2014.

DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic Microcystis Sp. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25569, 28 set. 2011.

FAASSEN, E. J.; LÜRLING, M. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. *Marine Drugs*, v. 11, n. 7, 2013.

FASTNER, J. et al. Characterization and Diversity of Microcystins in Natural Blooms and Strains of the Genera Microcystis and Planktothrix from German Freshwaters. *Fundamental and Applied Limnology*, v. 145, n. 2, p. 147–163, 27 maio 1999.

FASTNER, J.; HUMPAGE, A. HEPATOTOXIC CYCLIC PEPTIDES – MICROCYSTINS AND NODULARINS. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Ingrid Chorus and Martin Welker, 2021. p. 156–162.

FERRÃO-FILHO, A. S.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S. M. F. O. Influences of a Microcystis Aeruginosa Kützing Bloom on Zooplankton Populations in Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Limnologica*, v. 32, n. 4, p. 295–308, dez. 2002.

FREITAS DE MAGALHÃES, V.; MORAES SOARES, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin Contamination in Fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological Implication and Human Health Risk. *Toxicon*, v. 39, n. 7, p. 1077–1085, jul. 2001.

FURTADO, A. L. F. F. et al. Morphological and Molecular Characterization of Cyanobacteria from a Brazilian Facultative Wastewater Stabilization Pond and Evaluation of Microcystin Production. *Hydrobiologia*, v. 627, n. 1, p. 195–209, jul. 2009.

GIN, K. Y.-H. et al. Novel Cyanotoxin-Producing Synechococcus in Tropical Lakes. *Water Research*, v. 192, p. 116828, mar. 2021.

GKELIS, S. et al. Diversity of Hepatotoxic Microcystins and Bioactive Anabaenopeptins in Cyanobacterial Blooms from Greek Freshwaters. *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 3, p. 249–256, jun. 2005. GOMES, A. M. D. A.; AZEVEDO, S. M. F. D. O. E.; LÜRLING, M. Temperature Effect on Exploitation and Interference Competition among Microcystis aeruginosa, Planktothrix agardhii and, Cyclotella meneghiniana. *Scientific World Journal*, v. 2015, 2015.

GOMES, A. M. da A. et al. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS EM UMA LAGOA COSTEIRA HIPEREUTRÓFICA DO RIO DE JANEIRO/RJ (BRASIL) E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA SAÚDE HUMANA. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 329–345, jun. 2009.

HÅKANSON, L.; BRYHN, A. C. *Tools and Criteria for Sustainable Coastal Ecosystem Management*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

HARKE, M. J. et al. A Review of the Global Ecology, Genomics, and Biogeography of the Toxic Cyanobacterium, Microcystis Spp. *Harmful Algae*, v. 54, p. 4–20, abr. 2016.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Accumulation and Toxic Effects of Microcystin in Tilapia (Oreochromis Niloticus) from an Eutrophic Brazilian Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 112, p. 132–136, fev. 2015.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, 2018.

IBELINGS, B. W. et al. Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Chorus I and Welker M, 2021.

JÄHNICHEN, S.; LONG, B. M.; PETZOLDT, T. Microcystin Production by Microcystis Aeruginosa: Direct Regulation by Multiple Environmental Factors. *Harmful Algae*, v. 12, p. 95–104, dez. 2011.

JANSSEN, E. M. L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on cooccurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, v. 151, 2019.

JONES, M. R. et al. Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. *bioRxiv*, 2020.

JONES, M. R. et al. CyanoMetDB, a Comprehensive Public Database of Secondary Metabolites from Cyanobacteria. *Water Research*, v. 196, p. 117017, maio 2021.

KEMP, A.; JOHN, J. Microcystins Associated WithMicrocystis Dominated Blooms in the Southwest Wetlands, Western Australia. *Environmental Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 125–130, abr. 2006.

KJERFVE, B. Coastal lagoon processes. Coastal lagoon processes, 1994.

KNOPPERS, B.; KJERFVE, B. Coastal Lagoons of Southeastern Brazil: Physical and Biogeochemical Characteristics. Em: PERILLO, G. M. E.; PICCOLO, M. C.; PINO-QUIVIRA, M. (Ed.). *Estuaries of South America*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 35–66.

KRIENITZ, L. et al. Contribution of Hot Spring Cyanobacteria to the Mysterious Deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, n. 2, p. 141–148, mar. 2003.

KURMAYER, R. et al. Genetic Identification of Microcystin Ecotypes in Toxic Cyanobacteria of the Genus Planktothrix. *Microbiology*, v. 151, n. 5, p. 1525–1533, 1 maio 2005.

KURMAYER, R.; GUMPENBERGER, M. Diversity of Microcystin Genotypes among Populations of the Filamentous Cyanobacteria Planktothrix Rubescens and Planktothrix Agardhii: MICROCYSTIN GENOTYPES IN PLANKTOTHRIX. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 12, p. 3849–3861, 25 jul. 2006.

LEHMAN, P. W. et al. Initial Impacts of Microcystis Aeruginosa Blooms on the Aquatic Food Web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*, v. 637, n. 1, p. 229–248, jan. 2010.

LEMES, G. A. F. et al. Biodegradation of Microcystins by Aquatic Burkholderia Sp. from a South Brazilian Coastal Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, n. 3, p. 358–365, mar. 2008.

LÜRLING, M. et al. Comparison of Cyanobacterial and Green Algal Growth Rates at Different Temperatures: *Temperature and Phytoplankton Growth Rates*. *Freshwater Biology*, v. 58, n. 3, p. 552–559, mar. 2013.

MACHADO, J. et al. Mode of Action and Toxicity of Major Cyanobacterial Toxins and Corresponding Chemical Variants. Em: STILES, B. et al. (Ed.). *Microbial Toxins*. Toxinology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2018. p. 441–464.

MAGALHÃES, A. A.; LUZ, L. D.; AGUIAR JUNIOR, T. R. Environmental Factors Driving the Dominance of the Harmful Bloom *Miarroinggt@yandbacteria Aphanocapsa* in a Tropical Water Supply Reservoir. *Water Environment Research*, v. 91, n. 11, p. 1466–1478, nov. 2019.

MAGALHÃES, V. F. et al. Microcystins (Cyanobacteria Hepatotoxins) Bioaccumulation in Fish and Crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, v. 42, n. 3, p. 289–295, set. 2003.

MANCERA, J. E.; VIDAL, L. A. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras -INVEMAR. *FLORECIMIENTO DE MICROALGAS RELACIONADO CON MORTANDAD MASIVA DE PECES EN EL COMPLEJO LAGUNAR CIÉNAGA GRANDE DE SANTA MARTA, CARIBE COLOMBIANO*, v. 23, n. 1, 2016.

MARTÍN-LUNA, BEATRIZ et al. Variation in the synthesis of microcystin in response to saline and osmotic stress in Microcystis aeruginosa PCC7806. *Limnetica*, n. 34, p. 205–214, 15 jun. 2015.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Revista Brasileira de Biologia. OCORÊNCIA, DISTRIBUIÇAO E TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS NO ESTUÇRIO DA LAGOA DOS PATOS, RS, v. 59, p. 361–376, 1999. MEISSNER, S.; FASTNER, J.; DITTMANN, E. Microcystin Production Revisited: Conjugate Formation Makes a Major Contribution: Production of Cyanobacterial Toxins Strongly Underestimated. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1810– 1820, jun. 2013.

MESQUITA, M. C. B. et al. Direct Effects of Temperature on Growth of Different Tropical Phytoplankton Species. *Microbial Ecology*, v. 79, n. 1, p. 1–11, jan. 2020.

MILLER, M. A. et al. Evidence for a Novel Marine Harmful Algal Bloom: Cyanotoxin (Microcystin) Transfer from Land to Sea Otters. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. e12576, 10 set. 2010.

MOWE, M. A. D. et al. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology*, v. 73, n. AoP, 30 dez. 2014. Disponível em:

<a href="http://jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2014.1005">http://jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2014.1005</a>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

NEILAN, B. A. et al. Environmental Conditions That Influence Toxin Biosynthesis in Cyanobacteria: Regulation of Cyanobacterial Toxin Biosynthesis. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 1239–1253, maio 2013.

NIXDORF, B.; MISCHKE, U.; RÜCKER, J. Phytoplankton Assemblages and Steady State in Deep and Shallow Eutrophic Lakes – an Approach to Differentiate the Habitat Properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia*, v. 502, n. 1–3, p. 111–121, jul. 2003.

NÜRNBERG, G. K. Trophic State of Clear and Colored, Soft- and Hardwater Lakes with Special Consideration of Nutrients, Anoxia, Phytoplankton and Fish. *Lake and Reservoir Management*, v. 12, n. 4, p. 432–447, dez. 1996.

OH, H.-M. et al. Microcystin Production by *Microcystis Aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 176–179, jan. 2000.

OKSANEN, I. et al. Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* Sp. Strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 5756–5763, out. 2004.

ORR, P. T.; JONES, G. J.; DOUGLAS, G. B. Response of Cultured Microcystis Aeruginosa from the Swan River, Australia, to Elevated Salt Concentration and Consequences for Bloom and Toxin Management in Estuaries. *Marine and Freshwater Research*, v. 55, n. 3, p. 277, 2004.

OTSUKA, S. et al. Characterization of Morphospecies and Strains of the Genus Microcystis (Cyanobacteria) for a Reconsideration of Species Classification. *Phycological Research*, v. 47, n. 3, p. 189–197, set. 1999.

PAERL, H. Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*, v. 4, n. 4, p. 988–1012, 15 dez. 2014. PAERL, H. W. et al. Ecological Response to Hurricane Events in the Pamlico Sound System, North Carolina, and Implications for Assessment and Management in a Regime of Increased Frequency. *Estuaries and Coasts*, v. 29, n. 6, p. 1033–1045, dez. 2006.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate: Blooms like it hot. Science, 2008.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, 2012.

PENG, G. et al. Seasonally Relevant Cool Temperatures Interact with N Chemistry to Increase Microcystins Produced in Lab Cultures of *Microcystis Aeruginosa* NIES-843. *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 7, p. 4127–4136, 3 abr. 2018.

PICCINI, C. et al. Blooms of Single Bacterial Species in a Coastal Lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 10, p. 6560–6568, out. 2006.

PILKAITYTĖ, R. et al. Spatial and Temporal Diversity of Cyanometabolites in the Eutrophic Curonian Lagoon (SE Baltic Sea). *Water*, v. 13, n. 13, p. 1760, 25 jun. 2021.

PIMENTEL, J. S. M.; GIANI, A. Microcystin Production and Regulation under Nutrient Stress Conditions in Toxic Microcystis Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 18, p. 5836–5843, 15 set. 2014.

POSTE, A. E.; HECKY, R. E.; GUILDFORD, S. J. Evaluating Microcystin Exposure Risk through Fish Consumption. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 13, p. 5806–5811, 1 jul. 2011.

PREECE, E. P. et al. A Review of Microcystin Detections in Estuarine and Marine Waters: Environmental Implications and Human Health Risk. *Harmful Algae*, v. 61, p. 31–45, jan. 2017.

PUDDICK, J. et al. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Marine Drugs*, v. 12, n. 11, 2014.

PUDDICK, J. et al. Modulation of Microcystin Congener Abundance Following Nitrogen Depletion of a Microcystis Batch Culture. *Aquatic Ecology*, v. 50, n. 2, p. 235–246, jun. 2016.

ROBSON, B. J.; HAMILTON, D. P. Summer Flow Event Induces a Cyanobacterial Bloom in a Seasonal Western Australian Estuary. *Marine and Freshwater Research*, v. 54, n. 2, p. 139, 2003.

ROSS, C.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L.; PAUL, V. Toxin Release in Response to Oxidative Stress and Programmed Cell Death in the Cyanobacterium Microcystis Aeruginosa. *Aquatic Toxicology*, v. 78, n. 1, p. 66–73, jun. 2006.

RÜCKER, J.; WIEDNER, C.; ZIPPEL, P. Factors controlling the dominance of Planktothrix agardhii and Limnothrix redekei in eutrophic shallow lakes. *Hydrobiologia*, v. 342/343, p. 107–115, 1997.

SAIEG-FILHO, E. Ecologia do Fitoplâncton Marginal das Lagunas da Baixada de Jacarepaguá, Rio de Janeiro-RJ., 1986. .

SCHEFFER, M. et al. ON THE DOMINANCE OF FILAMENTOUS CYANOBACTERIA IN SHALLOW, TURBID LAKES. *Ecology*, v. 78, n. 1, p. 272– 282, jan. 1997.

SELLNER, K. G.; LACOUTURE, R. V.; PARRISH, C. R. Effects of Increasing Salinity on a Cyanobacteria Bloom in the Potomac River Estuary. *Journal of Plankton Research*, v. 10, n. 1, p. 49–61, 1988.

SIVONEN, K. et al. Variation of cyanobacterial hepatotoxins in Finland. Em: *The contaminants in the Nordic ecosystem, dynamics, pro-cesses and fate*. Amsterdam: Munawar M, Luotola M, 1995. p. 163–169.

SIVONEN, K.; JONES, G. J. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. [s.l: s.n.]

SKULBERG, O. M. et al. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). Em: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London: I. R. Falconer, 1993. p. 145–164.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and Depuration of Microcystins (Cyanobacteria Hepatotoxins) in Tilapia Rendalli (Cichlidae) under Laboratory Conditions. *Aquatic Toxicology*, v. 70, n. 1, p. 1–10, out. 2004.

SONG, L. et al. Microcystin Production of *Microcystis Viridis* (Cyanobacteria) under Different Culture Conditions. *Phycological Research*, v. 46, n. s2, p. 19–23, dez. 1998.

TAO, M. et al. Use of a Generalized Additive Model to Investigate Key Abiotic Factors Affecting Microcystin Cellular Quotas in Heavy Bloom Areas of Lake Taihu. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e32020, 23 fev. 2012.

TAŞ, S.; OKUŞ, E.; ASLAN-YILMAZ, A. The Blooms of a Cyanobacterium, Microcystis Cf. Aeruginosa in a Severely Polluted Estuary, the Golden Horn, Turkey. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 68, n. 3–4, p. 593–599, jul. 2006.

TONK, L. et al. Salt Tolerance of the Harmful Cyanobacterium Microcystis Aeruginosa. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 46, p. 117–123, 2 fev. 2007.

VAN DE WAAL, D. B. et al. The Ecological Stoichiometry of Toxins Produced by Harmful Cyanobacteria: An Experimental Test of the Carbon-Nutrient Balance Hypothesis: Ecological Stoichiometry of Toxin Production. *Ecology Letters*, v. 12, n. 12, p. 1326–1335, dez. 2009.

VARELI, K. et al. Hepatotoxic Seafood Poisoning (HSP) Due to Microcystins: A Threat from the Ocean? *Marine Drugs*, v. 11, n. 8, p. 2751–2768, 5 ago. 2013.

VASCONCELOS, V. Freshwater cyanobacteria and their toxins in Portugal. Em: *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Berlin: Chorus I, 2001. p. 62–67.

VERSPAGEN, J. M. H. et al. Water Management Strategies Against Toxic Microcystis Blooms In The Dutch Delta. *Ecological Applications*, v. 16, n. 1, p. 313–327, fev. 2006.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial Peptides — Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 530–563, jul. 2006.

WU, S. K. et al. Relationships between Microcystins and Environmental Parameters in 30 Subtropical Shallow Lakes along the Yangtze River, China. *Freshwater Biology*, v. 51, n. 12, p. 2309–2319, dez. 2006.

YANG, J. et al. High Temperature and PH Favor Microcystis Aeruginosa to Outcompete Scenedesmus Obliquus. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 5, p. 4794–4802, fev. 2018.

# 3 ARTIGO: "FLOC AND SINK" TECHNIQUE REMOVES CYANOBACTERIA AND MICROCYSTINS FROM TROPICAL RESERVOIR WATER

## (Microcosm performed in the Dry Season) doi: 10.3390/toxins13060405

## Abstract

Combining coagulants with ballast (natural soil or modified clay) to remove cyanobacteria from the water column is a promising tool to mitigate blooms. In many situations, these blooms are formed by toxin-producing species, and the effect of this technique on different toxic cyanobacteria has not been thoroughly investigated. In this study, we experimentally evaluated the potential effects of the "Floc and Sink" technique on releasing microcystins from the precipitated biomass. A combined treatment of poly-aluminum chloride (PAC) with lanthanum modified bentonite (LMB) and/or natural local red soil (LRS), was applied to natural blooms of a tropical Reservoir, mainly with Microcystis and Dolichospermum, in cylinders of 1 L. Biomass removal efficiency and intracellular (intra-MC) and extracellular (extra-MC) concentrations of microcystins were estimated. The combined PAC+LMB+LRS treatment showed to be the most efficient to remove cyanobacterial biomass. LC-MS analysis revealed six variants of MC (WR, YR, FR, LR, RR, and [D-Asp3]-RR) in the intracellular and only three in the extracellular samples (MC-YR, MC-LR, and MC-RR) of the initial biomass. At the end of the experiment, intra-MC concentration varied independently of biomass and was related with species composition of precepted biomass. Covariance analysis did not show a relation between the extra-MC concentration and biomass. PAC treatment promoted release of toxins and increased extra-MC. However, the combined use of PAC and LMB or LRS promoted a reducing extra-MC. Our results show the need for more detailed investigation of the effects of PAC on different toxin-producing cyanobacteria species and the potential adsorption capacity of microcystins by clays.

## INTRODUCTION

Cyanobacteria perform many vital functions to the health of ecosystems, especially as photosynthetic organisms (e.g., oxygen production and nitrogen-fixing); however, they have become an increasing issue worldwide mainly due to massive proliferation of toxins producing species lead by anthropogenic eutrophication (CHORUS; BARTRAM, 1999; HUISMAN et al., 2018). Cyanobacterial blooms represent a threat to human health and aquatic biota, mainly due to the potential contamination by toxins (CHORUS; BARTRAM, 1999; HUISMAN, 1999; HUISMAN et al., 2018).

Cyanotoxins comprise many compounds with wide variations in chemical structure with effects in different forms of life (invertebrates and vertebrates). The most common cyanotoxin in freshwaters is the hepatotoxic cyclic heptapeptide microcystin (MC), which presents more than 300 known variants (ROJAS; NUÑEZ; ZAMBRANO, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; LANKOFF et al., 2004; JONES et al., 2020). Studies have reported that MCs were shown to be tumor promoters, immunotoxicants, and endocrine disruptors (ROJAS; NUÑEZ; ZAMBRANO, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; LANKOFF et al., 2004). This toxin can penetrate liver cell membranes and inhibit protein phosphatases 1 and 2A, promote DNA fragmentation, necrosis, apoptosis, and intrahepatic bleeding, leading to death (CHORUS; BARTRAM, 1999; MERILUOTO; SPOOF; CODD, 2017). Currently, MC producing cyanobacteria blooms have been described in 80 countries, and the genera Microcystis and Planktothrix are considered the most potent sources because they are often associated with high levels of toxin (LI; DREHER; LI, 2016). However, the filamentous genus Dolichospermum (formerly Anabaena) contain species capable of producing MCs (LI; DREHER; LI, 2016), and are considered as potential MC producers in risk assessments (CHORUS; BARTRAM, 1999), mainly strains from high latitudes (HARADA et al., 1991; RANTALA et al., 2006; KOBOS et al., 2013). Producing strains have also been recorded at moderate latitude (DREHER et al., 2019) and low latitude (SANT'ANNA et al., 2008; SÁ et al., 2010).

Although the most coherent way to mitigate eutrophication is to reduce the external nutrient input (PAERL et al., 2016; HUISMAN et al., 2018), it is most difficult alternative in developing countries, where the sewage system and treatment are inefficient, requiring an expensive upgrade (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014). Furthermore, depending on the trophic level of system, there is a need to associate other strategies to control the internal nutrient load to accelerate the system's recovery (COOKE et al., 2016). The coagulation and precipitation of cyanobacteria and

phosphate as promising tools to manage eutrophication and its nuisance (LÜRLING et al., 2020). Both intact cells and phosphate are carried out of water column, bound to ballast, toward sediment. The coagulation step is a critical part of this technique because the coagulant can cause physiological or chemical stress to cell membranes, resulting in the release of intracellular toxins and P into water (LIU et al., 2004; SUN et al., 2012; MIRANDA et al., 2017). The ballast coagulant technique can be cheaper, depending on coagulant and ballast compounds' choice, and is proven safe (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019a; LÜRLING et al., 2020) However, environment's individual characteristics and the bloom forming-species need to be considered to determine the ideal combinations and dosages of the compounds (NOYMA et al., 2017). 'Floc & Sink' proved to be efficient in laboratory tests, cleaning the water column without cell lysis signal (LÜRLING et al., 2020). Also, water from the tropical Funil Reservoir (Brazil) could be cleared from cyanobacteria (NOYMA et At the time of those studies, the samples were comprised al., 2016, 2017). predominantly of small spherical colonial cyanobacteria (e.g., *Microcystis aeruginosa*, Sphaerocavum brasiliense, Microcystis panniformis). The majority of 'Floc and Sink' studies have been performed with Microcystis (DE MAGALHÄES et al., 2017b; NOYMA et al., 2017; THONGDAM et al., 2021). Some studies, however, indicated that the efficiency of the 'Floc and Sink' technique in cell removal varied among cyanobacteria species (MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019a). A recent study also mentioned that "the applicability of the technique to genera of cyanobacteria that have not yet been studied is unknown" (THONGDAM et al., 2021). One of the genera of which no information exists about how well it can be removed from water by the 'Floc and Sink' technique is the filamentous genus Dolichospermum that recently became dominant in the phytoplankton community of Funil Reservoir.

Inasmuch as controlling eutrophication and mitigating cyanobacteria nuisance have been considered a crucial challenge to agencies and companies responsible for producing and distributing potable water (SCHMIDT et al., 2008; PAERL; PAUL, 2012), insight in removal efficacy of filamentous *Dolichospermum* species is needed. The experiments executed here tested the hypothesis that the '*Floc & Sink*' technique is efficient to remove the cyanobacterial biomass composed of mainly *Dolichospermum circinalis* with undergrowth of *Microcystis aeruginosa* in a tropical deep Reservoir without releasing MCs.
# METHODOLOGY

### Sampling

Funil Reservoir is a eutrophic system, located in southern Brazil (22°30'S and 44°45'W) at 440 m of altitude, in a humid tropical climate area (Cwa in the Köppen, ALVARES et al.,2013). Since the 1980's, toxigenic cyanobacterial blooms with a dominance of *Microcystis aeruginosa* have been registered in Funil Reservoir (Rangel et al., 2012; Soares et al., 2009).

Water samples were collected in the dry season and concentrated with a plankton net (50  $\mu$ m mesh) to create a cyanobacterial suspension, yielding an initial concentration of ~155  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of chlorophyll-*a*. The total cyanobacteria biomass in the sample was composed of 71.75% *Dolichospermum circinalis* (Rabenhorst) Wacklin, Hoffmann & Komárek, 23.43% *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, 3.27% *Dolichospermum spiroidis* (Klebhan) Wacklin, L.Hoffmann & Komárek, and 1.21% *Microcystis panniformis* Komárek et al. At the time of sampling, the pH was 7.38 and water temperature was 21°C.

### **Chemicals and Materials**

The coagulant PAC (poly-aluminium chloride;  $Al_n(OH)_mCl3_{n-m}$ , r ~1.37 kg L<sup>-1</sup>, 9,5% Al, 21.0% Cl) was obtained from Purewater Efluentes (São Paulo, Brazil). Local red soil (LRS) was collected from the banks of the Funil Reservoir as described by Noyma et al. (2016), and the Lanthanum modified bentonite Phoslock<sup>®</sup> (LMB) was obtained from HydroScience (Porto Alegre, Brazil). LRS and LMB were used as ballast.

Floc & Sink assays

### Experiment 1 – Coagulant range

A range of PAC concentrations was tested (0, 1, 2, 3, and 4 mg Al L<sup>-1</sup>). This experiment has no replicates because it followed a regression design to evaluate the most appropriate and effective coagulant dosage. The assay was set up in glass tubes (10 x 200 mm) containing 60 mL of cyanobacteria suspensions with an initial concentration of ~155  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of chlorophyll-*a*. PAC was added at the surface and mixed with a metal rod for 30 seconds; the tubes were then incubated for two hours. After the incubation time, the tubes were visually inspected for flocs formation, and 5 mL aliquots were taken from the top and bottom of the tubes to determine the precipitation of cyanobacteria biomass. The chlorophyll-*a* concentration and the Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) (Genty et al., 1989) were measured using a PHYTO-PAM phytoplankton analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The pH also was measured in the tubes.

## Experiment 2 – Floc & Sink assays

Based on the first experiment, the coagulant (PAC) dose of 3 mg of Al  $L^{-1}$  was chosen as an effective dose. This 3 mg Al L<sup>-1</sup> of PAC was also combined with LMB  $(0.2 \text{ g L}^{-1})$ , LRS  $(0.2 \text{ g L}^{-1})$ , and LMB+LRS  $(0.1 \text{ g}^{-1} \text{ of each})$ . The dosage of ballast was calculated based on P from the water column and sediment (DE MAGALHÃES et al., 2017). The experiment was set up as triplicate in acrylic cylinders containing 1 L of cyanobacteria suspensions from Funil Reservoir. We tested four treatments: 1) only PAC, 2) PAC+LMB, 3) PAC+LRS, 4) PAC+LMB+LRS, while the fifth series (n = 3)remained untreated (Controls). The PAC was added first, followed by the immediate addition of a slurry of LMB and/or LRS in the top of the cylinders. Subsequently, the suspensions were mixed with a glass stirring rod, and after two hours, 15 mL- samples were collected from the top and bottom of the cylinders. 8 mL of sample were filtered through 1.2 µm glass fiber filters (85/70 BF, Macherey-Nagel) to quantify MCs. The filters were used to quantify intracellular MC, and the filtrate was used to quantify extracellular MC. Filter and filtrate samples were immediately frozen and kept at -20°C until the analysis. 5 mL- samples were used to quantify chlorophyll-a and  $\Phi_{PSII}$  by PHYTO-PAM phytoplankton analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany).

### Sample Analysis

### **Toxins Analysis**

Before the extractions, filters, and filtrates were freeze-dried (Sartorius GmbH, Germany). For the analysis of the intracellular toxins, 2.5 mL of 75% (v/v) methanol (MeOH) (Merck®) was added to the filters in an 8 mL glass tube. After vortexing the samples for 15 seconds, they were placed in a water bath (Buchi Heating Bath b-491) for 30 minutes at 60°C. The suspensions were transferred to new glass tubes. This extraction step was repeated twice, but this time with 2.0 mL of 75% (v/v) methanol. The new glass tubes containing 6.5 mL of extract were placed in the Speedvac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After drying, they were resuspended with 2 mL of MeOH 100% (v/v), vortexed for 15 seconds, filtered through  $0.45 \,\mu\text{m}$  PVDF membrane syringe filters (Analítica, Brazil) into amber glass vials for LC-MS/MS analysis. If needed, the samples with high MC concentrations were diluted in methanol 75% v/v before re-analysis. The lyophilized samples were resuspended with 2 mL of MeOH (100%), vortexed for 15 seconds, filtered through 0.45 µm PVDF membrane syringe filters (Analítica, Brazil) into amber vials for the analysis of dissolved toxins. Samples were then stored in a freezer (-20°C) until LC-MS/MS analysis.

Toxin determination in all samples was performed by liquid chromatographytandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a series 200 HPLC system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) coupled to electrospray ionization (ESI) mass spectrometer. Chromatographic separations were carried out on a Luna C18 column ( $150 \times 2$  mm; 5 µm particles, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phases consisted of 5 mM ammonium formate and 53 mM formic acid in water (mobile phase A) and 90% (v/v) acetonitrile (mobile phase B). Gradient elution was performed at a flow rate of 300 µL min<sup>-1</sup> and followed a linear increase from 10 to 90% B within 15 min, then it was held at 90% B for 2 min, and returned to the initial condition (10% B) within 12 min.

MS/MS experiments were performed using an API 365 triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion spray source. The instrument was operated using the selected reaction monitoring (SRM)

mode, with specific m/z transitions selected for the highest sensitivity and selectivity. Single and double-charged ions were monitored in positive ion mode. Characteristic precursor ions for SRM were m/z 519 (RR), 910 (LA), 986 (LF), 995 (LR), 1025 (LW), 1045 (YR), 512 ([D-Asp3] RR) and 981 ([D-Asp3] LR). As only MCs were detected in the studied samples, MC's quantification in SRM mode was based on the characteristic Adda fragment at m/z 135. Calibration standards of non-demethylated MCs were obtained from Abraxis (Eurofins®) and prepared in methanol 75%. Samples were quantification of the demethylated microcystin structures was performed by relative quantification using the corresponding non-demethylated microcystin as analytical standards.

#### **Statistical Analysis**

A one-way ANOVA analysis was performed to evaluate the differences in chlorophyll-*a* and MC concentration between treatments in the tool pack SigmaPlot 12.5. Pairwise multiple comparison procedures (Holm–Sidak) were applied to distinguish means that were significantly different (p < 0.05). The ANCOVA analysis was also performed in IBM SPSS Statistics® (20 version) to evaluate the linear relationship between biomass and MCs concentration.

### RESULTS

### **Coagulant Range**

In the experiment testing different doses of PAC, the cyanobacteria suspension presented no positive buoyancy, and after the incubation (2 hours), the majority of biomass was in the bottom of the tube, as shown in the untreated control (Fig. 1). The concentration of chlorophyll-a in the top 5 mL of the tubes containing PAC varied from

1.6 to 1.9 times more than in the bottom 5 mL of the control tube (Fig. 1). 3 mg L<sup>-1</sup> was the best dosage, reaching the high biomass concentration in the bottom of the tube. The pH decreased gradually with the increasing dose of PAC concentrations, from 1 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 1). Also, the  $\Phi_{PSII}$  reduced progressively in the top and bottom 5 mL in the PAC range tubes from 1 mg L<sup>-1</sup>.

Figure 1 - Coagulant range test results



Subtitle: Chlorophyll-*a* concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) in the top 5 mL (top light gray bars) and bottom 5 mL (lower dark gray bars), Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) (circles) and pH values (triangles) of 60 mL cyanobacteria suspensions incubated for 2 hours in the presence of different concentrations (1, 2, 3 and 4 mg Al L<sup>-1</sup>) of the coagulant PAC (poly-aluminum chloride). The control is represented by 0 mg Al L<sup>-1</sup>.

Floc & Sink assays

The cyanobacterial suspension in this experiment presented similar distribution in the water column. As indicated in the controls, the chlorophyll-*a* concentrations in the top of the cylinders were similar to the bottom even after the incubation time (Fig. 2). The addition of only PAC doubled the concentration of cyanobacterial biomass in both areas of the cylinders (Fig. 2). This effect was strongly modified when PAC was combined with a ballast. Virtually all biomass was precipitated to the bottom of the cylinders with the addition of LMB and/or LRS (Fig. 2). The chlorophyll-*a* concentration in the top of the cylinders in these treatments with ballast was 20 to 60 times lower than in the controls (Fig. 2A), while in the bottom of the cylinders there was 4.3 to 7.5 times more chlorophyll-*a* than in the control (Fig. 2B). One-way ANOVA indicated that these differences in chlorophyll-*a* concentrations among treatments were significant for both the top ( $F_{4,14} = 28.275$ ; p < 0.001) and the bottom ( $F_{4,14} = 22.910$ ; p < 0.001) of the cylinders. In the bottom of the cylinders, three homogeneous groups for chlorophyll-*a* concentrations were found: i) the lowest concentration was observed in the control; ii) similar to each other, but higher values were found for PAC, PAC+LMB, and PAC+LRS; iii) the highest concentrations were detected in the PAC+LMB+LRS treatment (Fig. 2B).

The  $\Phi_{PSII}$  did not show difference among treatments in the top of the cylinders (F<sub>4,10</sub> = 3.259; p > 0.001), but  $\Phi_{PSII}$  of PAC+LMB+LRS treatment was significantly lower than control and other treatments in the bottom of the cylinders (p = 0.002) (Fig. 2A and B). Differences were observed in pH just between control and all treatments (F<sub>4,10</sub> = 79.083; p < 0.001) (Fig. 2).

Figure 2 - Floc & Sink assays results



Subtitle: Chlorophyll-*a* concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) in the top 15 mL (A - top light gray bars) and bottom 15 mL (B lower dark gray bars), Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) in the top (A - filled circles) and bottom (B - open circles) and pH values (A - triangles) of 1 L cyanobacteria suspensions from Funil Reservoir incubated for 2 h in the absence (control) or presence of the coagulant (polyaluminum chloride, PAC 3 mg Al  $L^{-1}$ ) and coagulant combined with ballast (lanthanum modified bentonite, LMB 0.2 mg  $L^{-1}$ , and local red soil, LRS 0.2 mg  $L^{-1}$ ) separately or in binary mixtures (lanthanum modified bentonite, LMB 0.1 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.1 mg  $L^{-1}$ ). The dotted line indicates the initial chlorophyll-a concentration in the cylinders, error bars represent one standard deviation (n = 3), and similar letters indicate homogeneous groups according to the Holm-Sidak post*hoc* test (p < 0.05).

#### Effects on the microcystins concentrations

Total intracellular MC concentration in the top of the cylinders varied from 12  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 2049  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 3A) and in the bottom from 176  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 2180  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 3B). Total intracellular MC values in the top of the cylinders (Fig. 3A) were significantly higher in the control and the PAC treatment alone than in the other treatments (F<sub>4,12</sub> = 59.980; p < 0.001). Total intracellular MC concentration in the top of

the treatments combining PAC with a ballast was 40 times (PAC+LMB) to 148 times (PAC+LRS) lower than in the control. We also observed a significant difference between of total intracellular MC concentrations in the bottom of the cylinders ( $F_{4,13} = 23.326$ ; p < 0.001). The PAC+LMB+LRS treatment had the highest intracellular MC concentration in the bottom and was different from the control and PAC treatment (Fig. 3B). No difference was recorded in the bottom of the tubes among treatments that combined PAC and a ballast (Fig. 3B). Total intracellular MC concentration in the control in the bottom in the bottom of the tubes among treatments that combined PAC and a ballast (Fig. 3B).

Six intracellular MC variants were detected in the cyanobacteria used in the experiment: WR, YR, FR, LR, and [D-Asp3]-RR, while only three of those were found extracellularly (MC-YR, MC-LR, and MC-RR). MC-RR was the most abundant variant in both the intra- and extracellular samples, followed by MC-LR and MC-YR (Fig. 3, 4). When the chlorophyll-*a* concentration in the collected samples had dropped under 11  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, the variants MC-WR, MC-FR, and [D-Asp3]MC-RR were no longer detected. The concentration of the intracellular MC variants varied between treatments in the top of the cylinders and the bottom. The MC-RR was the most abundant, representing an average of the 69% in the top and 73% at the bottom of the cylinders. While the MC-YR was the less abundant, representing an average of the 69% in the top and 73% at the bottom of the 6% and 3% in the tube's top and bottom, respectively.

Figure 3 - Effects *Floc & Sink* on the intracellular microcystins concentrations



Subtitle: Intracellular concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) of microcystins and their variants in the tube's top (A) and bottom (B) in 1 L of cyanobacteria suspensions from Funil Reservoir incubated for 2 h in the absence (control) or presence of the coagulant (poly-aluminum chloride, PAC 3 mg Al L<sup>-1</sup>) and coagulant combined with ballast (lanthanum modified bentonite, LMB 0.2 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.2 mg L<sup>-1</sup>) separately or in binary mixtures (lanthanum modified bentonite, LMB 0.1 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.x'1 mg L<sup>-1</sup>). The black diamonds represent the total of intracellular MC in the treatments. Similar letters indicate homogeneous groups in the total MC according to the Holm-Sidak *post-hoc* test (p < 0.05).

Total extracellular MC concentrations in the top of the cylinders were much lower than intracellular concentrations and varied between 0.33  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and 3.14  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 4A). One-way ANOVA indicated significant differences in total extracellular MC concentrations in the top of the cylinders (F<sub>4,10</sub> = 8.174; p = 0.003). The PAC treatment was significantly different from the PAC+LMB and PAC+LRS and similar to PAC+LMB+LRS (Fig. 4A). Nevertheless, no difference was recorded among treatments with ballast and control at the top (Fig. 4A). The treatments combining PAC and ballast had 1 to 4.2 times less extracellular MC in the top than treatment with PAC only. Extracellular MC concentrations were also different among treatments in the bottom of the cylinders ( $F_{4,6} = 9.433$ ; p = 0.009). The Holm-Sidak post-hoc test indicated that extracellular MC concentrations in the bottom of the cylinders of PAC, PAC+LRS, and PAC+LMB+LRS were similar among themselves and higher than to control. (Fig. 4B). The highest concentration of extracellular MCs in the bottom of the cylinders were recorded in the PAC+LMB+LRS treatment, 5.67 µg L<sup>-1</sup> (Fig. 4B). The ANCOVA analysis did not show the influence of biomass on the extracellular MC concentration in the top ( $F_{1,9} = 2.127$ ; p = 0.179) and bottom ( $F_{1,8} = 1.534$ ; p = 0.251).





Subtitle: Extracellular concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) of microcystins and their variants in the tube's top (A) and bottom (B) in 1 L of cyanobacteria suspensions from Funil Reservoir incubated for 1 h in the absence (control) or presence of the coagulant (poly-aluminum chloride, PAC 3 mg Al L<sup>-1</sup>) and coagulant combined with ballast (lanthanum modified bentonite, LMB 0.2 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.2 mg L<sup>-1</sup>) separately or in binary mixtures (lanthanum modified bentonite, LMB 0.1 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.1 mg L<sup>-1</sup>). The black diamonds represent the total of intracellular MC in the treatments. Similar letters indicate

homogeneous groups in the total MC according to the Holm-Sidak *post-hoc* test (p < 0.05).

# DISCUSSION

In this study, we have tested the hypothesis that the 'Floc & Sink' technique could be efficient in removing the cyanobacterial biomass comprised of filamentous Dolichospermum and small colonial Microcystis species without releasing MCs in water from a tropical Reservoir. Our results indicate that biomass composed predominantly of Dolichospermum circinalis and Microcystis aeruginosa can be efficiently removed from the water column using a mixture of low dose coagulants and ballasts. PAC combined with LMB or LRS has similar efficacy here and this result is in accordance with previous studies carried out in tropical systems (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017). At odds with what was observed by Miranda et al. (2017) and Lucena-Silva et al. (2019), we recorded the release of MCs with a low dose of PAC (3 mg Al L-1) and in all combinations of PAC and ballast. The highest extracellular MC concentration was recorded in PAC+LMB+LRS, the most efficient treatment in removing biomass. Nevertheless, the decrease in MC concentration in the top of the cylinders treated with PAC+LMB and PAC+LRS and the lower concentration of MC when compared to solely PAC suggests the clays' potential capacity as ballast to remove dissolved microcystins from the water column (CHEN et al., 2008, 2010; SOO; RESEARCH ONLINE, 2010; LAUGHINGHOUSE et al., 2020).

### **Coagulant rage**

Algal morphology and other characteristics (such as motility, surface charge, and extracellular organic matter) influence the coagulation and sedimentation processes (Li et al., 2018). In laboratory conditions, Miranda et al. (2017) showed that similar concentrations of PAC resulted in distinct responses for blooms of the filamentous *Raphidiopsis raciborskii* (formerly *Cylindrospermopsis raciborskii*) and the colonial

Microcystis aeruginosa. Whereas the filamentous species (R. raciborskii) formed flocs and, subsequently, sank, the colonial species accumulated at the surface. Experiments with water sample dominated with the filamentous species *Planktothrix agardhii* and *R*. raciborskii also presented a trend to sink in a wide range of PAC concentrations (2 - 32)mg Al L<sup>-1</sup>) (LUCENA-SILVA et al., 2019a). In our experiment, the biomass concentration was higher in the bottom of the tube than in the top, possibly reflecting the coagulant effect on the dominant filamentous species, Dolichospermum circinalis. Based on these studies executed in fresh water, we could suggest a pattern, where the filamentous species response to PAC are sink and colonial spherical tend to float. This hypothesis is also supported by differences between our results and from the other study performed in the same system (NOYMA et al., 2016), in which the dominant species were the colonial spherical Sphaerocavum brasiliense (AZEVEDO and SANT' ANNA, 2003) Microcystis panniformis (KOMÁREK et al., 2002). With a similar designer the experiment tested a range from 1 to 32 mg Al<sup>-1</sup> of PAC, and in all concentrations, the biomass presented positive buoyance, accumulating in the top of the tubes (NOYMA et al., 2016).

During the experiment, we recorded a gradual decline in pH, started from 7 in control and 6.8 in the dose of 1 mg Al L<sup>-1</sup> to 6.5 in the highest PAC dose of 4 mg L<sup>-1</sup>, values considered safe to the cyanobacteria's physiological status (LÜRLING et al., 2020). The aluminum-based coagulant can cause a drop in pH due to the hydrolysis process, promoting cell lysis (COOKE et al., 2016). There are reports of this phenomenon in the literature from doses  $\geq 8$  mg Al<sup>-1</sup> (HAN; JEON; PARK, 2012a; NOYMA et al., 2016), almost three times more than the 3 mg AL L<sup>-1</sup> dose chosen as the optimal dose in this study. The  $\Phi_{PSII}$  was not affected up to 1 mg of AL L<sup>-1</sup> and decrease sharply from this concentration, being at odds with other studies where the decrease was recorded from 8 mg Al L<sup>-1</sup> (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017). Miranda et al. (2017) observed a reduction not only in the  $\Phi_{PSII}$  but also in the pH in water dominated by *Microcystis* when using higher doses of PAC (16 and 32 mg Al L<sup>-1</sup>) in the PAC range test. This suggests that there is no direct action of the PAC on the  $\Phi_{PSII}$ , may varying according to the physiological state of the organism or vary between species.

Floc & Sink of cyanobacteria

As we expected, the "Floc & Sink" experiment showed that D. circinalis and M. aeruginosa could be precipitated using a combination of a low dose of PAC and LMB and LRS as a ballast. These results are in agreement with other studies executed in tropical freshwater systems (PAN et al., 2006; NOYMA et al., 2016, 2017; DE MAGALHÃES et al., 2017b). Several coagulants and clays (as ballast) were already tested, aiming to find a safe, efficient, and cheaper treatment (PAN et al., 2012; LÜRLING; VAN OOSTERHOUT, 2013; LÜRLING et al., 2020). Among all tested materials, both combinations (PAC+LMB and PAC+LRS) have shown similar efficacy in removing cyanobacterial biomass in laboratory tests (NOYMA et al., 2016, 2017; MIRANDA et al., 2017). LMB is a commercial material, developed in the 1990s as Phoslock (VALSAMI-JONES; INTERNATIONAL WATER ASSOCIATION., 2004), which makes their use as ballast far more expensive than LRS, a material easily found in banks of natural aquatic systems in the southeast of Brazil (NOYMA et al., 2016). However, LMB has a great advantage over LRS that it immobilizes much more phosphate per unit product than LRS (MUCCI et al., 2018). We also decided to test the efficacy of these two materials together (LMB+LRS) combined with PAC to make a potential treatment cheaper. All tested treatments had similar total ballast dosage. However, the treatment with PAC+LMB+LRS removed 38% more biomass than the treatment with just a single ballast (PAC+LMB or LRS).

Surprisingly, a reduction in  $\Phi_{PSII}$  was observed in the bottom of the cylinders when LMB and LRS were used together. This parameter expresses the Photosystem II efficiency, giving a more realistic evaluation of physiological status of the cells under the tested conditions (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). However, we cannot assume that a reduction of 30% in  $\Phi_{PSII}$  reflects cell lysis (WEENINK et al., 2015; NOYMA et al., 2016). A reduction in  $\Phi$ PSII was already recorded using PAC (2 mg Al L<sup>-1</sup>) +  $\leq$  100 mg LMB L<sup>-1</sup> in tests with the filamentous species *Planktothrix rubescens*, but there was no evidence of cell damage (Lürling et al., 2020b). Miranda et al. (2017) used 4 mg Al L<sup>-1</sup> in the filamentous species *R. raciborskii* and 8 mg Al L<sup>-1</sup> in the small colonial *Microcystis* in *'Floc & Sink'* experiment, the pH and  $\Phi_{PSII}$  alterations were marginally affected, not damaging the cells during the incubation time. Thus, based on our data of pH and  $\Phi_{PSII}$ , we cannot affirm that lyses effectively happened. Although the lyses cannot be affirmed, it seems the stress in  $\Phi$ PSII may have stimulated some MC liberation.

### Effects of Floc & Sink technique on the MCs concentration

The '*Floc & Sink*' technique was proposed as a promising tool to manage eutrophication and cyanobacterial bloom (PAN et al., 2012; LÜRLING; VAN OOSTERHOUT, 2013; LÜRLING et al., 2020). One of the advantages of this technique is the possible coagulation and sinking of cells without lysis (PAN et al., 2012; LÜRLING; VAN OOSTERHOUT, 2013; LÜRLING et al., 2020), and a later degradation of cyanobacteria and their toxins on the sediment (HOLST et al., 2003; GRÜTZMACHER et al., 2010). In this way, we expected that the pH and  $\Phi_{PSII}$  would remain steady or with low variations, indicating no severe cell damage; and that the intra and extracellular MC amounts would remain unchanged after treatment.

In this study, six variants of MC were identified in the intracellular form fallowing the protocol described in Faassen and Lürling (2013), and their concentration was dependent on biomass concentration. The less abundant variants could not be quantified in low biomass. Just the three most abundant intracellular MC variants were also identified in the extracellular MC portion. Although, in our experiments, the dosage chosen of PAC (3 mg Al L<sup>-1</sup>) was below a critical dosage already described, and the pH remained stable and under a safe level (HAN; JEON; PARK, 2012b; NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019b; LÜRLING et al., 2020), we recorded variations in intra and extracellular MC values among the control and the treatments. Firstly, we cannot generalize the physiological responses; different cyanobacteria species will respond differently to the same treatment, and different strains of the same species may also respond differently (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), so this precludes direct comparison with other studies. Second, we also cannot consider that a variation in the intracellular MC portion is just a consequence of the release. We have a biomass comprised by a natural phytoplankton community, predominantly composed of two different species with morphological differences, and probably various strains producing MC or not. In that view, different species or strains may possess different buoyancy as seems exemplified in the controls by the discrepancy between the biomass indicator chlorophyll-a and the measured intracellular MC concentration: Whereas chlorophyll-a concentrations in both the top and the bottom of the tubes were similar (*see* Fig. 2), intracellular MC concentrations in the top were 10 times higher than in the bottom (*see* Fig 3 A, B). Also, we have the action of the treatment under all these variables mentioned above. An evaluation of the coagulation properties of 10 microalgae and cyanobacteria species showed that, not just the type of coagulant and dosage influence the effectiveness of the coagulation process but also the species (LAMA et al., 2016). Based on it, we presume that personal characteristics of species (e.g., morphology, mucous, surface charge, etc.) could affect the coagulation process. Thus, it was not expected that the distribution of species, and consequently the intracellular MC, in the cylinders flocculated biomass occurs homogeneously. In this way, with the methodology adopted in this study, we did not consider any variation in the intracellular MC portion as an irrefutable indicator of toxin release.

Among the coagulants already tested to remove cyanobacterial biomass, PAC is safer than other aluminum salt coagulants basically because a lower dose is needed to obtain efficient results. Consequently, there is less pH reduction, preventing cell lysis during the settling process and the liberation of intracellular toxins (GEBBIE, 2001; DE JULIO et al., 2010). However, we observed an increase of 2.3 and 4.6 times in the extracellular MC in the bottom and top of the cylinders, respectively, in the PAC treatment when compared with control. Similar studies set up in tropical systems, using PAC and evaluating cyanotoxins, differ from our findings. Miranda et al. (2017) applied a dose of 4 mg Al L<sup>-1</sup> in water samples dominated by *R.raciborskii* and *Microcystis* and did not observe any significative alteration in saxitoxins and MC concentration. Lucena-Silva et al. (2019) reported that PAC did not affect the extracellular MC fraction, indicating no cell lysis in experiments set up in water samples dominated by Planktothrix agardhii and R. raciborskii. A simple explanation for the divergences between our results and those in the published literature would be that the tests were carried out with biomass comprised of different cyanobacteria species. There is no data about the coagulation process with *Dolichospermum* species. Another possibility is the growth curve stage in our samples. The release of toxins appears to occur mainly, but not exclusively, during cellular senescence (CHORUS, INGRID & BARTRAM, 1999). From a physiological point of view, the PAC solution can be more toxic when the cells are in senescence (CHORUS, INGRID & BARTRAM, 1999).

In the 'Floc & Sink' experiment, we sampled both the top and bottom of the cylinders. We observed that the extracellular MC concentration was higher in the bottom of the cylinders, giving the impression that it was higher in more dense biomasses. Although the covariance analysis (ANCOVA) has shown that there is no effect of biomass on extracellular MC, we cannot ignore that the cell lysis may not happen immediately after the application of the treatment, occurring after cells sedimentation (SUN et al., 2012) and promoting more extracellular MC concentration in more dense biomasses. It may also happen during the filtration process due to initial slight cell damage promoted by PAC added to the mechanical action of the sampling process. Furthermore, MC release may not occur due to cell lysis specifically, but as a result of the chemical stress response. In laboratory, coagulation tests with Polyaluminum Ferric Chloride (PAFC) and the filamentous species R. raciborskii, an increase of extracellular saxitoxins was reported even without any indicator of cell lysis (LI et al., 2018). The authors attributed this result to the fact that filamentous species are more susceptible to external stress than small spherical colonial species. We emphasize that in this study, we did not use any direct test of cell lysis (e.g., Sytox green). However, we can say that lysis did not occur immediately after the application of the technique. Cell lysis would also increase the pigments in the tube and lead to a greater chlorophyll signal detected by Phyto-PAM (MUCCI et al., 2017), which did not happen. Additionally, MC's bioavailability in the water column is influenced by suspended particles' adsorption, especially clays (CHEN et al., 2008, 2010). MC desorption process was already described, and the stability of this bound MC depends on the clays' composition (MILLER et al., 2001; MILLER; HUTSON; FALLOWFIELD, 2005). Hence, it is possible that the MC molecules connected unstably to ballast particles after sedimentation were released by adverse reactions, increasing extracellular MC levels in the bottom of the cylinders. Nonetheless, more research is needed to disentangle possible coagulant MC-liberating and ballast MCadsorbing/desorbing effects. Some studies have indicated that a 'Floc and Sink' treatment can reduce biomass and MCs strongly (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), while also LMB itself could lower extracellular MC concentration by 61 to 86% (LAUGHINGHOUSE et al., 2020).

There are many possibilities for the non-homogeneity in dissolved MC in the water column, especially when the tests are carried out with a natural phytoplankton population and large water volumes. Another reason is the possible action of clays in reducing the concentration of dissolved MC. LMB and LRS adsorption may have indirectly influenced dissolved MC concentration, which would invalidate ANCOVA's results. The PAC+LMB treatment showed a significant reduction of extracellular MC (73%) compared to just PAC treatment on the tube's top (Fig. 4). If PAC promoted MC release, as we observed comparing to control, the reduction recorded in PAC+LMB treatment was due to LMB action. These findings agree with the recently reported capacity of LMB to lower extracellular MC concentration (CHEN et al., 2008, 2010). A similar activity could be observed in PAC+LRS treatment. The extracellular MC had a decrease of 88% in the top of the cylinders. Laboratory studies showed that sediment particles applied in the water column effectively reduced MC concentration to less than the detection limit (CHEN et al., 2008, 2010). No significant difference was observed in the bottom of the cylinders in all treatments.

Unexpectedly, no difference was recorded in the top of the cylinders in PAC+LMB+LRS treatment when compared to PAC treatment. A possible explanation for this divergence between this treatment and others with ballast is that the ballast compound showed no linear adsorption capacity. In the test with LMB at the doses of 50, 100, and 150 ppm, the decrease in MC concentrations was 61.2%, 86.0%, and 75.4% relative to the control (HOLST et al., 2003; PAN et al., 2012). Many studies have focused on the adsorptive capacity of MC in sediment (HOLST et al., 2003; PAN et al., 2003; PAN et al., 2012), but little is known exactly about the potential of MC adsorption by Lanthanum modified bentonite (LMB). These facts would justify the differences observed in extracellular MC concentration between treatments that contained ballast since we believe that MC's release was promoted by the PAC's action in all ballast treatments.

Although we observed an increase of extracellular MC concentration after application "*Floc and Sink*" technique, especially in the bottom of the cylinders of PAC, PAC+LRS, and PAC+LMB+LRS treatments, these extracellular MC amounts are negligible compared with the intracellular concentrations that range from 1200 to 2200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in the same treatments. For instance, in the most efficiency treatment in remove biomass, PAC+LMB+LRS it is less than 0.3%. Moreover, some authors consider that lyses after sedimentation of biomass is beneficial in reducing possibility of recolonization of the water column by wave or bioturbation actions, whereas the near the sediment liberated toxins can be adsorbed and degraded by decomposing bacteria (HOLST et al., 2003; PAN et al., 2012). These results show that '*Floc and Sink*' is a promising tool to manager toxic blooms. Although, we suggest a detailed investigation of PAC effects on different species of toxin-producing cyanobacteria, and additionally an investigation of the potential capacity for MCs adsorption in LMB and clays is needed.

# Conclusions

Our results showed that combining a low dose of coagulant with a ballast compound effectively removed from the water column a biomass composed predominantly of *Dolichospermum circinalis* and *Microcystis aeruginosa* and settled them in the bottom of the tubes. PAC+LMB+LRS was the most efficient combination to sediment the cyanobacteria biomass. Settled 38% more biomass than the treatment with just a single ballast (PAC+LMB or LRS). Although we observed an increase in extracellular concentrations of MC after the application of treatments, the concentrations were very low, which does not preclude technical use. Although the PAC promoted the release of MC, it was noted that this release is not immediate. This allows the combined application of PAC and ballast to promote this release close to the sediment. Enabling adsorption by the sediment itself or degradation by bacteria.

#### REFERENCES

CHEN, W., SONG, L., PENG, L., WAN, N., ZHANG, X., GAN, N., 2008. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions. Water Research 42(3), 763-773. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.007

CHEN, X., YANG, X., YANG, L., XIAO, B., WU, X., WANG, J., WAN, H., 2010. An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. Water Research 44(6), 1884-1892. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.025

CHORUS, I., FALCONER, I.R., SALAS, H.J., BARTRAM, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. Journal of Toxicology and

Environmental Health - Part B: Critical Reviews 3(4), 323-347. https://doi.org/10.1080/109374000436364

CHORUS, INGRID., BARTRAM, JAMIE., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management. E & FN Spon.

COOKE, G.D., WELCH, E.B., PETERSON, S., NICHOLS, S.A., 2016. Restoration and Management of Lakes and Reservoirs, Restoration and Management of Lakes and Reservoirs. Publisher, place. https://doi.org/10.1201/9781420032109

DE JULIO, T.S., OROSKI, F.I., GRAHAM, N.J.D., 2010. A methodology for optimising the removal of cyanobacteria cells from a brazilian eutrophic water. Brazilian Journal of Chemical Engineering 27(1), 113-126. https://doi.org/10.1590/S0104-66322010000100010

DE MAGALHÃES, L., NOYMA, N.P., FURTADO, L.L., MUCCI, M., VAN OOSTERHOUT, F., HUSZAR, V.L.M., MARINHO, M.M., LÜRLING, M., 2017. 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. 40, 121-133. https://doi.org/10.1007/s12237-016-0125-x

DREHER, T.W., COLLART, L.P., MUELLER, R.S., HALSEY, K.H., BILDFELL, SCHREDER, SOBHAKUMARI, FERRY. R.J., Ρ., A., R., 2019. Anabaena/Dolichospermum as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis Toxicon: Х 1. 100003. event. https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2018.100003

DZIGA, D., MAKSYLEWICZ, A., MAROSZEK, M., BUDZYŃSKA, A., NAPIORKOWSKA-KRZEBIETKE, A., TOPOROWSKA, M., GRABOWSKA, M., KOZAK, A., ROSIŃSKA, J., MERILUOTO, J., 2017. The biodegradation of microcystins in temperate freshwater bodies with previous cyanobacterial history. Ecotoxicology and Environmental Safety. 145, 420-430. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.046

FAASSEN, E.J., LÜRLING, M., 2013. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. Marine Drugs. 11,2643-2654. https://doi.org/10.3390/md11072643

GEBBIE, P., 2001. Using Polyaluminium Coagulants in Water Treatment. 64th Annual Water industry Engineers and Operators' Conference, pp 39-47.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll

fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 990, 87–92. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9

GRÜTZMACHER, G., WESSEL, G., KLITZKE, S., CHORUS, I., 2010. Microcystin elimination during sediment contact. Environmental Science and Technology 44(2), 657–662. https://doi.org/10.1021/es9016816

HAN, J., JEON, B.S., PARK, H.D., 2012. Cyanobacteria cell damage and cyanotoxin release in response to alum treatment. Water Science and Technology: Water Supply 12(5): 549–555.

HARADA, K.I., OGAWA, K., KIMURA, Y., MURATA, H., SUZUKI, M., THORN, P.M., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W., 1991. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. Chemical Research in Toxicology 4(5), 535–540. https://doi.org/10.1021/tx00023a008

HOLST, T., JØRGENSEN, N.O.G., JØRGENSEN, C., JOHANSEN, A., 2003. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. Water Research 37(19), 4748-4760. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00413-5

HUISMAN, J., CODD, G.A., PAERL, H.W., IBELINGS, B.W., VERSPAGEN, J.M.H., VISSER, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. Nature Reviews Microbiology 16, 471–483. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1

JANČULA, D., MARŠÁLEK, B., 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. Chemosphere 85(9), 1415-1422. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.036

KOBOS, J., BŁASZCZYK, A., HOHLFELD, N., TORUŃSKA-SITARZ, A., KRAKOWIAK, A., HEBEL, A., SUTRYK, K., GRABOWSKA, M., TOPOROWSKA, M., KOKOCIŃSKI, M., MESSYASZ, B., RYBAK, A., NAPIÓRKOWSKA-KRZEBIETKE, A., NAWROCKA, L., PEŁECHATA, A., BUDZYŃSKA, A., ZAGAJEWSKI, P., MAZUR-MARZEC, H., 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins in Polish freshwater bodies. Oceanological and Hydrobiological Studies 42, 358–378. https://doi.org/10.2478/s13545-013-0093-8

LAMA, S., MUYLAERT, K., KARKI, T.B., FOUBERT, I., HENDERSON, R.K., VANDAMME, D., 2016. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. Bioresource Technology 220. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080

LANKOFF, A., CARMICHAEL, W.W., GRASMAN, K.A., YUAN, M., 2004. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken

peripheral blood lymphocytes in vitro. Toxicology 204(1), 23-40. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.016

LAUGHINGHOUSE, H., LEFLER, F., BERTHOLD, D.E., BISHOP, W.M., 2020. Sorption of dissolved microcystin using lanthanum-modified bentonite clay. J. Aquat. Plant Manag. 58, 72–75.

LI, H., PEI, H., XU, H., JIN, Y., SUN, J., 2018. Behavior of *Cylindrospermopsis raciborskii* during coagulation and sludge storage – higher potential risk of toxin release than *Microcystis aeruginosa*? Journal of Hazardous Materials 347, 307–316. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.009

LI, X., DREHER, T.W., LI, R., 2016. An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. Harmful Algae. 54, 54-68. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.015

LIU, H., DU, Y., WANG, X., SUN, L., 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International Journal of Food Microbiology. 95, 147-155. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022

LUCENA-SILVA, D., MOLOZZI, J., SEVERIANO, J. DOS S., BECKER, V., LUCENA BARBOSA, J.E. DE, 2019. Removal efficiency of phosphorus, cyanobacteria and cyanotoxins by the "Floc & sink" mitigation technique in semi-arid eutrophic waters. Water Research. 159, 262-273. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.057

LÜRLING, M., KANG, L., MUCCI, M., VAN OOSTERHOUT, F., NOYMA, N.P., MIRANDA, M., HUSZAR, V.L.M., WAAJEN, G., MARINHO, M.M., 2020a. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. Ecological Engineering. 158, 106032. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.106032

LÜRLING, M., MUCCI, M., WAAJEN, G., 2020b. Removal of Positively Buoyant *Planktothrix rubescens* in Lake Restoration. Toxins. 12, 700. https://doi.org/10.3390/toxins12110700

LÜRLING, M., VAN OOSTERHOUT, F., 2013. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. Water Res. 47, 6527–6537. Doi: 10.1016/j.watres.2013.08.019.

MAGHSOUDI, E., PRÉVOST, M., VO DUY, S., SAUVÉ, S., DORNER, S., 2015. Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. Toxicon 103, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.007 MILLER, M.J., CRITCHLEY, M.M., HUTSON, J., FALLOWFIELD, H.J., 2001. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. Water Research 35(6), 1461-1468. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00419-X

MILLER, M.J., HUTSON, J., FALLOWFIELD, H.J., 2005. The adsorption of cyanobacterial hepatoxins as a function of soil properties. Journal of Water and Health. 03, 339-347. https://doi.org/10.2166/wh.2005.049

MIRANDA, M., NOYMA, N., PACHECO, F.S., DE MAGALHÃES, L., PINTO, E., SANTOS, S., SOARES, M.F.A., HUSZAR, V.L., LÜRLING, M., MARINHO, M.M., 2017. The efficiency of combined coagulant and ballast to remove harmful cyanobacterial blooms in a tropical shallow system. Harmful Algae. 65,27-39. https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.007

MUCCI, M., MALIAKA, V., NOYMA, N.P., MARINHO, M.M., LÜRLING, M., 2018. Assessment of possible solid-phase phosphate sorbents to mitigate eutrophication: Influence of pH and anoxia. Science of the Total Environment. 619–620. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.198

MUCCI, M., NOYMA, N.P., DE MAGALHÃES, L., MIRANDA, M., VAN OOSTERHOUT, F., GUEDES, I.A., HUSZAR, V.L.M., MARINHO, M.M., LÜRLING, M., 2017. Chitosan as coagulant on cyanobacteria in lake restoration management may cause rapid cell lysis. Water Research. 118, 121-130. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.020

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 118, 420-424. https://doi.org/10.1007/BF01629424

NOYMA, N.P., DE MAGALHÃES, L., FURTADO, L.L., MUCCI, M., VAN OOSTERHOUT, F., HUSZAR, V.L.M., MARINHO, M.M., LÜRLING, M., 2016. Controlling cyanobacterial blooms through effective flocculation and sedimentation with combined use of flocculants and phosphorus adsorbing natural soil and modified clay. xxx, 1-13. Water Research. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.057

NOYMA, N.P., DE MAGALHÃES, L., MIRANDA, M., MUCCI, M., VAN OOSTERHOUT, F., HUSZAR, V.L.M., MARINHO, M.M., LIMA, E.R.A., LÜRLING , M., 2017. Coagulant plus ballast technique provides a rapid mitigation of cyanobacterial nuisance. PLoS ONE. 12, 1-16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178976 PAERL, H.W., GARDNER, W.S., HAVENS, K.E., JOYNER, A.R., MCCARTHY, M.J., NEWELL, S.E., QIN, B., SCOTT, J.T., 2016. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. Harmful Algae. 54, 213-222. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009

PAERL, H.W., PAUL, V.J., 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. Water Research. 46, 1349-1363. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002

PAN, G., DAI, L., LI, L., HE, L., LI, H., BI, L., GULATI, R.D., 2012. Reducing the recruitment of sedimented algae and nutrient release into the overlying water using modified soil/sand flocculation-capping in eutrophic lakes. Environmental Science and Technology. 46, 5077-5084. https://doi.org/10.1021/es3000307

RANGEL, L.M., SILVA, L.H.S., ROSA, P., ROLAND, F., HUSZAR, V.L.M., 2012. Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric Reservoirs. Hydrobiologia. 693, 13-28. https://doi.org/10.1007/s10750-012-1083-3

PAN, G., ZOU, H., CHEN, H., YUAN, X., 2006. 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. 141, 206-212. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.047

PROCHAZKA, E., HAWKER, D., HWANG, G.S., SHAW, G., STEWART, I., WICKRAMASINGHE, W., 2010. The Removal of Microcystins in Drinking Water by Clay Minerals. Pagou, P. and Hallegraeff, G. (eds). Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2013.

RANTALA, A., RAJANIEMI-WACKLIN, P., LYRA, C., LEPISTÖ, L., RINTALA, J., MANKIEWICZ-BOCZEK, J., SIVONEN, K., 2006. Detection of microcystinproducing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (mcyE) PCR and associations with environmental factors. Applied and Environmental Microbiology. 72,6101-6110. https://doi.org/10.1128/AEM.01058-06

ROJAS, M., NUÑEZ, M.T., ZAMBRANO, F., 1990. Inhibitory effect of a toxic peptide isolated from a waterbloom of *Microcystis* sp. (cyanobacteria) on iron uptake by rabbit reticulocytes. Toxicon. 28, 1325-32. https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90097-Q

SANTOS, A., RACHID, C., PACHECO, A.B., MAGALHÃES, V., 2020. Biotic and abiotic factors affect microcystin-LR concentrations in water/sediment interface. Microbiological Research. 236, 126452. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126452

SOARES, M.C.S., MARIA, M.I., MARINHO, M.M., AZEVEDO, S.M.F.O., BRANCO, C.W.C., HUSZAR, V.L.M., 2009. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: Physical factors, nutrients and grazing effects. Aquatic Microbial Ecology. 57,137-149. https://doi.org/10.3354/ame01336

SÁ, L.L.C. DE, VIEIRA, J.M. DOS S., MENDES, R. DE A., PINHEIRO, S.C.C., VALE, E.R., ALVES, F.A. DOS S., JESUS, I.M. DE, SANTOS, E.C. DE O., COSTA, V.B. DA, 2010. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, no Município de Santarém (Pará, Brasil). Revista Pan-Amazônica de Saúde. 1. https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000100022

SANT'ANNA, C.L.A., TERESADE P. WERNER, V.R., DOGO, C.R., RIOS, F.R. DE C., 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. Algological Studies 126, 251–265. https://doi.org/10.1127/1864-1318/2008/0126-0251

SCHMIDT, W., BORNMANN, K., IMHOF, L., MANKIEWICZ, J., IZYDORCZYK, K., 2008. Assessing drinking water treatment systems for safety against cyanotoxin breakthrough using maximum tolerable values. Environmental Toxicology. 23, 337-45. https://doi.org/10.1002/tox.20341

SUN, F., PEI, H.Y., HU, W.R., MA, C.X., 2012. The lysis of *Microcystis aeruginosa* in AlCl<sub>3</sub> coagulation and sedimentation processes. Chemical Engineering Journal 193–194, 196–202. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.043

THONGDAM, S., KUSTER, A.C., HUSER, B.J., KUSTER, A.T., 2021. Low Dose Coagulant and Local Soil Ballast Effectively Remove Cyanobacteria (Microcystis) from Tropical Lake Water without Cell Damage. Water 13, 111. https://doi.org/10.3390/w13020111

VALSAMI-JONES, EUGENIA., International Water Association., 2004. Phosphorus in environmental technology: principles and applications. IWA Pub.

XU, H., PEI, H., XIAO, H., JIN, Y., HU, W., MA, C., SUN, J., LI, H., 2016. Behaviors of *Microcystis aeruginosa* cells during floc storage in drinking water treatment process. Scientific Reports. 6, 34943. https://doi.org/10.1038/srep34943

WEENINK, E.F.J., LUIMSTRA, V.M., SCHUURMANS, J.M., VAN HERK, M.J., VISSER, P.M., MATTHIJS, H.C.P., 2015. Combatting cyanobacteria with hydrogen peroxide: A laboratory study on the consequences for phytoplankton community and diversity. Frontiers in Microbiology. 6, 714. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00714

# 4 ARTIGO: EFFECTIVENESS OF "FLOC & SINK" TECHNIQUE APPLIED TO REMOVE CYANOBACTERIA FROM TROPICAL RESERVOIR WATER

(Microcosm performed in the Rainy Season)

### Abstract

Eutrophication and the associated problem of toxic cyanobacterial blooms are predicted to intensify in the near future, highlighting the importance of implementing effective management strategies. While reducing external nutrient inputs is crucial, it may not provide immediate relief to eutrophic waters. Therefore, flocculation and sedimentation techniques have been shown to be effective in accelerating the recovery process. However, the potential effects of these techniques on different toxin-producing cyanobacteria species have not been thoroughly investigated. This laboratory study aimed to evaluate the effectiveness of the "Floc and Sink" technique in removing cyanobacteria and intracellular toxins. The technique involved treating the bloom material, mainly consisting of Raphidiopsis raciborskii and Microcystis aeruginosa from a tropical freshwater reservoir, with a combination of polyaluminium chloride (PAC) and either lanthanum modified bentonite (LMB) or local red soil (LRS). Among the different treatments, PAC+LMB was found to be the most efficient, removing 7.8 times more biomass compared to PAC alone and LMB alone. PAC+LMB+LRS removed 4.5 times more biomass than the control. No saxitoxins were detected in the collected samples. The intracellular microcystin (MC) concentrations varied between 61.3 µg L-1 and 116.03 µg L-1 in the top portion of the cylinders, and between 6 µg L-1 and 1617 µg L-1 in the bottom portion, independent of the biomass. PAC+LMB proved to be the most efficient treatment not only in removing cyanobacterial biomass but also in reducing intracellular MC concentrations. Overall, our results indicate that the Floc and Sink technique shows promise in removing cyanobacteria and intracellular MC from the water column compared to using PAC alone or PAC combined with binary mixtures of ballasts (LMB and LRS).

# **INTRODUCTION**

Eutrophication, the over-enrichment of nutrients in surface waters, is a major global water quality concern (DOWNING, 2014). This phenomenon often leads to the proliferation of cyanobacteria in lakes, ponds, and reservoirs; called blooms, the proliferate cyanobacteria reach very high densities and/or accumulate at the water surface and lee-side shores in thick scums (CHORUS; WELKER, 2021a). It is worth noting that certain strains of cyanobacteria can produce potent toxins, thereby posing a threat to various ecosystem services, including drinking water supplies, irrigation, recreation, aquaculture, and fisheries (CARMICHAEL et al., 2001; PAERL; PAUL, 2012). Cyanotoxins can affect human health, causing skin irritation, gastrointestinal problems, liver damage, and even death in severe cases. They can also adversely affect aquatic animals and wildlife, leading to mass die-offs (LÜRLING; FAASSEN, 2013; ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013; VEERMAN; KUMAR; MISHRA, 2022). The human activities and the impacts of climate change are expected to exacerbate further eutrophication and the occurrence of toxic cyanobacterial blooms (JEPPESEN et al., 2009; MOSS, 2011). Given these implications, managing eutrophication and mitigating cyanobacterial blooms is paramount (SMITH; SCHINDLER, 2009; O'NEIL et al., 2012a).

The logical and first step in addressing eutrophication is to reduce the influx of external nutrients (PAERL et al., 2016; HUISMAN et al., 2018). However, it is evident that solely controlling point sources of nutrient inputs is often inadequate to reverse the process, necessitating additional measures (PAERL et al., 2016). In-lake interventions encompass a wide range of approaches, including biomanipulation involving fish and macrophytes, dredging, water column mixing, and the use of algaecides, among others (LÜRLING; MUCCI, 2020). Coagulation and precipitation of cyanobacteria and/or phosphates are considered promising techniques for managing eutrophication and addressing its associated issues (MIRANDA et al., 2017; NOYMA et al., 2017a; LÜRLING et al., 2020). These techniques are an alternative to cell lysing algaecides, as treatment with algaecides to eradicate blooms from drinking water will release intracellular toxins (JONES, 1994; JANČULA; MARSÁLEK, 2011); consequently, individuals consuming this drinking water may potentially be exposed to dissolved cyanotoxins. Alternatively, the Floc & Sink technique can rapidly clear a water column of cyanobacteria without significative release of toxins and nutrients; this method appears to be most suitable for deep, stratifying lakes that experience continuous external nutrient inputs (NOYMA et al., 2016, 2017a; LÜRLING et al.,

2020). In this intervention, different coagulants and ballast compounds can be used; however, before being applied at a specific site, the compounds must be tested in a laboratory first to yield insight on their performance and dose needed (NOYMA et al., 2016).

The experiments executed in this study tested the hypothesis that the '*Floc & Sink*' technique is efficient in removing the cyanobacterial biomass composed of mainly *Raphidiopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*, as well their toxins content from a tropical deep reservoir.

# MATERIALS AND METHODS

### Sampling

In the experiment, the water samples were collected from Funil Reservoir in the rainy season (January) and concentrated with a plankton net (50  $\mu$ m mesh) to create a cyanobacterial suspension, yielding an initial concentration of ~190  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of chlorophyll-*a*. The collected water was immediately used, with no need for storage. The cyanobacteria biomass in the sample was composed predominantly by 70% *Raphidiopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA) Seenayya et Subba Raju (Seenayya & Subba Raju) and 30% *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, At the time of sampling, the pH was 9.7 and water temperature was 25°C.

#### **Chemicals and Materials**

The coagulant PAC (poly-aluminium chloride;  $Al_n(OH)_mCl3_{n-m}$ , r ~1.37 kg L<sup>-1</sup>, 9,5% Al, 21.0% Cl) was obtained from Purewater Efluentes (São Paulo, Brazil). Local red soil (LRS) was collected from the banks of the Funil Reservoir as described by Noyma et al. (2016), and the Lanthanum modified bentonite Phoslock<sup>®</sup> (LMB) was obtained from HydroScience (Porto Alegre, Brazil). LRS and LMB were used as ballast.

### Floc & Sink assays

### Experiment 1 – Coagulant range

A range of PAC concentrations was tested (0, 1, 2, 3, and 4 mg Al L<sup>-1</sup>). This experiment has no replicates because it followed a regression design to evaluate the most appropriate and effective coagulant dosage. The assay was set up in glass tubes (10 x 200 mm) containing 60 mL of cyanobacteria suspensions with an initial concentration of ~190  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of chlorophyll-*a*. PAC was added at the surface and mixed with a metal rod for 30 seconds; the tubes were then incubated for two hours. After the incubation time, the tubes were visually inspected for flocs formation, and 5 mL aliquots were taken from the top and bottom of the tubes to determine the precipitation of cyanobacteria biomass. The chlorophyll-*a* concentration and the Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) (Genty et al., 1989) were measured using a PHYTO-PAM phytoplankton analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The pH also was measured in the tubes.

### Experiment 2 – Floc & Sink assays

Based on the first experiment, the coagulant (PAC) dose of 4 mg of Al L<sup>-1</sup> was chosen as an effective dose. This 4 mg Al L<sup>-1</sup> of PAC was also combined with LMB  $(0.2 \text{ g L}^{-1})$ , LRS  $(0.2 \text{ g L}^{-1})$ , and LMB+LRS  $(0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ of each})$ . The dosage of ballast was calculated based on phosphorus in the water column and sediment as describe in ARRUDA et al., 2021. The experiment was set up as triplicate in acrylic cylinders containing 1 L of cvanobacteria suspensions(~190  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of chlorophyll-*a*) from Funil Reservoir. We tested four treatments: 1) PAC 4mg L<sup>-1</sup>, 2) LMB, 3) PAC+LMB, 4) PAC+LMB+LRS, while the sixth series (n = 3) remained untreated (Controls). The PAC was added first, followed by the immediate addition of a slurry of LMB and/or LRS in the top of the cylinders. Subsequently, the suspensions were mixed with a glass stirring rod, and after two hours, 15 mL- samples were collected from the top and bottom of the cylinders. 10 mL of sample were filtered through 1.2 µm glass fiber filters (85/70 BF, Macherey-Nagel); the filters were used to quantify intracellular MC. Filter was immediately frozen and kept at -20°C until the analysis. 5 mL- samples were used to quantify chlorophyll-a and  $\Phi_{PSII}$  by PHYTO-PAM phytoplankton analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany).

#### **Toxins Analysis**

Before the extractions the filters were freeze-dried (Sartorius GmbH, Germany)). For the analysis of the intracellular toxins, 2.5 mL of 75% (v/v) methanol (MeOH) (Merck®) was added to the filters in an 8 mL glass tube. After vortexing the samples for 15 seconds, they were placed in a water bath (Buchi Heating Bath b-491) for 30 minutes at 60°C. The suspensions were transferred to new glass tubes. This extraction step was repeated twice, but this time with 2.0 mL of 75% (v/v) methanol. The new glass tubes containing 6.5 mL of extract were placed in the Speedvac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After drying, they were resuspended with 2 mL of MeOH 100% (v/v), vortexed for 15 seconds, filtered through 0.45  $\mu$ m PVDF membrane syringe filters (Analítica, Brazil) into amber glass vials for LC-MS/MS analysis. If needed, the samples with high MC concentrations were diluted in methanol 75% v/v before re-analysis. The lyophilized samples were resuspended with 2 mL of MeOH (100%), vortexed for 15 seconds, filtered through 0.45  $\mu$ m PVDF membrane syringe filters (Analítica, Brazil) into amber years were diluted in methanol 75% v/v before re-analysis. The lyophilized samples were resuspended with 2 mL of MeOH (100%), vortexed for 15 seconds, filtered through 0.45  $\mu$ m PVDF membrane syringe filters (Analítica, Brazil) into amber vials for the analysis of dissolved toxins. Samples were then stored in a freezer (-20°C) until LC-MSanalysis.

Toxin determination in the samples was performed by liquid chromatographytandem mass spectrometry (LC-MS) using a series 200 HPLC system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) coupled to electrospray ionization (ESI) mass spectrometer. The analysis was performed with a Luna C18 column ( $150 \times 2$  mm; 5 µm particles, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and the mobile phase was formic acid 0,1% and acetonitrile, in a gradient elution. Gradient elution was performed at a flow rate of 300 µL min<sup>-1</sup> and followed a linear increase from 10 to 90% B within 15 min, then it was held at 90% B for 2 min and returned to the initial condition (10% B) within 12 min. MS/MS experiments performed used an API 365 triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion spray source in selected mode. It was evaluated this following precursor ions m/z 519 (RR), 910 (LA), 986 (LF), 995 (LR), 1025 (LW), 1045 (YR), 512 ([D-Asp<sup>3</sup>] RR), and 981 ([D-Asp3] LR). The analysis of saxitoxins (SAXT) was performed in HPLC-FD (Shimadzu, Kyoto, Japão) with chromatograph column SeQuant ZIC<sup>®</sup>-HILIC (Phenomenex, 250x4.6mm, 5 $\mu$ m) with after column oxidation (DIENE et al. 2007). Fluorescence detection was monitored in excitation and emission wavelength 330 e 395nm, respectively.

#### **Statistical Analysis**

A one-way ANOVA analysis was performed to evaluate the differences in chlorophyll-*a* and MC concentration between treatments in the tool pack SigmaPlot 12.5. Pairwise multiple comparison procedures (Holm–Sidak) were applied to distinguish means that were significantly different (p < 0.05).

# RESULTS

### **Coagulant Range**

In the experiment testing different doses of PAC, the cyanobacteria suspension presented no negative buoyancy, and after the incubation (2 hours), the majority of biomass was in the bottom of the tube, as shown in the treated tubes (Fig. 1). The concentration of chlorophyll-*a* in the bottom 5 mL of the tubes containing PAC varied from 6 to 33 times more than in the bottom 5 mL of the control tube (Fig. 1b). 4 mg L<sup>-1</sup> was the best dosage, reaching the high biomass concentration in the bottom of the tube. The pH decreased gradually with the increasing dose of PAC concentrations, from 1 mg L<sup>-1</sup> and remained stable (Fig. 1). Also, the  $\Phi_{PSII}$  reduced slightly and progressively in the top and bottom 5 mL in the PAC range tubes from 1 mg L<sup>-1</sup>.

Fig. 1 - Coagulant Range results



Subtitle: Chlorophyll-*a* concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) in the top 5 mL (top light gray bars) and bottom 5 mL (lower dark gray bars), Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) (circles) and pH values (triangles) of 60 mL cyanobacteria suspensions incubated for 2 hours in the presence of different concentrations (1, 2, 3, and 4 mg Al L<sup>-1</sup>) of the coagulant PAC (poly-aluminum chloride). The control is represented by 0 mg Al L<sup>-1</sup>.

#### Floc & Sink assays

The cyanobacterial suspension in this experiment presented positive buoyancy, as indicated in the controls (Fig. 2). The chlorophyll concentration in the top of the cylinders varied from 270 µg L<sup>-1</sup> to 1520 µg L<sup>-1</sup> (Fig. 2). The addition of only PAC (4 mg L<sup>-1</sup>) increased 2.9 times the concentration of cyanobacterial biomass in the top of the cylinders compared to the control (Fig. 2). The application of PAC associated with LMB alone or in binary mixture with LRS, precipitated the biomass to the bottom of the cylinders (Fig. 2B). One-way ANOVA indicated differences in chlorophyll-*a* concentrations among treatments for both the top (F<sub>4,10</sub> = 15.53; p < 0.001) and the bottom (F4<sub>10</sub> = 22.10; p < 0.001) of the cylinders. In the top of cylinders, PAC was

different from the other treatments; the control, LMB, PAC+LMB, and PAC+LMB+LRS were similar to each other, regarding chlorophyll. In the bottom, PAC+LMB treatment accumulated 7.8 times more biomass than control, while PAC+LMB+LRS accumulated 4.5 times (Fig. 2B); these treatments were different from each other. There were no differences in chlorophyll concentration in the bottom among control, PAC and LMB.

The  $\Phi$ PSII values did not show differences among control and LMB treatments in the top and bottom of the cylinders. However, a significant reduction was recorded in treatments containing PAC in the top and bottom of the cylinders (F<sub>4,10</sub> = 150.86, F<sub>4,10</sub> = 302.45; p < 0.001 (Fig. 2A and B). Reductions also were recorded in the pH in all treatments containing PAC (F<sub>4,10</sub> = 88.23; p < 0.001) (Fig. 2).

Figure 2 - Floc & Sink assays results



Subtitle: Chlorophyll-*a* concentrations ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) in the top 15 mL (A - top light gray bars) and bottom 15 mL (B - lower dark gray bars), Photosystem II efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) in the top (A - open circles) and bottom (B - filled circles) and pH values (A - triangles) of 1 L cyanobacteria suspensions from

Funil Reservoir incubated for 2 h in the absence (control) or presence of the coagulant (poly-aluminum chloride, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) and coagulant (4 mg Al L<sup>-1</sup>) combined with ballast (lanthanum modified bentonite, LMB 0.2 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.2 mg L<sup>-1</sup>) separately or in binary mixtures (lanthanum modified bentonite, LMB 0.1 mg L<sup>-1</sup>, and local red soil, LRS 0.1 mg L<sup>-1</sup>). Error bars represent one standard deviation (n = 3), and similar letters indicate homogeneous groups according to the Holm-Sidak *post-hoc* test (p < 0.05).

#### Effects on the microcystins and saxitoxin concentrations

The total intracellular MC concentration did not follow the biomass distribution in the top of the cylinders; although, in the bottom, the pattern of distribution was similar between MC and cyanobacteria chlorophyll. The MC concentration in the top of the cylinders varied from 61.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 116.03  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in the treatments (Fig. 3A), and in the bottom from 6  $\mu$ g L<sup>-1</sup> to 1617  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 3B). The intracellular MC concentration in the top of the control and all treatments was similar (F<sub>4,10</sub> = 3.76; p > 0.05). However, in the bottom of cylinders, we observed differences in intracellular MC concentrations (F<sub>4,10</sub> = 150.41; p < 0.001); the PAC+LMB treatment had the highest MC concentration and was 38.5 times higher than the control and 182 higher than PAC alone treatment (Fig. 3B). No difference was recorded in the bottom of the cylinders among control and treatments other than PAC+LMB (Fig. 3B).

Three MC variants were detected in the cyanobacteria biomass used in the experiment: YR, LR, and RR. The abundance of MC variants was similar in the biomass in all treatments after incubation time, MC-RR represented 62% of total MC, while -LR represented 35% and -YR 2%.

Although *R. raciborskii* filaments were dominant in the water used in the experiment, SAXT were not detected in any sample.

Fig. 3 - Effects on the microcystins concentrations



Subtitle: Intracellular concentrations ( $\mu g L^{-1}$ ) of microcystins and their variants in the tube's top (A) and bottom (B) in 1 L of cyanobacteria suspensions from Funil Reservoir incubated for 2 h in the absence (control) or presence of the coagulant (poly-aluminum chloride, PAC 4 mg Al  $L^{-1}$ ) and coagulant combined with ballast (lanthanum modified bentonite, LMB  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ , and local red soil, LRS  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) separately or in binary mixtures (lanthanum modified bentonite, LMB 0.1 mg  $L^{-1}$ , and local red soil, LRS 0.1 mg L<sup>-1</sup>). The black squares and diamonds represent the total of intracellular MC in the treatments. Similar letters indicate homogeneous groups in the total MC according to the Holm-Sidak post*hoc* test (p < 0.05).

# DISCUSSION

Our study has tested the hypothesis that the '*Floc & Sink*' technique could efficiently remove the cyanobacterial biomass composed of filamentous *R. raciborskii* and the colonial *Microcystis* spp. We also investigated the efficacy of combining two different ballast and intra MC removal. Our results showed that a mixture of low-dose coagulants and ballast could efficiently remove biomass predominantly of *R. raciborskii* and *M. aeruginosa*. However, the efficiency was dependent on the ballast used, once the most effective treatment had LMB or a mixture of LMB and LRS. PAC+LMB could sink more biomass to the bottom of the cylinders than other tested treatments. Unexpectedly, the combination of PAC and two different ballasts (LMB and LRS) presented a reduced efficacy in removing the cyanobacteria; the chlorophyll concentration after incubation time was 40% down than the treatment with one ballast (LMB). In addition, we did not observe a similar distribution pattern in MC contentment evaluation between intracellular MC and cyanobacteria chlorophyll in the treatment with LMB+LRS as a ballast, suggesting the affinity of this combination with non-MC-producers biomass.

### Effect of coagulants on cyanobacteria

In general, PAC is a safer option than other aluminum-based salt coagulants for removing cyanobacterial biomass, as it requires a lower dose to achieve effective results; as a result, the pH is not lowered as much, which prevents the cells from lysis and releasing their content during the settling process (GEBBIE, 2001; DE JULIO et al., 2010). In our study, PAC was an excellent coagulant to Floc the biomass, dominated by *Raphidiopsis* and *Microcystis*, in the water sample. After PAC dose application, the flocculated biomass sank to the bottom of tubes proportional to the applied dose. Similarly, we recorded a gradual decline in pH during the experiment, starting from 9.7 in control and 9.0 in the dose of 1 mg Al L<sup>-1</sup> to 6.0 in the highest PAC dose of 4 mg L<sup>-1</sup>; values considered safe to the cyanobacteria's physiological status (COOKE et al., 2016). The  $\Phi_{PSII}$  was not affected up to 1 mg of AL L<sup>-1</sup> and decreased slightly from this concentration onwards and remained around ~ 0.31 in the highest tested concentration. The observed  $\Phi_{PSII}$  and pH drop are considered a side effect of metal-based coagulants;

the  $\Phi_{PSII}$  specifically, indicates to damage the cells and it is a proxy to the potential release of toxins (JANČULA; MARSÁLEK, 2011; MEREL et al., 2013). However, based on previous studies, at the highest dose of PAC tested here (4 mg L<sup>-1</sup>), *Raphidiopsis* and *Microcystis* cells had a remote chance of being damaged (SUN et al., 2013; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019). It is important to mention that release of MC occurred at similar dosages of PAC in laboratorial tests when the cyanobacterial population was dominating by *Dolichospermum* spp. (ARRUDA et al., 2021).

### Floc & Sink of cyanobacteria

As an alternative to cell-lysing algaecides, interventions that involve coagulation and flocculation, aiming the removal of cyanobacterial biomass, has been proven to be efficient; Floc & Sink technique is an ideal intervention for deep, stratifying lakes with external nutrient loading greater than the internal, as it can quickly clear the water column of cyanobacteria without releasing toxins or nutrients (LÜRLING et al., 2020). This method works by removing the cyanobacteria from the epilimnion and bringing them to a darker hypolimnion where they can settle into the sediment. In the Floc & Sink technique different coagulants (e.g. synthetic organic coagulants like cationic polyacrylamides, aluminium sulphate, poly-aluminium chloride, iron(III)chloride, and organic polymers like chitosan) (JANČULA; MARSÁLEK, 2011; LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; NOYMA et al., 2016, 2017a; LUCENA-SILVA et al., 2019) and ballast compounds (e.g. local soils, clay, bauxite, gravel, and or modified clays) (LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; LI; PAN, 2015; NOYMA et al., 2016, 2017a; WAAJEN et al., 2016; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019) can be used. The choice of coagulant and ballast compounds will be based on safety, costs, availability, and efficacy (LÜRLING et al., 2020). Based on this, we tested a combination of PAC, as a flocculant and two different ballasts, LMB and LRS, a modified clay and local clay, respectively. The LRS was applied in a mixture with LMB aiming to reduce the cost of treatment once LMB is a commercial material (VALSAMI-JONES, 2004), which makes their use as ballast far more expensive than LRS, a material easily found in banks of natural aquatic systems in the southeast of Brazil (NOYMA et al., 2016). The use of LRS in the proposed treatment was consistent with
P capacity when compared to LMB (NOYMA et al., 2016). In our study, Floc & Sink experiment showed that R. raciborskii and M. aeruginosa could be precipitated using a combination of a low dose of PAC (4 mg Al L <sup>1</sup>) and LMB (0.2 g  $L^{-1}$ ) or in binary mixture of LMB and LRS (0.1 g  $L^{-1}$  of each one). However, the treatment with a binary mixture of LMB and LRS as a ballast shows down biomass removal efficiency. It was unexpected once LRS presented similar efficacy to LMB in the removal of cyanobacteria biomass in previews studies performed in tropical systems (NOYMA et al., 2016; DE MAGALHÃES et al., 2017a; MIRANDA et al., 2017). In the tested technique, the ballast is introduced first, immediately followed by the coagulants, so ballast particles will be trapped inside the formed Flocs conducting them to the bottom of the cylinders. However, the cyanobacteria buoyancy regulation, an important trait of this group, either at the cellular level or colony level, can affect the efficacy of *Floc & Sink* treatment (THONGDAM et al., 2021). In general, adding a ballast facilitated the removal of the positively buoyant cyanobacteria (MIRANDA et al., 2017). Noyma et al., (2016) affirmed the amount of ballast needed depends not only on the cyanobacteria concentration but also their buoyancy, and accurate dose estimates are required prior to each application. Our study observed differences in cyanobacteria buoyancy behavior between the PAC range and Floc & Sink experiments. In the first test, the cyanobacteria presented a negative buoyancy after incubation: in the PAC 4 mg Al<sup>-1</sup> dosage, we recorded 33 times more chlorophyll than the control in the bottom of the cylinder. In the Floc & Sink essay, about five hours after the first experiment started, we could not observe the same buoyancy behavior of biomass; in the bottom of the cylinder in PAC treatment, the

chlorophyll concentration was similar to the control, and the top biomass was ~ 8.5 more than to the bottom. An underestimated dosage could affect the biomass removal (NOYMA et al., 2017a); however, this was not the case here, as the LMB dosage was the same as the binary mixture of LMB and LRS and could still accomplish cyanobacteria removal. In previous studies with different ballast applied separately, the used dosage of both ballasts was similar and associated with PAC could settle biomass composed of colonial species *Microcystis* spp. and *Sphaerocavum brasiliense*), and filamentous *R. raciborskii, Planktothrix. Agardhii* (LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; NOYMA et al., 2016; DE MAGALHÃES et al., 2017a; MIRANDA et al., 2017). In general, the combined use of a coagulating metal salt and colloidal local soil solution

has been shown to increase the electrostatic interaction, bridging, and enmeshment, which enhances the effective collision between algal cells and clay particles and induces sedimentation (THONGDAM et al., 2021). In the literature, the binary mixture of ballast, LMB and LRS associated with PAC, could settle 38% more biomass than the treatment with just a single ballast (PAC + LMB or LRS), when the dominant specie was Dolichospermum circinalis (ARRUDA et al., 2021). The authors attribute the increased treatment efficiency to the action of the different chemical compounds with different mechanisms; the presence of inorganic particles with different granulometry increased the action of the physical mechanism in the biomass Flocs, which led to improved sweep flocculation. It is noteworthy that the LRS is composed of coarse sand (2–0.0 mm), fine sand (0.20–0.05 mm), silt (0.05–0.002 mm), and clay (<0.002 mm) (NOYMA et al., 2016), while LMB size of granules is  $2-4 \text{ mm} \times 1-3 \text{ mm}$  (PWS, 2006). Thus, in our finds, we can attribute the reduced effects of ternary mixture PAC+LMB+LRS to, firstly, the strong positive buoyancy of R. raciborskii trichomes in this experiment; secondly, the small particle size of LRS, which did not have enough weight to induce the sedimentation of cyanobacteria flocs.

#### Microcystins removal from water column

In the MC content evaluation, we observed a different distribution pattern between MC and cyanobacteria chlorophyll in the cylinders after treatment application. It was expected once the ballast compounds used in the technique work differently on different cyanobacteria genera and consequently on MC producers and non-producers (LAMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019). Thus, we recognized PAC+LMB as the most efficient treatment to remove not only cyanobacteria biomass but also intracellular MC throughout the water column; the other treatments presented similar MC content in the top and bottom cylinders.

The main advantage of the *Floc & Sink* technique is the possible coagulation and sinking of cyanobacteria without cell lysis and a later degradation of cells and their toxins in the sediment (NOYMA et al., 2017a; LÜRLING et al., 2020). But the cyanobacteria cell, specifically the MC producer, must sink for MC degradation in the sediment. Thus, an assessment of the intracellular MC content is indispensable to ensure that the toxin-containing cells have sunk, once the effectiveness of the MC producers can be compound dependent used in the treatment (LUCENA-SILVA et al., 2019; ARRUDA et al., 2021). Note that, in our Floc & Sink experiment, PAC accumulated the greatest biomass in the top of cylinders (Fig. 2). Still, the intracellular MC content for this treatment was similar to the other with low biomass concentration in the top (Fig. 3). Likewise, PAC+LMB+LRS, even accumulating more biomass than the control, PAC and LMB, presented MC concentrations similar to them; apparently, the toxic cells were not trapped in the biomass flocs and sunk by this treatment, not in the same way as the single ballast treatment worked. In another survey, with a similar methodology, the intracellular MC concentration accessed from flocculated biomass varied among the treatments (LUCENA-SILVA et al., 2019); however, there was no significant fluctuation of extracellular MC concentration. Therefore, based on our results and previous studies, we can assume that different treatments may affect MC producers and non-producers differently. The risk behind this is not just a recolonization but an anthropogenic selective process of potential MC producer strains or species heading the water recolonization. Recolonization by cyanobacteria that were coagulated but remained alive and were resuspended by wave or bioturbation actions is already a concern linked to the Floc & Sink technique (NOYMA et al., 2016; MUCCI et al., 2017).

Although we did not monitor the dissolved MC here, we have evaluated other parameters that can be used as a proxy for cell lysis. The  $\Phi_{PSII}$  is usually used as an indicative of physiological stress in algae (WULFF; MOHLIN; SUNDBÄCK, 2007; WHITE; ANANDRAJ; BUX, 2011) and has been used as a proxy of cell lysis alone or associated with other parameters (e.g., dissolved chlorophyll, dissolved MC, Sytox® Green) (LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; NOYMA et al., 2016; DE MAGALHÃES et al., 2017a, 2017a; MIRANDA et al., 2017; MUCCI et al., 2017). It is well known that the decrease in pH, as a result of the action of high PAC dosages, can promote immediate cell lysis (HAN; JEON; PARK, 2012; NOYMA et al., 2016), especially and not only, in dosages > 8 mg Al L<sup>-1</sup> (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017). In our experiments, PAC dosage (8 mg Al L<sup>-1</sup>), alone or combined with ballast, decreased the pH (> 7) and  $\Phi_{PSII}$  (> 0.3) slightly. So, there was no evidence of cell damage in our experiments. However, concomitant intra and extracellular cyanotoxin concentration measurements during a flocculation and sedimentation intervention are strongly recommended.

#### CONCLUSION

A low dose of coagulants and ballast, particularly PAC+LMB, efficiently removed biomass composed predominantly of *R. raciborskii* and *M. aeruginosa*. The PAC+LMB treatment was also the most effective in removing intracellular MC. PAC was not capable to settle the cyanobacteria biomass alone. The combination of PAC and two different ballasts (LMB and LRS) showed a lower capacity to remove cyanobacteria and MC than the treatment with LMB alone. Thus, biomass removal was not linear to intracellular MC removal, suggesting that MC removal is compound/treatment dependent, which can indirectly select for toxin-producing strains.

### REFERENCES

ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

CARMICHAEL, W. W. et al. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 7, p. 663–668, jul. 2001.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water. [s.l: s.n.]

COOKE, G. D. et al. *Restoration and Management of Lakes and Reservoirs*. [s.l: s.n.]

DE JULIO, M. et al. A methodology for optimising the removal of cyanobacteria cells from a brazilian eutrophic water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27, n. 1, 2010.

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*, v. 40, n. 1, 2017.

DOWNING, J. A. Limnology and oceanography: Two estranged twins reuniting by global change. *Inland Waters*, v. 4, n. 2, 2014.

GEBBIE, P. Using Polyaluminium Coagulants in Water Treatment. 64th Annual Water industry Engineers and Operators' Conference, v. 5, n. 39, 2001.

HAN, J.; JEON, B. S.; PARK, H. D. Cyanobacteria cell damage and cyanotoxin release in response to alum treatment. *Water Science and Technology: Water Supply*, v. 12, n. 5, 2012.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, 2018.

JANČULA, D.; MARSÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, v. 85 9, p. 1415–22, 2011.

JEPPESEN, E. et al. Climate Change Effects on Runoff, Catchment Phosphorus Loading and Lake Ecological State, and Potential Adaptations. *Journal of Environmental Quality*, v. 38, n. 5, p. 1930–1941, set. 2009.

JONES, G. Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a Microcystis Aeruginosa Bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Water Research*, v. 28, n. 4, p. 871–876, abr. 1994.

LAMA, S. et al. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, v. 220, 2016.

LI, H.; PAN, G. Simultaneous Removal of Harmful Algal Blooms and Microcystins Using Microorganism- and Chitosan-Modified Local Soil. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 10, p. 6249–6256, 19 maio 2015.

LUCENA-SILVA, D. de et al. Removal Efficiency of Phosphorus, Cyanobacteria and Cyanotoxins by the "Floc & Sink" Mitigation Technique in Semi-Arid Eutrophic Waters. *Water Research*, v. 159, p. 262–273, ago. 2019.

LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, v. 158, 2020.

LÜRLING, M.; FAASSEN, E. J. Dog poisonings associated with a Microcystis aeruginosa bloom in the Netherlands. *Toxins*, v. 5, n. 3, 2013.

LÜRLING, M.; MUCCI, M. Mitigating Eutrophication Nuisance: In-Lake Measures Are Becoming Inevitable in Eutrophic Waters in the Netherlands. *Hydrobiologia*, v. 847, n. 21, p. 4447–4467, dez. 2020.

LÜRLING, M.; OOSTERHOUT, F. V. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research*, v. 47, n. 17, 2013.

MEREL, S. et al. State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. *Environment International*, v. 59, p. 303–327, set. 2013.

MIRANDA, M. et al. The Efficiency of Combined Coagulant and Ballast to Remove Harmful Cyanobacterial Blooms in a Tropical Shallow System. *Harmful Algae*, v. 65, p. 27–39, maio 2017.

MOSS, B. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters*, v. 1, n. 2, p. 101–105, 1 jul. 2011.

MUCCI, M. et al. Chitosan as Coagulant on Cyanobacteria in Lake Restoration Management May Cause Rapid Cell Lysis. *Water Research*, v. 118, p. 121–130, jul. 2017.

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*, v. 97, p. 26–38, jun. 2016.

NOYMA, N. P. et al. Coagulant plus ballast technique provides a rapid mitigation of cyanobacterial nuisance. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.

O'NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, v. 14, 2012.

PAERL, H. W. et al. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, v. 54, 2016.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, 2012.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 2009.

SUN, F. et al. The Cell Damage of Microcystis Aeruginosa in PACl Coagulation and Floc Storage Processes. *Separation and Purification Technology*, v. 115, p. 123–128, ago. 2013.

THONGDAM, S. et al. Low Dose Coagulant and Local Soil Ballast Effectively Remove Cyanobacteria (Microcystis) from Tropical Lake Water without Cell Damage. *Water*, v. 13, n. 2, p. 111, 6 jan. 2021.

VALSAMI-JONES, E. (ed.). *Phosphorus in environmental technologies: principles and applications*. London: IWA Publ, 2004.

VEERMAN, J.; KUMAR, A.; MISHRA, D. R. Exceptional Landscape-Wide Cyanobacteria Bloom in Okavango Delta, Botswana in 2020 Coincided with a Mass Elephant Die-off Event. *Harmful Algae*, v. 111, p. 102145, jan. 2022.

WAAJEN, G. et al. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v. 97, 2016.

WHITE, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. PAM Fluorometry as a Tool to Assess Microalgal Nutrient Stress and Monitor Cellular Neutral Lipids. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1675–1682, jan. 2011.

WULFF, A.; MOHLIN, M.; SUNDBÄCK, K. Intraspecific Variation in the Response of the Cyanobacterium Nodularia Spumigena to Moderate UV-B Radiation. *Harmful Algae*, v. 6, n. 3, p. 388–399, abr. 2007.

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E. Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins*, v. 5, n. 10, p. 1896–1917, 23 out. 2013.

# 5 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA *"FLOC & SINK"* NA REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS EFEITOS SOB A CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINAS E SUA VARIANTES: UM ESTUDO EM MESOCOSMOS, RESERVATÓRIO DO FUNIL

#### Abstract

Resultado eutrofização, frequentes florações cianobactérias da intensa de potencialmente tóxicas afetam a qualidade de água em sistemas aquáticos continentais e costeiros. Neste estudo, avaliamos experimentalmente em mesocosmos durante 27 dias, a eficácia de um floculante (cloreto de polialumínio, PAC) associado a lastros, bentonita modificada com lantânio Phoslock® (LMB) sozinho ou combinado com solo vermelho local (LRS), técnica Floc & Lock, para sedimentar as populações de cianobactérias de um reservatório tropical profundo. Também avaliamos a remoção de microcistinas (MCs) intracelulares e suas variantes. Nossos resultados mostraram que ambas as combinações testadas (PAC+LMB e PAC+LMB+LRS) removeram efetivamente as populações de Raphidiopsis. raciborskii e Dolichospermum spp. e Microcystis spp. da coluna de água do reservatório. Embora não tenhamos observado diferenças significativas na biomassa total final e MCs intracelulares entre os dois tratamentos testados, o tratamento com a combinação de dois diferentes lastros (PAC+LMB+LRS) foi o único capaz de remover 100% das populações de Dolichospermum spp. e 100% de MCs. As populações de *Microcystis* foram reduzidas em média em 98% após 27 dias da aplicação independente do tratamento usado. Nossos resultados ainda sugerem que a extinção das populações de espécies filamentosas (R. raciborskii e Dolichospermum spp.) não se deu exclusivamente pelo processo imediato de floculação e sedimentação, mas possivelmente pela redução de P à valores considerados limitantes ao crescimento (< 0,5 µg). Assim, *Floc & Lock* se apresenta como uma ferramenta eficiente na remoção de biomassa de cianobactéria e MCs. Nossos resultados fornecem insights valiosos para estratégias de manejo eficazes em sistemas aquáticos impactados pela eutrofização e florações de cianobactérias.

# INTRODUÇÃO

A eutrofização em sistemas aquáticos é um dos problemas mais preocupantes relacionados à qualidade da água no mundo (SMITH; SCHINDLER, 2009; DOWNING, 2014). A intensificação do processo de eutrofização artificial tem conduzido à mudanças drásticas em ecossistemas de água doce e costeiros, como a perda de biodiversidade, diminuição da transparência da água, acúmulo de matéria orgânica e um grande estoque reciclável de fósforo (P) no sedimento (MOSS, 2011). Como consequência, a proliferação de cianobactéria, processo denominado floração, vem sendo considerado o sintoma mais manifesto da eutrofização (PAERL; HALL; CALANDRINO, 2011). Florações de cianobactérias ocasionam a produção de odores desagradáveis, mortandade de peixes devido à hipóxia/anoxia e pode prejudicar serviços ecossistêmicos, tais como produção de água potável, irrigação, recreação, aquicultura e pesca (PAERL; PAUL, 2012). Há um número crescente de alertas sobre florações tóxicas de cianobactérias observadas em todo o mundo e acredita-se que o aquecimento global estimule o seu desenvolvimento, especialmente em águas eutróficas (VISSER et al., 2016). Estas florações são frequentemente acompanhadas pela produção de uma variedade de cianotoxinas; entre essas cianotoxinas, as microcistinas (MCs), hepatotoxinas promotoras de tumores, são mais comumente encontradas em florações e consideradas um dos grupos mais perigosos em todo o mundo (SIVONEN; JONES, 1999; SVIRČEV et al., 2017). Portanto, mitigar a eutrofização e controlar as florações de cianobactérias é de grande importância para as autoridades e os gestores de recursos hídricos.

Intervenções objetivando mitigar a eutrofização e controlar as florações de cianobactérias abrangem uma grande variedade de abordagens, tais como biomanipulação em peixes e macrófitas, reconstrução do reservatório/lago, dragagem, mistura da coluna de água, utilização de algicidas (LÜRLING et al., 2020). Tais intervenções podem ser direcionadas para os sintomas (ex., lavagem, mistura, direcionamento de biomassa) e/ou preventivas, direcionadas para a fonte, que em geral se resume reduzir a carga externa e interna de nutrientes (LÜRLING; MUCCI, 2020). A técnica *Floc & Lock*, é um exemplo de intervenção orientada para os sintomas e causa; objetivando remover diretamente as cianobactérias da coluna d'água e bloquear o P

contido no sedimento. Nesta técnica o uso de coagulantes minerais/metálicos, naturais, orgânicos e sintéticos auxiliam na agregação, flutuação e desidratação (LEE; ROBINSON; CHONG, 2014), que em combinação com um lastro, objetiva afundar os agregados celulares até o sedimento, onde sofrerá degradação natural (PAN; CHEN; ANDERSON, 2011; LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; WAAJEN et al., 2016). Em geral, a combinação de um coagulante e um adsorvente de P pode, não apenas remover a biomassa de cianobactérias, mas adsorver o P da coluna d'água (WAAJEN et al., 2016). Técnicas de floculação e sedimentação se mostras promissoras na mitigação de florações tóxicas, especialmente baixa probabilidade de lise celular dos organismos alvos (MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019); o rompimento da membrana de cianobactérias pode liberar nutrientes (COLOMA et al., 2017) possibilitando recorrência no processo de floração, ou liberação de toxinas intracelulares, contaminando a água (JONES, 1994; JANČULA; MARSÁLEK, 2011). Dessa forma, o controle da proliferação de cianobactérias deve objetivar tanto a remoção eficiente da biomassa de cianobactérias, quanto de suas toxinas intracelulares, ou seja, sem lise celular (GREENFIELD et al., 2014). Entretanto, em alguns casos, o tipo floculante usado na técnica pode comprometer a integridade da membrana levando a liberação do conteúdo celular na água (P e cianotoxinas), seja por maior sensibilidade de determinadas espécies de cianobactérias ou ainda devido a dosagem utilizada (HAN; JEON; PARK, 2012; MUCCI et al., 2017; ARRUDA et al., 2021). Em contrapartida, alguns compostos usados como lastro, podem adsorver cianotoxinas dissolvidas na água durante o processo de floculação e sedimentação (DAIL et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020; ARRUDA et al., 2021). Ainda, a efetividade da técnica Floc & Sink está associada tanto a fatores intrínsecos do ambiente (ex., matéria orgânica extracelular, características físico-químicas da água, profundidade da coluna d'água), quanto à fatores relacionados a população de cianobactérias (ex., morfofisiologia da espécie alvo, cepas/população) (HER et al., 2004; TAKAARA et al., 2004, 2007; GHERNAOUT; GHERNAOUT; SAIBA, 2010; ZHANG; REN; WANG, 2013; MIRANDA et al., 2017; LÜRLING et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020).

Resultados promissores na remoção de biomassa em experimentos com populações naturais de *Microcystis* e *Dolichospermum* de um reservatório de água doce (NOYMA et al., 2016; ARRUDA et al., 2021), *R. raciborskii* e *Microcystis* em um lago raso urbano (MIRANDA et al., 2017), e em uma lagoa salobra (DE MAGALHÃES et

al., 2017) de ambientes tropicais, foram alcançados; sem liberação de toxinas (MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019) e também removendo MC dissolvidas na água (ARRUDA et al., 2021). Entretanto, todos esses estudos foram realizados em escala laboratorial e em curta duração (1/2h). Dessa forma, este estudo se propôs a avaliar em meso-escala e a longo prazo a efetividade da técnica *Floc & Sink* sob a população de cianobactérias e MC intracelulares de um reservatório profundo tropical.

## METODOLOGIA

# Área de Estudo

O reservatório do Funil (4000 ha) é um sistema descrito como eutrófico localizado no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (22°30'S, 44°45'W; Fig. 1), a 440 m de altitude, em uma área de clima tropical quente e chuvoso (Cwa no sistema Köppen). O reservatório tem profundidade média de 22 m, mas pode chegar a 70 m de profundidade máxima na estação chuvosa. O reservatório foi criado pelo represamento do rio Paraíba do Sul, e recebe altas cargas de poluentes, principalmente esgoto sem tratamento, da bacia hidrográfica. Três espécies de cianobactérias formam florações recorrentes no reservatório, representando até 99% da biomassa anual total: *Dolichospermum circinalis* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek, *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, e o colonial *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (SOARES et al., 2008, 2009; GUEDES et al., 2014).

### Produtos Químicos e Materiais

O coagulante PAC (policloreto de alumínio;  $Al_n(OH)_mCl3_{n-m}$ , r ~1,37 kg L<sup>0</sup>, 9,5% Al, 21,0% Cl) foi obtido da Purewater Efluentes (São Paulo, Brasil). Solo

vermelho local (LRS) foi coletado nas margens do Reservatório do Funil conforme descrito por Noyma et al. (2016), e a bentonita modificada com lantânio Phoslock<sup>®</sup> (LMB) foi obtida da HydroScience (Porto Alegre, Brasil). LRS e LMB foram usados como lastro.

## Experimento Floc & Lock

O experimento foi realizado na estação sazonal quente e chuvosa (Jan/Fev, 2019), com a instalação de 12 mesocosmos cilíndricos em plástico transparente de 0,3 µm de espessura. Cada unidade experimental (mesocosmos) apresentava 90 cm de diâmetro por em média 12 m de profundidade, com volume aproximado de 9.144 litros. Anéis de arame (14mm) revestidos com PVC foram fixados na parte externa de cada unidade amostral, distribuídos a cada 1,5 m para evitar que o plástico colabasse. As unidades amostrais eram abertas na parte superior e inferior, sendo fixado ao sedimento através de um aro dentado alumínio, permitindo que ocorresse comunicação entre o sedimento e a coluna d'água. Os mesocosmos foram separados em dois flutuadores distintos, dispostos a aproximadamente 5 m de distância um do outro, contendo seis mesocosmos em cada píer (Figura 1). A ordem de tratamentos para cada uma das unidades amostrais foi determinada randomicamente.

Fig. 1. Representação esquemática da estrutura e alocação dos mesocosmos no Reservatório do Funil.



Legenda: (A) Representação esquemática da organização do Píer flutuante; (B) representação da unidade amostral, mesocosmos; (C, D) imagens do píer flutuante; (E) imagem da estrutura das unidades amostrais. Fonte: próprio autor.

Com base no experimento de microcosmos para o período chuvoso (experimento descrito no capítulo 4), a dose de coagulante (PAC) de 4 mg de Al L<sup>-1</sup> foi escolhida como dose efetiva. Este 4 mg Al L<sup>-1</sup> de PAC também foi combinado com LMB (0,2 g L<sup>-1</sup>), LRS (0,2 g L<sup>-1</sup>) e LMB+LRS (0,1 g L<sup>-1</sup> de cada). A dosagem de lastro levou em consideração a fração biodisponível de P para o sistema, obtida pela soma da quantidade de fósforo presente nos primeiros 10 cm de sedimento (camada de troca entre o sedimento e a coluna d'água) e a fração encontrada na coluna d'água (NOYMA et al., 2016). O experimento foi montado em quadruplicatas. Testamos 2 tratamentos: 1) PAC + LMB, 2) PAC+LMB+LRS, enquanto a terceira série (n = 4) permaneceu sem tratamento (Controle). O PAC foi adicionado primeiro, seguido pela adição imediata de uma pasta composta de LMB e/ou LRS e água da própria unidade amostral. Posteriormente, as suspensões foram misturadas com auxílio do disco de Secchi. Uma amostragem ocorreu em todas as unidades amostrais antes da aplicação dos tratamentos,

correspondendo ao tempo zero (T0). O experimento teve duração de 28 dias e teve o total de 6 amostragens ao longo desse período (T1, 24 horas; T3, 3 dias; T7, 7 dias; T14, 14 dias; T21, 21 dias e T27, 27 dias após o tratamento). Amostragens também foram realizadas no lago do Reservatório, ao lado dos flutuadores, 2 amostras para cada píer.

### Amostragem

Em cada um dos tempos de amostragem mencionados acima, foram coletadas amostras do topo e do fundo dos mesocosmos, neste último caso com auxílio de garrafa de Van Dorn. Para análise de MC, aproximadamente 500 mL de amostra, coletadas na  $Z_{eu}$ , foram filtrados através de filtros de fibra de vidro de 1,2 µm (85/70 BF, Macherey-Nagel) para quantificar MCs. Os filtros foram usados para quantificar a MC intracelular. As amostras de filtro foram imediatamente congeladas e mantidas a -20°C até a extração e posterior análise em LC-MS. Amostras de 5 mL foram usadas para quantificar clorofila-*a* pelo analisador de fitoplâncton PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Outros 30 mL de amostras foram fixados em lugol e usadas posteriormente para quantificação do fitoplâncton. A contagem da comunidade fitoplanctônica foi realizada pela equipe do Laboratório de Ficologia do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Extração de microcistinas

Antes das extrações, os filtros foram liofilizados (Sartorius GmbH, Alemanha). Para a análise das toxinas intracelulares, 2,5 mL de 75% (v/v) de metanol (MeOH) (Merck<sup>®</sup>) foram adicionados aos filtros em um tubo de vidro de 8 mL. Após agitação no vórtex por 15 segundos, elas foram colocadas em banho-maria (Buchi Heating Bath b-491) por 30 minutos a 60 °C. As suspensões foram transferidas para novos tubos de vidro. Esta etapa de extração foi repetida duas vezes, mas desta vez com 2,0 mL de metanol 75% (v/v). Os novos tubos de vidro contendo 6,5 mL de extrato foram colocados no concentrador de amostras (Tecncal, TE-019). Após a secagem, foram ressuspensos com 2 mL de MeOH 100% (v/v), agitados em vórtex por 15 segundos, filtrados em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45  $\mu$ m (Analítica, Brasil) em armazenado em frascos de vidro para análise por LC-MS. Se necessário, as amostras com altas concentrações de MC foram diluídas em metanol 75% v/v antes da reanálise, ou em casos de concentração baixa, foram concentradas e ressuspensas em menos volume. As amostras foram então novamente armazenadas em um freezer (-20 °C) até a análise LC-MS.

A determinação da toxina nas amostras foi realizada por cromatografia líquidaespectrometria de massa (LC-MS) usando um sistema de HPLC série 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de ionização por eletrospray (ESI). A análise foi realizada com coluna Altus UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, partícula de 1,7  $\mu$ m) e a fase móvel foi acetonitrila e água MilliQ acidificada com ácido fórmico a 0,1% e pH 3,2 (B), em eluição gradiente. A eluição gradiente foi realizada a uma taxa de fluxo de 300  $\mu$ L min<sup>-1</sup> e seguiu um aumento linear, iniciando em 30 a 70% (A:B), em 1 minuto foi mantida a 65% (B), em 8 minutos 15% (B,) e em 10 min voltou à condição inicial (70% B) em 12 min. No detector de massas a voltagem utilizada foi positiva com a voltagem do capilar 3,5 KV, com detecção usando tune, a temperatura da fonte de 150 °C, gás de arraste nitrogênio aquecido a 450 °C, e fluxo de 900 L/h na câmara e 40 L/h no cone. Foram avaliados os seguintes íons precursores m/z íons 520 (MC-RR), 981 ([D-Asp<sup>3</sup>]-LR), 995 (MC-LR), 1002 (MC-LY) e 1045(MC-YR).

## Análise Estatística

As análises estatísticas descritivas, ANOVA e o Modelo Linear Misto (LMM) foram realizadas no software RStudio®, com os pacotes "ggpubr", "rstatix", "lme4", "lmerTest" e "emmeans". No LMM usado, as variáveis de respostas, foram modeladas em função do Tempo, Tratamento e a interação entre eles. Além disso, foi incluído um efeito aleatório para a variável "Subject", representada pelas réplicas, para levar em consideração a dependência dos dados observados.

# RESULTADOS

### Experimento Floc & Sink

#### Clorofila

A biomassa de cianobactérias previamente a aplicação dos tratamentos (T0), apresentou distribuição quase uniforme em toda extensão da coluna d'água dos mesocosmos; no topo a clorofila de cianobactérias apresentou uma concentração média de 12,3 ( $\pm$  6,1) µg L<sup>-1</sup>, enquanto no fundo a concentração média era 9,6 ( $\pm$  4,7) µg L<sup>-1</sup> (Fig. 2). No modelo linear misto ajustado, as variáveis de respostas, clorofila de cianobactérias, foi modelada em função do "Tempo", "Tratamento" e a interação entre eles. Além disso, foi incluído um efeito aleatório para a variável "Subject", representada pelas réplicas, para levar em consideração a dependência dos dados observados. O LMM indicou efeito das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles no que tange remoção de biomassa, ou seja, para a concentração de clorofila aferida no topo e fundo das unidades amostrais (Tab.1).

Tab. 1. Análise de Variância com o método de Satterthwaite dos dados deconcentração de clorofila das amostras de topo e fundo dos mesocosmos.

	Clorofila Topo		Clorofila Fundo		
	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	
Tempo	4.77	< 0.05	22.17	< 0.05	
Tratamento	114.95	< 0.05	60.00	< 0.05	
Tempo:Tratamento	12.71	< 0.05	11.76	< 0.05	

Legenda: Análise de variância com o método de Satterthwaite dos dados de concentração de clorofila das amostras de topo e fundo do experimento de mesocosmos realizados no Reservatório do Funil.

Após 24h da aplicação dos tratamentos (T1), a clorofila medida no topo de todos os mesocosmos e do Reservatório reduziu significativamente (p < 0,05). Redução de 54% foi registrada no Controle e de 65% no Reservatório, quando comparados a T0; os tratamentos em que usamos floculante e lastro apresentaram reduções consideravelmente maiores, 97% nos tratamentos PAC + LMB e PAC + LMB + LRS. Em T7, as concentrações de clorofila registradas no topo das unidades Controle seguiram tendência de crescimento até o fim do experimento (T27), configurando um

aumento final de 49% na biomassa de cianobactérias (16,96 µg L<sup>-</sup>1) em relação ao início do experimento; não havendo diferença significativa na concentração de clorofila de cianobactéria do topo entre início e fim do experimento (Fig. 3).

Ainda em T7, o Reservatório apresentou a maior concentração de biomassa do experimento para o topo das unidades amostrais (15.40 µg L<sup>-1</sup>), 45% de aumento em relação ao início do experimento. Entretanto, nas amostragens seguintes, uma tendência de diminuição na clorofila de cianobactérias foi observada, configurando 59% de redução quando comparamos T27 e T0 (5,35 µg L<sup>-1</sup>), sendo estatisticamente diferentes entre si (P < 0,05) (Fig. 3).

Fig. 2 Evolução da concentração de clorofila-*a* de cianobactérias no experimento de mesocosmos realizado no Reservatório de Funil



Legenda: Concentrações de clorofila-*a* de cianobactérias ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) no topo e no fundo dos mesocosmos instalados no Reservatório de Funil durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4).

Para os mesocosmos com tratamento de floculante e lastro não foram observadas oscilações significativas desde T1. Assim, após 27 dias (T27), a redução de clorofila no fim do experimento para o topo das unidades amostrais foi de 88 e 94% para PAC + LMB (1,46  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e PAC + LMB + LRS (0,79  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), respectivamente, quando comparados com T0. Em ambos os tratamentos as reduções foram estatisticamente significativas e semelhantes (p <0,05); ao compararmos a clorofila do

Controle com ambos os tratamentos em T27, temos 90 e 94% de redução para PAC+LMB e PAC+LMB+LRS, respectivamente (Fig. 3).

A concentração de clorofila no fundo das unidades amostrais apresentou o mesmo padrão observado no topo; a redução final foi de 88 e 92% em PAC + LMB (1,33  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e PAC + LMB + LRS (0,86  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), respectivamente; sendo estatisticamente diferentes do início do experimento, mas iguais entre si em T27 (Fig. 3). Comparando os valores de clorofila em T27 entre Controle e os dois tratamentos, registramos redução de 86% e 91% no fundo em PAC+LMB e PAC + LMB + LRS, ambos significativamente diferentes do Controle (Fig. 3).

Fig. 3 Variação final média de clorofila-*a* de cianobactérias no experimento de mesocosmos realizado no Reservatório de Funil



Legenda: Variação final média de clorofila-*a* de cianobactérias (%) no topo e no fundo mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T27) e tempo inicial (T0); \* representa diferenças significativas na concentração de clorofila de cianobactérias para os valores reais (p < 0,05). (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e reservatório no fim do experimento (T27); as letras semelhantes indicam grupos homogêneos na concentração de clorofila de cianobactérias para os valores reais (p < 0,05).

**Cianobactérias** 

A biomassa do Reservatório, ao iniciarmos o experimento, era composta principalmente por cianobactérias, sendo *R. raciborskii, Dolichospermum spp.* e *Microcystis spp.* os táxons mais representativos. No caso do gênero *Microcystis,* uma grande quantidade de células soltas, tanto maiores quanto menores que 4  $\mu$ m foram também encontradas nas amostras. Estas células soltas foram quantificadas e agrupadas em dois grupos distintos, baseado em seu tamanho (< 4 $\mu$ m e > 4  $\mu$ m). As contagens/identificações e posterior cálculo de biovolume de cianobactérias foram realizadas apenas para as amostras de topo das unidades amostrais e do Reservatório. No modelo linear misto ajustado, as variáveis de respostas, biovolume de cada um dos grupos de cianobactérias, foram modeladas em função do "Tempo", "Tratamento" e a interação entre eles. Além disso, foi incluído um efeito aleatório para a variável "Subject", representada pelas réplicas, para levar em consideração a dependência dos dados observados.

O biovolume total inicial foi de ~ 6,60 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; *R. raciborskii* representou 44.9% da abundância relativa, as colônias de *Microcystis* spp. representaram 17.2%, enquanto *Dolichospermum* spp. representou 13,9%; já as células soltas de *Microcystis* representaram 24% do biovolume total. A variação da abundância relativa, assim como a variação do biovolume de cianobactérias durante o experimento podem ser visualizadas na figura 4.

Fig. 4 Evolução do biovolume e da abundância relativa de cianobactérias durante o experimento de mesocosmos realizado no Reservatório de Funil.



Legenda: Evolução do biovolume e da abundância relativa de cianobactérias para as amostras do topo dos mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle ) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4). Não foram coletadas amostras em T3 para essa análise.

O LMM evidenciou efeitos das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles, para cada um destes agrupamentos de cianobactérias estabelecidos (Tab. 2).

Tabela 2 – Resultado da análise de variância dos dados de Biovolume de cianobactérias das amostras de topo do experimento do experimento em mesocosmos realizado no Reservatório do Funil.

	Tempo		Tratamento		Tempo:Tratamento	
	F value	P(>F)	F value	P(>F)	F value	P(>F)
Dolichospermum spp.	1.53	> 0.05	15.01	< 0.05	1.55	> 0.05
Microcystis spp. (Colonias)	2.72	< 0.05	4.60	< 0.05	1.35	> 0.05
Raphidiopsis raciborskii	1.08	> 0.05	20.02	< 0.05	1.71	> 0.05
Ciano < 4µm (Cel. Soltas)	6.23	< 0.05	19.64	< 0.05	4.88	< 0.05
<i>Ciano</i> > 4 $\mu$ m (Cel. Soltas)	21.01	< 0.05	13.61	< 0.05	4.67	< 0.05

Legenda: Resultado da análise de variância com o método de Satterthwaite dos dados de Biovolume de cianobactérias das amostras de topo do experimento de mesocosmos realizados no Reservatório do Funil.

*Dolichospermum* spp. e *R. raciborskii* apresentaram efeitos significativo apenas para variável Tratamento (p < 0,05) (Tab.2), ou seja, considerando a dinâmica do biovolume desses dois táxons de cianobactérias, não houve variação temporal significativa. Entretanto, *Dolichospermum* spp. apresentaram redução de 100% do seu biovolume em T21 nos tratamentos PAC+LMB e PAC+LMB+LRS. Em T27 apenas o tratamento PAC+LMB extinguiu totalmente *Dolichospermum* spp.; PAC+LMB+LRS apresentou 99,3% de remoção de *Dolichospermum* spp. em relação a T0 (Fig. 5). Se considerarmos a diferença entre o biovolume de *Dolichospermum* spp. no Controle e nos tratamentos PAC+LMB e PAC+LMB+LRS em T27, temos a remoção de 95,7% e 99,6 de biomassa desse gênero (Fig. 5). *R. raciborskii*, por sua vez, apresentou redução final em seu biovolume de 93,53% no tratamento PAC+LMB e 99% em PAC+LMB+LRS, quando comparamos T27 e T0 (Fig. 5).

Fig. 5 Variação final média do biovolume de cianobactérias no experimento de mesocosmos realizados no Reservatório de Funil.



Legenda: Variação final média do biovolume de cianobactérias (%) no topo mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup>

e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T27) e tempo inicial (T0); (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e reservatório no fim do experimento (T27).

Quanto ao biovolume de *Microcystis* spp., os resultados da LMM mostraram que as variáveis Tempo e Tratamento tiveram efeitos sobre o biovolume (p < 0,05), não havendo interação entre elas (p > 0,05) (Tab. 2). Em T1, PAC+LMB apresentou redução de 99% do biovolume de *Microcystis* spp. em relação ao registrado em T0 e manteve-se sem oscilações significativas até o fim do experimento. O tratamento PAC+LMB+LRS apresentou aumento 15 vezes no biovolume de *Microcystis* spp. em T1. Porém, nas amostragens seguintes observamos reduções no biovolume de espécies desse gênero, chegando a uma redução final de 99% (Fig. 5).

Os grupos de Ciano < 4 e > 4 µm sofreram efeitos dos fatores Tempo e Tratamento, bem como na interação entre eles; Ciano < 4 e > 4 µm apresentaram reduções de ~99,5% partir T1 no tratamento PAC+LMB. Em T14, embora mantendo valores de biovolume menores do que fora registrado em T0, verificamos uma tendencia de aumento para ambos os grupos. Em T27, a remoção final foi de 96,5 e 98,4% para Cianos < 4 e > 4 µm, respectivamente, e em relação a T0; se compararmos os valores de biovolume do Controle e PAC+MB em T27, as reduções foram de ~89,5% para ambos os grupos (Fig. 5). Contrariamente, em PAC+LMB+LRS, os grupos Ciano < 4 e > 4 µm apresentaram incremento de 45 e 19%, respectivamente, em seu biovolume 24h após a aplicação do tratamento (T1). Entretanto, a partir de T7, observamos uma tendencia de redução até o fim do experimento, totalizando uma redução de 96% para Ciano < 4 µm e 98% para Cianos > 4 µm (Fig. 5).

A variação do biovolume, abundância relativa e porcentagem final de redução de biovolume de cianobactérias observadas no Reservatório podem ser visualizados nas figuras 4 e 5. Nelas podemos observar a dinâmica das cianobactérias no reservatório sem o fator confinamento. Com exceção do grupo Ciano > 4  $\mu$ m, as cianobactérias seguiram tendencia de crescimento até T7, atingindo um biovolume total de 7.8 mm<sup>3</sup> (Fig. 4). Em T14, observamos redução de 91% do biovolume em relação a T7 e 88% em relação a T0. Após 27 dias, registramos a redução final de 78% do biovolume total inicial.

As medições da concentração total de MC intracelulares e suas variantes foram realizadas para as amostras integradas da  $Z_{eu}$ . O LMM evidenciou efeitos das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles, para a concentração de MC (Tab. 3).

Tabela 3 - Análise de Variância com o método de Satterthwaite dos dados de microcistinas total intracelular das amostras integradas da zona eufótica dos mesocosmos.

	Microcistinas		
	F value	Pr(>F)	
Tempo	4.83	< 0.05	
Tratamento	4.99	< 0.05	
Tempo:Tratamento	4.66	< 0.05	

A média inicial de MC intracelulares para as unidades amostrais foi de ~2,3 ( $\pm$  0,8) µg L<sup>-1</sup>, concentração similar ao encontrado no Reservatório (Fig. 6). Após 24h (T1) da aplicação dos tratamentos, PAC+LMB obteve 98% de redução na concentração total de MC, enquanto PAC+LMB+LRS apresentou 99,4% de redução, quando comparados a T0; a concentração de MC no Controle se manteve similar ao momento inicial do experimento. Também observamos redução na MC aferida para o Reservatório, 44% do valor inicial. Em T3, enquanto o Controle permanecia com concentrações de MC similares a T0, PAC+LMB apresentou valores ainda menores ao registrado na medição anterior, com 99.7% de redução de MC em relação a T0. Contrariamente, PAC+LMB+LRS apresentou um aumento de 205 vezes em relação a medição anterior (T1), totalizando 2,6 µg L<sup>-1</sup> de MC, 22% mais MC do que fora registrado no início do experimento (T0) (Fig.6).

Sete dias após o início do experimento (T7), a concentração de MC no Controle decaiu significativamente, atingindo seu menor valor em todo experimento, ~0,04  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Já os tratamentos com floculante e lastro, observamos aumentos nas concentrações de MC; PAC+LMB, embora com concentrações inferiores à medição realizada em T0, que apresentou 56% de redução; enquanto PAC+LMB+LRS apresentou a maior concentração média de MC de todo o experimento, 2.7  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. No Reservatório, observamos uma tendência de aumento de MC, que seguiu até o fim do experimento e alcançou 1,9  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Nas medições seguintes, até T27, os tratamentos com floculante e

lastro apresentaram tendencia e redução na concentração de MC; PAC+LMB obteve 94% de redução total, apresentando a concentração final 0.16  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de MC; PAC+LMB+LRS atingiu 100% de redução. No Controle a concentração final de MC foi 1,55  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 31% menos MC do que em T0, enquanto no Reservatório a concentração final foi de 1.9  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Fig. 7).

Fig. 6 Variação das concentrações de microcistina intracelular total no experimento de mesocosmos realizados no Reservatório de Funil.



Legenda: Concentrações de microcistina intracelular total ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) em amostras coletadas na zona eufótica dos mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4).

Fig. 7 Variação final média de microcistina intracelular total no experimento de mesocosmos realizados no Reservatório de Funil.



Legenda: Variação final média de microcistina intracelular total (%) em amostras da zona eufótica mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do

coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T27) e tempo inicial (T0); (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e reservatório no fim do experimento (T27). as letras semelhantes indicam grupos homogêneos na concentração de clorofila de cianobactérias (p < 0,05).

Através das análises em LC-MS foi possível identificar e quantificar cinco variantes de MC nas amostras (RR, LR, LY, YR e [D-Asp<sup>3</sup>] LR). MC-RR foi a variante mais abundante, seguido pela variante YR e LY nas amostras de TO. A proporcionalidade de variantes foi alterada ao longo do experimento; nas medições feitas no Controle observamos que em T27 a variante LY tornou-se mais expressiva, representando 56% do total de MC, enquanto no Reservatório a mesma mudança ocorreu em T21 com 46% de representatividade de LY, chegando a 77% em T27 (Fig.8A, B). No tratamento PAC+LMB, observamos mudança na proporcionalidade de variantes em T7, quando os valores de MC total atingiram a maior concentração desde à aplicação do tratamento; a variante LR, particularmente, seguiu em aumento até T21, quando chegou a representar 72% do total de MC (0,34  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) (Fig.8C). Nas amostragens seguintes, registramos redução graduação de todas as variantes, finalizando em uma proporcionalidade de -LY 56% (0,09  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), -YR 31% (0,05  $\mu$ g L<sup>-1</sup> <sup>1</sup>) e -RR 13% (0,02 µg L<sup>-1</sup>). Similarmente, observamos em PAC+LMB+LRS um incremento da representatividade da variante LR entre T3 e T7 (Fig.8E); em T14 apenas as variantes -LR e -RR estavam presentes nas amostras, e -LR representava 84% (0,05 µg L-1). Após 27 dias do início do experimento, nenhuma variante foi identificada nas amostras do tratamento PAC+LMB+LRS.

Fig. 8 Concentração média das variantes de microcistinas no experimento de mesocosmos realizados no Reservatório de Funil.



Legenda: Concentração média das variantes de microcistinas ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) em amostras da zona eufótica dos mesocosmos instalados no Reservatório de Funil, durante 27 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup> e solo vermelho local, LRS 0,2 mg L<sup>-1</sup>) separadamente ou em misturas binárias (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,1 mg L<sup>-1</sup>, e solo vermelho local, LRS 0,1 mg L<sup>-1</sup>).

## Discussão

Neste estudo, através de testes em mesocosmos, demonstramos que uma baixa dose de floculante associado a lastro (F&L)é eficiente na remoção de biomassa de cianobactérias e MC intracelulares de um reservatório fundo e tropical. Nossos resultados evidenciaram que ambos os tratamentos testados foram eficazes, porém a maior eficiência esteve relacionada à associação de dois tipos diferentes de lastros; a combinação de PAC+LMB+LRS se mostrou mais eficiente na remoção de biomassa de espécies potencialmente produtoras de MC (~91%) e microcistinas intracelulares (100%) do que o tratamento com apenas um lastro, PAC+LMB. Embora ambos os tratamentos terem sido capazes de reduzir a zero a população de *R. raciborskii,* apenas PAC+LMB+LRS foi efetivo em reduzir completamente *Dolichospermum* sp.. Colônias e células soltas de *Microcystis* spp. persistiram nas unidades amostrais após 27 dias da

aplicação das técnicas, e em biovolume semelhantes para ambos os tratamentos testados. Além disso, o tratamento PAC+LMB+LRS reduziu as concentrações de MCs intracelulares abaixo do limite de detecção, enquanto PAC+LMB apresentou concentração final 0,15  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Tais resultados estão em conformidade com estudos anteriores realizados em escala laboratorial, onde a associação de dois diferentes lastros junto ao floculante PAC, mostrou-se mais efetivo na remoção de biomassa composta principalmente por *Dolichospermum* e *Microcystis* (ARRUDA et al., 2021).

Diversos coagulantes e argilas (lastro) vem sendo testados visando encontrar um tratamento seguro, eficiente e mais barato para mitigação de florações de cianobactéria e P (PAN; CHEN; ANDERSON, 2011; LÜRLING; OOSTERHOUT, 2013; LEE; ROBINSON; CHONG, 2014; NOYMA et al., 2016, 2017; WAAJEN et al., 2016; DE MAGALHÃES et al., 2017; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019). Em ecossistemas aquáticos tropicais, ambas as combinações (PAC + LMB e PAC + LRS) demonstraram eficácia semelhante na remoção de biomassa de cianobactérias em testes de laboratório (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017). O LMB, conhecido comercialmente como Phoslock (VALSAMI-JONES, 2004), é mais caro que o LRS, material facilmente encontrado às margens de sistemas aquáticos naturais no sudeste do Brasil (MUCCI et al., 2018). No entanto, o LMB apresenta maior capacidade de imobilizar P do que LRS (MUCCI et al., 2018). Com a proposta de barateamento da aplicação da técnica sem perda de eficácia de remoção de biomassa, a combinação de LMB e LRS (50/50%) foi inicialmente testada em pequena escala, em água de um reservatório tropical dominada por Dolichospermum e Microcystis (ARRUDA et al., 2021); de forma promissora a combinação removeu 38% mais biomassa do que os tratamentos com apenas um dos lastros, porém com valores de remoção de MC intracelulares semelhantes entre os tratamentos. Entretanto, quando a comunidade era dominada por R. raciborskii e Microcystis spp. a combinação de LMB e LRS foi ~ 30% menos eficiente do que o tratamento com apenas LMB (Cap. IV).

Estudos têm sugerido que a remoção de biomassa de cianobactérias pela técnica de floculação e sedimentação é mais efetiva e apresenta melhor relação custo-benefício quando a comunidade é composta por organismos com células pequenas, esféricas e livres de apêndices salientes ou substâncias poliméricas (GHERNAOUT; GHERNAOUT; SAIBA, 2010). Espécies como *Aphanocapsa delicatissima*, *Merismopedia glauca* e *M. tenuissima* foram efetivamente removidos da coluna de água, independentemente do material testado (ex.: floculante e lastros sozinhos), o que

baratearia a aplicação em larga escala; espécies filamentosas entretanto, foram mais eficientemente removidas apenas com a aplicação de floculante (PAC ou Sulfato de alumínio) combinado ao lastro (LMB) após 1 h de incubação (R. raciborskii, 0-58%; P. agardhii, 0-66%; Dolichospermum planctonica, 0-77%) (LUCENA-SILVA et al., 2019). Embora em nosso estudo R. raciborskii e Dolichospermum spp. tenham sido removidos das unidades amostrais com PAC+LMB+LRS, a remoção total dessas populações só foi observada 14 dias após aplicação da técnica. Além disso, as colônias e células soltas ( $<4 e >4 \mu m$ ) de *Microcystis* spp. permaneceram nas unidades amostrais mesmo após 27 dias da aplicação. Intervenções como Floc & Sink / Lock não apenas removem biomassa da coluna d'água, mas agem no P disponível, podendo também reduzir a liberação de P do sedimento (WAAJEN et al., 2016). Logo, os efeitos da remoção de P sob a comunidade não podem ser observados ou avaliados em testes de curta duração. Nesse sentido, os resultados desse estudo sugerem que a remoção das populações de R. raciborskii e Dolichospermum spp. não se deu totalmente por ação imediata de floculação e sedimentação, mas possivelmente devido à redução do P disponível. A limitação de P pode ocorrer se as concentrações de fósforo solúvel reativo (SRP) estiverem abaixo de 3-10 µg L<sup>-1</sup> de P (REYNOLDS, 2006; KOLZAU et al., 2014); em nosso experimento o SRP chegou a valores  $< 5 \ \mu g \ L^{-1}$  a partir de T7 em ambos os tratamentos testados (dados não publicados). A persistência de Microcystis spp. após 27 dias pós tratamento, mesmo em baixa biomassa  $(0.005 - 0.07 \text{ mm}^3)$  reforca que a extinção dos outros gêneros ocorreu por baixa disponibilidade de P; Microcystis responde à deficiência de P formando polifosfatos, que ajudam a economizar P quando o fósforo é insuficiente, inibindo assim seus oponentes por meio da competição por fósforo (WAN et al., 2019; LI et al., 2023). Embora, a literatura já tenha indicado que a eficiência da técnica de floculação e sedimentação está atrelada a uma conjuntura de fatores (ex.: ambiente, matéria orgânica extracelular, características morfofisiológicas da espécie alvo, cepas/população) (MIRANDA et al., 2017; LÜRLING et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), as divergências entre nossos achados e os de estudo anteriores parecem estar relacionados especialmente à diferentes metodologias usadas, nesse caso o tempo de incubação. Testes com a técnica de Floc & Sink e P. rubescens mostraram que sua biomassa pode ser removida inicialmente, mas após 24 h muitos filamentos retornaram a coluna d'água, possibilitando a recolonização da coluna d'água (LURLING; MUCCI; WAAJEN, 2020); a mesma respostas foi observada pós aplicação da técnica Floc & Lock no lago De Kuil (MUCCI, 2019). Em nosso estudo, caso o tempo de incubação fosse curto (1/2h) nossos resultados de remoção de biomassa e MC indicariam uma suposta inefetividade da técnica. Dessa forma, reiteramos o alerta de LÜRLING et al., 2020, quando se trata do uso de testes de curta duração (1–2 h) para determinar a eficácia de técnica de coagulação e sedimentação na remoção de biomassa.

Em relação aos tratamentos testados aqui, observamos que apenas PAC+LMB+LRS removeu toda a população de Dolichospermum spp., mesmo no tratamento em que a concentração total de MC esteve abaixo do limite de detecção após 27 dias. Embora estatisticamente semelhantes, em relação a biomassa de cianobactéria e concentração final de MC, PAC+LMB não foi capaz de realizar a remoção total de Dolichospermum, e apresentou detecção de MC em suas amostras (~0,016 µg L<sup>-1</sup>). Considerando que a dinâmica da concentração de SRP também foi semelhante em ambos os tratamentos (inferiores a 5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> a partir de T7, dados não publicados), acreditamos que tal diferença está atrelada, sobretudo, a granulometria dos lastros utilizados. Em Arruda et al., (2021) o aumento da eficiência da combinação de dois lastros (LMB+LRS) foi atribuída à presença de partículas inorgânicas com granulometrias diferentes, o que aumentou a ação do mecanismo físico de remoção nos flocos de biomassa, levando a uma melhor floculação/sedimentação por varredura; LRS é composto por areia grossa (2-0,0 mm), areia fina (0,20-0,05 mm), silte (0,05-0,002 mm)mm) e argila (<0,002 mm) (NOYMA et al., 2016), enquanto o tamanho dos grânulos do LMB é de 2-4 mm × 1-3 mm (PWS, 2006). Assim, o tratamento contendo LRS, material menor e mais leve, permanece por mais tempo suspenso na coluna d'água, possibilitando maior interação com as cianobactérias. Assim, a hipótese proposta em Arruda et. al., (2021) para o aumento da eficiência da combinação de dois diferentes lastros, também faz sentido aqui. Nesse mesmo sentido, Drummond et al., 2022 demonstrou em seu estudo que, a eficiência da combinação proposta como tratamento varia em função das variáveis limnológicas e/ou morfotipos da espécie dominante.

Embora não tenha sido objetivo deste trabalho avaliar a dinâmica de P após aplicação de técnica F&L, esperávamos observar possíveis efeitos da limitação desse nutriente na sucessão de espécies dentro das unidades amostrais, e também nas concentrações de MC totais e suas variantes. Estudos sugerem a seleção de genótipos tóxicos de *Microcystis* e outros produtores de MC sob condições ambientais desfavoráveis (KARDINAAL et al., 2007; BRIAND et al., 2008, 2009; MARTINS; VASCONCELOS, 2011). Nutrientes, incluindo P, podem afetar a produção de MC e sua diversidade estrutural (BASHIR et al., 2023). Cepas de *M. aeruginosa* (Ma19 e

Ma26), com origem em ambiente tropical, em deficiência de P, apresentaram aumento na produção de MC, e a cepa mais tóxica mostrou-se mais resistente a limitação de P (PIMENTEL; GIANI, 2014); a produção de uma das formas mais tóxicas de MC, -LR, também foi observada sob condições mais limitadas de P (OH et al., 2000). Assim, baseado em nossos resultados, se pensarmos na razão entre a concentração de MC intracelulares e biovolume total dos gêneros potencialmente produtores de MC (Microcystis e Dolichospermum) notamos um aumento de ~19 vezes na toxicidade da biomassa, a partir de T7 em relação a T0, e em ambos os tratamentos testados; em T14 essa razão foi reduzida para ~4 vezes em PAC+LMB, porém aumentou ~396 vezes em PAC+LMB+LRS. É exatamente nesse momento do experimento que a variante -LR se torna mais expressiva para ambos os tratamentos testados (Fig. 8); tendo incialmente uma representatividade média abaixo de 1%, chegou a atingir 55% entre T14 e T21 em ambos os tratamentos; ao final do experimento, as concentrações de MC-LR permaneciam abaixo do limite de detecção. É importante ressaltar que, em termos de concentração, a variante MC-LR quando mais abundante, apresentou concentração de 0,3 µg L<sup>-1</sup> no tratamento PAC+LMB e 0,8 µg L<sup>-1</sup> em PAC+LMB+LRS. Tais concentrações são consideradas extremamente baixas quando comparadas às concentrações de MC de outros reservatórios latino-americanos (CONTI; GUERRERO; REGUEIRA, 2005; RUIZ et al., 2013; FONSECA et al., 2015; ALMANZA et al., 2016; GONZÁLEZ-PIANA et al., 2017; LEÓN; PEÑUELA, 2019; NANDINI; SÁNCHEZ-ZAMORA; SARMA, 2019; MUNOZ et al., 2021; GANGI et al., 2022; PASSOS et al., 2022).

Em nosso estudo também realizamos o acompanhamento do lago do reservatório, com amostragens concomitantemente às realizadas nas unidades amostrais, e ao lado dos *piers*. O objetivo principal dessas amostragens foi identificar possíveis efeitos negativos do confinamento de parte da coluna d'água dos mesocosmos (ex., colapso da comunidade fitoplanctônica); também era nosso objetivo avaliar a dinâmica da comunidade de cianobactérias e dos níveis de MC no sistema durante a execução do experimento. Embora tenhamos observado diferenças entre controle e o lago do reservatório, tais diferença foram possivelmente ocasionadas pela circulação da água no sistema (tempo de residência). Por exemplo, observamos redução dos organismos potencialmente produtores de MC no reservatório em relação ao Controle em T27; porém, a abundância relativa de cada um dos gêneros ao longo do experimento apresentou o mesmo padrão do observado no Controle. A dinâmica de MC

intracelulares também foi distinta entre Controle e reservatório, porém a abundância de cada uma das variantes ao longo do experimento foi semelhante entre estes. Assim, descartamos qualquer efeito negativo que pudesse afetar o comparativo entre Controle e tratamentos.

Embora nossos resultados sejam positivos e promissores, eles também reforçam ainda mais a necessidade de testes prévios com as medidas selecionadas para cada ambiente. Supondo que, em um cenário onde a biomassa apresente maior toxicidade, a remoção parcial de espécies da comunidade de cianobactérias, ou ainda o estresse por redução de P, pode selecionar cepas potencialmente tóxicas no ambiente.

# Conclusão

Nossos resultados mostraram que a combinação de uma dose baixa de coagulante em combinação com compostos de lastro, removeu efetivamente a população de *R. raciborskii* e *Dolichospermum* spp. da coluna de água de um reservatório profundo e tropical. Embora não tenhamos observado diferenças significativas na biomassa total final e MC intracelulares entre os dois tratamentos testados, o tratamento com a combinação de dois diferentes lastros (PAC+LMB+LRS) foi capaz de remover 100% das populações de *Dolichospermum* spp. e 100% de MC. As populações de *Microcystis* foram reduzidas em média em 98%; colônias e células soltas persistiram nas unidades amostrais após 27 dias da aplicação independente do tratamento usado. Nossos resultados ainda sugerem que a extinção das populações de espécies filamentosas (*R. raciborskii* e *Dolichospermum* spp.) não se deu exclusivamente pelo processo imediato de floculação e sedimentação, mas também pela redução de P à valores considerados limitantes ao crescimento (< 0,5  $\mu$ g).

# REFERÊNCIAS

ALMANZA, V. et al. Occurrence of Toxic Blooms of Microcystis Aeruginosa in a Central Chilean (36° Lat. S) Urban Lake. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 89, n. 1, p. 8, dez. 2016. ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

BASHIR, F. et al. Cyanotoxins, Biosynthetic Gene Clusters, and Factors Modulating Cyanotoxin Biosynthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 9, p. 241, set. 2023.

BRIAND, E. et al. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystinproducing strains in a bloom-forming Planktothrix agardhii (Cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, 2008.

BRIAND, E. et al. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming Microcystis aeruginosa (cyanobacteria) population. *ISME Journal*, v. 3, n. 4, 2009.

COLOMA, S. E. et al. Newly Isolated *Nodularia* Phage Influences Cyanobacterial Community Dynamics. *Environmental Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 273–286, jan. 2017.

CONTI, A. L. R.; GUERRERO, J. M.; REGUEIRA, J. M. Levels of Microcystins in Two Argentinean Reservoirs Used for Water Supply and Recreation: Differences in the Implementation of Safe Levels. *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 3, p. 263–269, jun. 2005.

DAIL, H. et al. Sorption of dissolved microcystin using lanthanum-modified bentonite clay Molecular diversity of polar cyanobacteria View project Diverse aspects of testate amoebae evolution View projectArticle in Journal of Aquatic Plant Management. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.researchgate.net/publication/337227788">https://www.researchgate.net/publication/337227788</a>>.

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*, v. 40, n. 1, 2017.

DRUMMOND, E. et al. Temporal and Spatial Variation in the Efficiency of a Floc & Sink Technique for Controlling Cyanobacterial Blooms in a Tropical Reservoir. *Harmful Algae*, v. 117, p. 102262, ago. 2022.

DOWNING, J. A. Limnology and oceanography: Two estranged twins reuniting by global change. *Inland Waters*, v. 4, n. 2, 2014.

FONSECA, J. R. et al. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 27, n. 1, p. 78–92, mar. 2015.

GANGI, D. et al. Integrating Field and Satellite Monitoring for Assessing Environmental Risk Associated with Bacteria in Recreational Waters of a Large Reservoir. *Science of The Total Environment*, v. 818, p. 151714, abr. 2022.

GHERNAOUT, B.; GHERNAOUT, D.; SAIBA, A. Algae and Cyanotoxins Removal by Coagulation/Flocculation: A Review. *Desalination and Water Treatment*, v. 20, n. 1–3, p. 133–143, ago. 2010.

GONZÁLEZ-PIANA, M. et al. Dynamics of Total Microcystin LR Concentration in Three Subtropical Hydroelectric Generation Reservoirs in Uruguay, South America. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 99, n. 4, p. 488–492, out. 2017. GREENFIELD, D. I. et al. The Effects of Three Chemical Algaecides on Cell Numbers and Toxin Content of the Cyanobacteria Microcystis Aeruginosa and Anabaenopsis Sp. *Environmental Management*, v. 54, n. 5, p. 1110–1120, nov. 2014.

GUEDES, I. A. et al. Fluctuations in microcystin concentrations, potentially toxic Microcystis and genotype diversity in a cyanobacterial community from a tropical reservoir. *Harmful Algae*, v. 39, 2014.

HAN, J.; JEON, B. S.; PARK, H. D. Cyanobacteria cell damage and cyanotoxin release in response to alum treatment. *Water Science and Technology: Water Supply*, v. 12, n. 5, 2012.

HER, N. et al. Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Research*, v. 38, n. 6, 2004.

JANČULA, D.; MARSÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, v. 85 9, p. 1415–22, 2011.

JONES, G. Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a Microcystis Aeruginosa Bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Water Research*, v. 28, n. 4, p. 871–876, abr. 1994.

KARDINAAL, W. et al. Microcystis Genotype Succession in Relation to Microcystin Concentrations in Freshwater Lakes. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 48, p. 1–12, 20 jun. 2007.

KOLZAU, S. et al. Seasonal Patterns of Nitrogen and Phosphorus Limitation in Four German Lakes and the Predictability of Limitation Status from Ambient Nutrient Concentrations. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. e96065, 22 abr. 2014.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. A Review on Application of Flocculants in Wastewater Treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 92, n. 6, p. 489–508, nov. 2014.

LEÓN, C.; PEÑUELA, G. A. Detected Cyanotoxins by UHPLC MS/MS Technique in Tropical Reservoirs of Northeastern Colombia. *Toxicon*, v. 167, p. 38–48, set. 2019.

LI, J. et al. Dynamic Characteristics of Total and Microcystin-Producing Microcystis in a Large Deep Reservoir. *Environmental Pollution*, v. 335, p. 122256, out. 2023.

LUCENA-SILVA, D. de et al. Removal Efficiency of Phosphorus, Cyanobacteria and Cyanotoxins by the "Floc & Sink" Mitigation Technique in Semi-Arid Eutrophic Waters. *Water Research*, v. 159, p. 262–273, ago. 2019.

LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, v. 158, 2020.

LÜRLING, M.; MUCCI, M. Mitigating Eutrophication Nuisance: In-Lake Measures Are Becoming Inevitable in Eutrophic Waters in the Netherlands. *Hydrobiologia*, v. 847, n. 21, p. 4447–4467, dez. 2020.

LÜRLING, M.; MUCCI, M.; WAAJEN, G. Removal of Positively Buoyant Planktothrix rubescens in Lake Restoration. *Toxins*, v. 12, n. 11, p. 700, 5 nov. 2020. LÜRLING, M.; OOSTERHOUT, F. V. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research*, v. 47, n. 17, 2013.

MARTINS, A.; VASCONCELOS, V. Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology*, v. 193, p. 615–627, 2011.

MIRANDA, M. et al. The Efficiency of Combined Coagulant and Ballast to Remove Harmful Cyanobacterial Blooms in a Tropical Shallow System. *Harmful Algae*, v. 65, p. 27–39, maio 2017.

MOSS, B. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters*, v. 1, n. 2, p. 101–105, 1 jul. 2011.

MUCCI, M. et al. Chitosan as Coagulant on Cyanobacteria in Lake Restoration Management May Cause Rapid Cell Lysis. *Water Research*, v. 118, p. 121–130, jul. 2017.

MUCCI, M. et al. Assessment of Possible Solid-Phase Phosphate Sorbents to Mitigate Eutrophication: Influence of PH and Anoxia. *Science of The Total Environment*, v. 619–620, p. 1431–1440, abr. 2018.

MUCCI, M. N. T. From green to transparent waters : Managing eutrophication and cyanobacterial blooms by geo-engineering. 2019. Wageningen University, 2019. Disponível em: <a href="https://research.wur.nl/en/publications/605d6988-2748-4d3c-8efe-3b50d68c777f">https://research.wur.nl/en/publications/605d6988-2748-4d3c-8efe-3b50d68c777f</a>>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MUNOZ, M. et al. Overview of Toxic Cyanobacteria and Cyanotoxins in Ibero-American Freshwaters: Challenges for Risk Management and Opportunities for Removal by Advanced Technologies. *Science of The Total Environment*, v. 761, p. 143197, mar. 2021.

NANDINI, S.; SÁNCHEZ-ZAMORA, C.; SARMA, S. S. S. Toxicity of Cyanobacterial Blooms from the Reservoir Valle de Bravo (Mexico): A Case Study on the Rotifer Brachionus Calyciflorus. *Science of The Total Environment*, v. 688, p. 1348–1358, out. 2019.

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*, v. 97, p. 26–38, jun. 2016.

NOYMA, N. P. et al. Coagulant plus Ballast Technique Provides a Rapid Mitigation of Cyanobacterial Nuisance. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0178976, 9 jun. 2017.

OH, H.-M. et al. Microcystin Production by *Microcystis Aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 176–179, jan. 2000.

PAERL, H. W.; HALL, N. S.; CALANDRINO, E. S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment*, v. 409, n. 10, 2011.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, 2012.

PAN, G.; CHEN, J.; ANDERSON, D. M. Modified Local Sands for the Mitigation of Harmful Algal Blooms. *Harmful Algae*, v. 10, n. 4, p. 381–387, maio 2011.

PASSOS, L. S. et al. Cyanotoxins and Water Quality Parameters as Risk Assessment Indicators for Aquatic Life in Reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 241, p. 113828, ago. 2022.

PIMENTEL, J. S. M.; GIANI, A. Microcystin Production and Regulation under Nutrient Stress Conditions in Toxic Microcystis Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 18, p. 5836–5843, 15 set. 2014.

REYNOLDS, C. S. *The ecology of phytoplankton*. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.

RUIZ, M. et al. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-Occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 224, n. 6, p. 1593, jun. 2013.

SIVONEN, K.; JONES, G. J. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. [s.l: s.n.]

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 2009.

SOARES, M. et al. Changes in Species Composition during Annual Cyanobacterial Dominance in a Tropical Reservoir: Physical Factors, Nutrients and Grazing Effects. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 57, p. 137–149, 6 out. 2009.

SOARES, M. C. S. et al. The Effects of Water Retention Time and Watershed Features on the Limnology of Two Tropical Reservoirs in Brazil. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, v. 13, n. 4, p. 257–269, dez. 2008.

SVIRČEV, Z. et al. Toxicology of Microcystins with Reference to Cases of Human Intoxications and Epidemiological Investigations of Exposures to Cyanobacteria and Cyanotoxins. *Archives of Toxicology*, v. 91, n. 2, p. 621–650, fev. 2017.

TAKAARA, T. et al. Affinity isolation of algal organic matters able to form complex with aluminium coagulant. Em: Water Science and Technology: Water Supply, 5–6, *Anais*...2004.

TAKAARA, T. et al. Cellular proteins of Microcystis aeruginosa inhibiting coagulation with polyaluminum chloride. *Water Research*, v. 41, n. 8, 2007.

VALSAMI-JONES, E. (ed.). *Phosphorus in environmental technologies: principles and applications*. London: IWA Publ, 2004.

VISSER, P. M. et al. How Rising CO2 and Global Warming May Stimulate Harmful Cyanobacterial Blooms. *Harmful Algae*, v. 54, p. 145–159, abr. 2016.

WAAJEN, G. et al. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v. 97, 2016.

WAN, L. et al. Phosphorus Strategy in Bloom-Forming Cyanobacteria (Dolichospermum and Microcystis) and Its Role in Their Succession. *Harmful Algae*, v. 84, p. 46–55, abr. 2019. ZHANG, P.; REN, B. Z.; WANG, F. Humic acid removal from water by poly aluminium chloride (PAC). Em: Applied Mechanics and Materials, PART 1, *Anais*...2013.

# 6 ARTIGO: EFICÁCIA DE TÉCNICA "KILL, FLOC & SINK" NA REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E MICROCISTINAS DA ÁGUA DE UMA LAGOA SALOBRA, URBANA, RASA E HIPEREUTRÓFICA: ESTUDO EM MICROCOSMOS

(Microcosm performed in the Dry Season)

## Resumo

A combinação de uma baixa dose de coagulante (policloreto de alumínio, PAC — 'Floc') e um lastro capaz de se ligar ao fosfato (bentonita modificada com lantânio, LMB —'Sink/Lock') tem sido usado com sucesso para controlar a proliferação de cianobactérias e a eutrofização em sistemas aquáticos. Entretanto, espécies do gênero Planktothrix tem se mostrado como um grande desafio à efetividade da técnica, sobretudo em ambientes rasos. Assim, este estudo se propôs a testar, alternativamente, a associação do algicida Peróxido de Hidrogênio (H2O2), PAC e LMB (Kill e Floc & Sink) para induzir a morte e remover a biomassa de *Planktothrix isothrix*, sem liberação de microcistinas (MC). Para isso, usamos em nossos experimentos água proveniente de uma lagoa tropical, rasa e hipereutrófica, com biomassa dominada por P. isothrix (~160  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Chl-a). Em cilindros contendo ~1L de suspensão de P. isothrix, testamos três diferentes compostos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAC e LMB) sozinhos ou de forma combinada, totalizando 5 diferentes tratamentos. Nossos resultados evidenciaram que, após 48h, a combinação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB foi a mais efetiva dentre os tratamentos testados, sedimentando 17 vezes mais biomassa do que o controle, e 3 vezes mais biomassa do que a combinação de PAC+LMB. Além disso, foi o único tratamento capaz de reduzir a eficiência fotossintética da biomassa a valores < 0,1, interrompendo o processo fotossintético de P. isothrix, e impossibilitando a ressuspensão da biomassa novamente para coluna d'água. Reduções nas concentrações de MC dissolvidas, de 1,24  $\mu$ g L<sup>-1</sup> à valores abaixo do limite de detecção, foram registrados para todos os tratamentos. Dessa forma, nosso estudo evidenciou que a técnica Kill, Floc & Sink foi eficaz em manter a população de P. isothrix precipitada no fundo dos cilindros, com baixa possibilidade de ressuspensão e lise, além de reduzir em 100% as concentrações de MC dissolvida.
## INTRODUÇÃO

Globalmente, muitos lagos rasos passaram por uma transição drástica em sua composição ecológica; antes com água claras e dominados por macrófitas, esses lagos agora exibem um estado turvo, dominado por cianobactérias, resultado do intenso processo de eutrofização (ANDERSON; GLIBERT; BURKHOLDER, 2002; HEISLER et al., 2008). Considerado o sintoma mais notório da eutrofização, florações tóxicas de cianobactérias prejudicam serviços sistêmicos, como a produção de água potável, irrigação, recreação, aquicultura e pesca (PAERL; PAUL, 2012). Além disso, as cianobactérias podem produzir uma variedade de toxinas que representam uma grave ameaça, sobretudo à saúde humana (CARMICHAEL et al., 2001; CODD; MORRISON; METCALF, 2005; HUISMAN et al., 2018). Florações tóxicas de cianobactérias podem ocorrer em uma ampla gama de condições ambientais e são especialmente prolíficas e competitivas em condições de alto teor de nutrientes (PREECE et al., 2017).

Grandes esforços têm sido feitos em todo o mundo para melhorar a qualidade ecológica de lagos rasos, principalmente, reduzindo o aporte externo de nutrientes (JEPPESEN et al., 2007); entretanto, atividades antropogênicas e as mudanças climáticas tem agravado ainda mais a eutrofização e, consequentemente, os eventos de florações de cianobactérias (JEPPESEN et al., 2009; O'NEIL et al., 2012b). Além disso, o simples controle de fontes pontuais externas de poluição tem se mostrado insuficiente para reverter o estado trófico do ambiente, e medidas adicionais são necessárias (PAERL et al., 2016). Para promover a recuperação de sistemas afetados pela eutrofização, diferentes estratégias devem ser consideradas (JEPPESEN et al., 2007; COOKE et al., 2016; PAERL et al., 2016). Uma abordagem que tem se mostrado eficaz é a técnica de coagulação e precipitação de fósforo (P) e cianobactérias, (Floc & Lock; Floc & Sink), que utilizam coagulantes minerais/metálicos, naturais, orgânicos e sintéticos (LEE; ROBINSON; CHONG, 2014); estes auxiliam na agregação e flutuação da biomassa, associado com lastro (argilas naturais ou modificadas) para afundar efetivamente os agregados celulares rumo ao sedimento (WAAJEN et al., 2016; VAN OOSTERHOUT et al., 2020). Entretanto, as cianobactérias, como espécies dominantes em lagos rasos eutróficos, vem desafiando a melhoria da qualidade da água (SCHEFFER et al., 1997; PREECE et al., 2017). Esses organismos se beneficiam de sua longa história evolutiva, durante a qual certas características se desenvolveram e lhes proporcionaram vantagens competitivas (PAERL; HUISMAN, 2009).

Planktothrix é um gênero frequentemente reportado em lagos rasos eutróficos e hipertróficos rasos, turvos e polimíticos (RÜCKER; WIEDNER; ZIPPEL, 1997; SCHEFFER et al., 1997; NIXDORF; MISCHKE; RÜCKER, 2003). Isso se deve, em parte, a características de espécies membros da ordem Oscilatoriales, como por exemplo a adaptação a condições de pouca luminosidade, podendo crescer usando baixas quantidades de luz em profundidade (KROMKAMP et al., 2001; OBERHAUS et al., 2007); outras características relevantes do grupo, no contexto de nosso estudo, é sua motilidade, um movimento deslizante com orientação fototática positiva (HÄDER, 1984), além de serem potenciais produtores de microcistinas (CHORUS; WELKER, 2021a). Tais características, podem impactar negativamente na efetividade de técnicas de floculação e coagulação, uma vez que, as células de Planktothrix já floculadas e sedimentadas, permanecem viáveis fotossinteticamente no fundo do lago, possibilitando a recolonização do ambiente (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020). Técnicas de floculação e precipitação podem ainda ser consideradas para mitigação de florações de Planktothrix; entretanto, somente quando as células são previamente levadas/induzidas a morte, reduzindo a possibilidade de recolonização da coluna de água. A combinação de Floc & Sink or Lock com algicidas ("Kill, Floc & Sink") já foi testada em laboratório usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sulfato férrico polimérico como coagulante, sedimento de lago como lastro (WANG et al., 2012), com peróxido de cálcio como algicida, quitosana como coagulante e solo vermelho como lastro (NOYMA et al., 2016), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como algicida, PAC como floculante e LMB como lastro (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). A efetividade destas intervenções variou, sobretudo, de acordo com o organismo alvo, mesmo quando pertencentes a mesma espécie.

Dessa forma, este estudo se propôs a testar a hipótese de que a técnica *Kill, Floc* & *Sink* é eficiente para induzir a morte e remover a biomassa de cianobactérias composta principalmente por *P. isothrix,* sem liberação de microcistinas, em uma lagoa tropical rasa hipereutrófica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### Amostragem

Para estes experimentos, amostras de água foram coletadas em Out/22, final da estação quente e seca, na Lagoa de Jacarepaguá. Uma lagoa costeira, rasa e hipereutrofizada. Com concentração inicial de ~190  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de clorofila-*a*, a água coletada foi imediatamente utilizada, não havendo necessidade de armazenamento. A biomassa de cianobactérias na amostra foi composta predominantemente por ~97,08% de *Planktothrix isothrix* (Skuja) Komárek & Komárková e ~2,91% de *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek (abundância relativa ao biovolume). No momento da amostragem, o pH era de 9,7 na hora da coleta e a temperatura da água de 25°C.

## Produtos Químicos e Materiais

O coagulante PAC (policloreto de alumínio;  $Al_n(OH)_mCl3_{n-m}$ , r ~1.37 kg L<sup>-1</sup>, 9,5% Al, 21.0% Cl) foi obtido da Purewater Efluentes (São Paulo, Brasil). A bentonita modificada com lantânio Phoslock® (LMB) foi obtida da HydroScience (Porto Alegre, Brasil. O algicida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, r ~1,130 kg L<sup>-1</sup>,30%) foi adquirido da Isofar Industria e Comercio de Produtos Químicos (Rio de Janeiro, Brasil).

## Experimento de Floculação e sedimentação

#### Experimento 1 – Range de PAC

Cinco concentrações de PAC foram testadas (0, 2, 4, 8, 16 e 32 mg Al L<sup>-1</sup>). Este experimento não teve réplicas porque seguiu um desenho de regressão para avaliar a dosagem de coagulante mais adequada e eficaz. O ensaio foi montado em tubos de vidro (10 x 200 mm) contendo 60 mL de suspensões de cianobactérias com concentração inicial de ~160  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de clorofila-a. O PAC foi adicionado na superfície e misturado com uma haste de metal por 30 segundos; os tubos foram então incubados durante duas horas. Após o tempo de incubação (48h), os tubos foram inspecionados visualmente quanto à formação de flocos, e alíquotas de 5 mL foram retiradas do topo e do fundo dos tubos para determinar a precipitação da biomassa de cianobactérias. A

concentração de clorofila-a e a eficiência do fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) (Genty et al., 1989) foram medidas usando um analisador de fitoplâncton PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). O pH também foi aferido nos tubos.

## Experimento 2 - Range de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Seis concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram testadas (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 40 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). Este experimento contemplou réplicas (n = 3). O ensaio foi montado em tubos de vidro (10 x 200 mm) contendo 60 mL de suspensões de cianobactérias com concentração inicial de ~160 µg L<sup>-1</sup> de clorofila-*a*. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado na superfície e misturado com um bastão de vidro por 30 segundos; os tubos foram então incubados durante 24 horas sem iluminação direta. Após o tempo de incubação foram feitas amostragens, alíquotas de 5 mL, retiradas da subsuperfícies (± 10 cm) dos tubos, para determinar a eficiência fotossintética e a concentração da biomassa de cianobactérias. As leituras também incluíram amostras filtradas, objetivando identificar lise celular através da liberação de clorofila-*a* a na água. A concentração de clorofila-*a* e a eficiência do fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) (Genty et al., 1989) foram medidas usando um analisador de fitoplâncton PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). O pH também foi aferido nos tubos.

#### Experimento 3 - Floc & Sink

Com base no primeiro experimento, a dose de algicida  $(H_2O_2)$  de 20 mg L<sup>-1</sup> foi escolhida como dose efetiva. A dosagem do floculante PAC (8 mg L<sup>-1</sup>) e de lastro LMB (300 mg L<sup>-1</sup>) foram determinadas com base na concentração de P na coluna d'água e no sedimento (DE MAGALHÃES et al., 2017).

A dosagem de 20 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada sozinha e combinada com PAC (8 mg Al L<sup>-1</sup>) + LMB (0,3 g L<sup>-1</sup>). O experimento foi montado em triplicata em cilindros de acrílico contendo 1 L de suspensões de cianobactérias da Lagoa de Jacarepaguá. Testamos cinco tratamentos: 1) PAC 8 mg L<sup>-1</sup>, 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>, 3) LMB 300 mg L<sup>-1</sup>, 4) PAC+LMB, 5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB enquanto a sexta série (n = 3) permaneceu sem

tratamento (Controles). O  $H_2O_2$  foi adicionado primeiro, seguido pela adição de PAC e de uma pasta de LMB, produzida pela mistura de água da unidade amostral e o LMB, no topo dos cilindros. Posteriormente, as suspensões foram misturadas com uma vareta de vidro e, após 48 horas, amostras de 5 mL foram coletadas do topo e do fundo dos cilindros usadas para quantificar clorofila-*a* e  $\Phi_{PSII}$  (eficiência fotossintética) pelo analisador de fitoplâncton PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Estas mesmas amostras, após a avaliação de clorofila, foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 1,2 µm (85/70 BF, Macherey-Nagel) e avaliadas novamente, de modo a quantificarmos a clorofila dissolvida, proveniente de uma possível lise celular. Para análise de toxina, todo montante restante de água (± 950 ml) foi filtrado através de filtros de fibra de vidro de 1,2 µm (85/70 BF, Macherey-Nagel); o filtrado foi usado para análises de MC dissolvida, enquanto a biomassa sedimentada após aplicação dos tratamentos foi usada para quantificar MC intracelular. As amostras foram imediatamente congeladas e mantidas a -20°C até a análise.

## Análise de Toxinas

Antes das extrações, as biomassas foram liofilizadas (Sartorius GmbH, Alemanha). Utilizamos ~0,8 mg de biomassa para a análise das toxinas intracelulares. 2,5 mL de 75% (v/v) de metanol (MeOH) (Merck®) foram adicionados a biomassa em um tubo de vidro de 8 mL. Após agitação no vórtex por 15 segundos, elas foram colocadas em banho-maria (Buchi Heating Bath b-491) por 30 minutos a 60°C. As suspensões foram transferidas para novos tubos de vidro. Esta etapa de extração foi repetida mais duas vezes, mas desta vez com 2,0 mL de metanol 75% (v/v). Os novos tubos de vidro contendo 6,5 mL de extrato foram colocados no concentrador de amostras (Tecncal, TE-019). Após a secagem, o material foi ressuspenso com 2 mL de MeOH 100% (v/v), agitados em vórtex por 15 segundos, filtrados em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45 μm (Analítica, Brasil) em frascos de vidro âmbar para análise por LC-MS/MS. Se necessário, as amostras com altas concentrações de MC foram diluídas em metanol 100% v/v antes da reanálise. As amostras liofilizadas foram ressuspensas com 2 mL de MeOH (100%), agitadas em vórtice por 15 segundos, filtrados em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45 μm (Analítica, Brasil) em frascos de vidro âmbar para análise por LC-MS/MS. Se necessário, as amostras com altas concentrações de MC foram diluídas em metanol 100% v/v antes da reanálise. As amostras liofilizadas foram ressuspensas com 2 mL de MeOH (100%), agitadas em vórtice por 15 segundos, filtrados em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45 μm (Analítica, Brasil) em

frascos âmbar para análise de toxinas dissolvidas. As amostras foram então armazenadas em um freezer (-20°C) até a análise LC-MS.

A determinação da toxina nas amostras foi realizada por cromatografia líquidaespectrometria de massa (LC-MS) usando um sistema de HPLC série 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de ionização por eletrospray (ESI). A análise foi realizada com coluna Altus UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, partícula de 1,7 μm) e a fase móvel foi acetonitrila e água MilliQ acidificada com ácido fórmico a 0,1% e pH 3,2 (B), em eluição gradiente. A eluição gradiente foi realizada a uma taxa de fluxo de 300 μL min<sup>-1</sup> e seguiu um aumento linear, iniciando em 30 a 70% (A:B), em 1 minuto foi mantida a 65% (B), em 8 minutos 15% (B,) e em 10 min voltou à condição inicial (70% B) em 12 min. No detector de massas a voltagem utilizada foi positiva com a voltagem do capilar 3,5 KV, com detecção usando tune, a temperatura da fonte de 150 °C, gás de arraste nitrogênio aquecido a 450 °C, e fluxo de 900 L/hr na câmara e 40 L/hora no cone. Foram avaliados os seguintes íons precursores m/z íons 520 (MC-RR), 981 ([D-Asp<sup>3</sup>]-LR), 995 (MC-LR), 1002 (MC-LY) e 1045(MC-YR).

## Análise Estatística

One-way ANOVA foi utilizada para avaliar as diferenças na concentração de clorofila-a e MC entre os tratamentos no software SigmaPlot® 12.5. Procedimentos de comparação múltipla pairwise (Holm-Sidak) foram aplicados para distinguir as médias que eram significativamente diferentes (p < 0.05).

## RESULTADOS

## Range de PAC

No experimento testando diferentes doses de PAC, a suspensão de cianobactérias permaneceu dispersa e homogênea na coluna d'água mesmo após 2h de

incubação, conforme demonstrado no tubo sem tratamento (Fig. 1). A concentração de clorofila-*a* nos 5 mL do fundo dos tubos contendo PAC variou de 0 a 13 vezes mais do que nos 5 mL do fundo do tubo controle (Fig. 1). 8 mg L<sup>-1</sup> foi considerada a melhor dosagem, atingindo um alta concentração de biomassa no fundo do tubo, porém com baixa oscilação no pH e no  $\Phi_{PSII}$ . O pH diminuiu gradativamente com o aumento da dosagem das concentrações de PAC, a partir da dose de 8 mg L<sup>-1</sup>, atingindo 6,1 na concentração de 32 mg Al L<sup>-1</sup> (Fig. 1). Além disso, o  $\Phi_{PSII}$  apresentou aumento gradual em seus valores no topo dos tubos; no fundo, reduziu progressivamente nos tubos com PAC a partir de 4 mg Al L<sup>-1</sup>.

Baseado nesses resultados, sobretudo os dados de  $\Phi_{PSII}$  e pH, a dosagem de 8 mg L<sup>-1</sup> foi escolhida como a dosagem ideal para o experimento de *Kill, Floc & Sink*.



Figura 1 – Experimento Range de PAC

Legenda: Concentrações de clorofila-a ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) nos 5 mL superiores (barras cinza-claros) e 5 mL inferiores (barras cinza-escuro), eficiência do fotossistema II ( $\Phi$ PSII) no topo (círculos abertos) e fundo (preenchidos) e pH (triangulo aberto) de 60 mL de suspensões de cianobactérias da Lagoa de

Jacarepaguá incubadas por 2 horas na ausência (controle) ou presença do coagulante PAC (policloreto de alumínio) em cinco diferentes concentrações  $(1, 2, 3, 4 \text{ e} 5 \text{ mg Al L}^{-1})$ .

## Range de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Neste experimento, onde testamos diferentes dosagens do algicida  $H_2O_2$  em água coletada da lagoa de Jacarepaguá e biomassa dominada por *P. isothrix*, foi possível observar alterações na concentração de clorofila a partir da dose 10 mg L<sup>-1</sup>, enquanto alterações significativas no  $\Phi_{PSII}$  ocorreram a partir de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 2A, B). Com a aplicação de 10 mg L<sup>-1</sup>, observamos um aumento de 1.2 vezes na concentração de clorofila em relação ao controle (0 mg L<sup>-1</sup>), 20 mg L<sup>-1</sup> de 1.8 e 40 mg L<sup>-1</sup> de 1.7 vezes ( $F_{6,14} = 59,59$ ; p < 0,05) (Fig. 1A). Reduções significativas no  $\Phi_{PSII}$  foram registradas progressivamente nos tubos com concentrações entre de 2,5 e 20 mg L<sup>-1</sup> ( $F_{6,14} = 607$ ; p < 0,05) (Fig. 1B); as reduções variaram de 8,5% até 81%. 20 e 40 mg L<sup>-1</sup> afetaram o  $\Phi_{PSII}$  semelhantemente. Em relação a concentrações 0, 2,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 1C). Não observamos oscilação significativa do pH nesse experimento 7,2 (± 0,2). Baseado nesses resultados, a dosagem de 20 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi escolhida como a dosagem ideal para o experimento de *Kill, Floc & Sink*.

Figura 2 – Range de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Legenda: (A) Concentrações de clorofila-*a* (µg L<sup>-1</sup>), (B) eficiência do fotossistema II ( $\Phi$ PSII), (C) clorofila-*a* dissolvida (µg L<sup>-1</sup>) nos 5 mL da subsuperfícies de 60 mL suspensões de cianobactérias incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações (2,5; 5; 7,5; 10; 20; 40 mg L<sup>-1</sup>) do algicida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxido de hidrogênio) e na ausência, representada por 0 mg L<sup>-1</sup>. As barras de erro representam um desvio padrão (n = 3), e letras semelhantes indicam grupos homogêneos de acordo com o teste post-hoc de Holm-Sidak (p < 0,05).

#### Experimento Kill, Floc & Sink

A suspensão de cianobactérias neste experimento apresentou distribuição quase homogênea na coluna d'água, mesmo após 48h de incubação, conforme indicado no controle (Fig. 3). A concentração de clorofila no topo dos cilindros variou de 18,49 µg  $L^{-1}$  a 294,46 µg  $L^{-1}$  (Fig. 3). A adição de apenas PAC (8 mg  $L^{-1}$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg  $L^{-1}$ ) ou LMB (300 mg  $L^{-1}$ ) não alterou significativamente a concentração de clorofila de cianobactéria no topo dos cilindros (Fig. 3). A ação de redução de biomassa no topo só foi observada quando houve combinações entre PAC+LMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB; PAC+LMB apresentou 78,4% menos biomassa que o controle no topo, enquanto  $H_2O_2+PAC+LMB$  apresentou 85,7% de redução clorofila de cianobactérias ( $F_{5,12} = 6,22$ ; p < 0,05). Quanto ao pH, apenas os tratamentos contendo PAC apresentaram reduções significativas, permanecendo em ~ 6,4 ( $F_{5,12} = 6,22$ ; p < 0,05); PAC, PAC+LMB e  $H_2O_2+PAC+LMB$  apresentaram valores de pH semelhantes entre si e diferentes de controle,  $H_2O_2$  e LMB, que por sua vez foram semelhantes entre si.

Alterações significativas no  $\Phi_{PSII}$  só foram registrados nos tratamentos com  $H_2O_2$  ( $F_{5,12} = 54,07$ ; p < 0,05) (Fig. 3). Após 48h, o tratamento  $H_2O_2$  apresentou eficiência fotossintética de ~0,2. Já o tratamento  $H_2O_2$ +PAC+LMB apresentou valores de  $\Phi_{PSII}$  inferiores a 0,01. Nos demais tratamentos e controle o  $\Phi_{PSII}$  se manteve próximo a ~0,6 (± 0,1) (Fig. 3).

No fundo dos cilindros, só observamos aumento significativo da biomassa nos tratamentos PAC e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB, que se diferenciaram do controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e LMB; estes por sua vez, permaneceram semelhantes entre si e ao tratamento PAC+LMB (F<sub>5,12</sub> = 17,11; p < 0,05). As diferenças significativas apontadas pela *one-way* ANOVA estão indicadas na figura 3. O tratamento com PAC sozinho, sedimentou ~1971 µg L<sup>-1</sup> de clorofila, 21 vezes mais clorofila do que registrado no controle; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB sedimentou ~1591 µg L<sup>-1</sup> de clorofila, 17 vezes mais clorofila que o controle.

Figura 3 – Experimento Floc & Sink



Legenda: Concentrações de clorofila-a (µg L-1) nos 15 mL superiores (barras cinza claro superiores) e 15 mL inferiores (barras cinza escuro inferiores), eficiência do fotossistema II ( $\Phi$ PSII) no topo (círculos abertos ) e fundo (círculos preenchidos) e valores de pH (triângulos) de 1 L de suspensões de cianobactérias de Lagoa de Jacarepaguá incubadas por 48 horas na ausência (controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>), algicida (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>), (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>) e coagulante PAC combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>) ou em misturas ternárias de algicida, coagulante e lastro (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 3), e letras semelhantes indicam grupos homogêneos de acordo com o teste post-hoc de Holm-Sidak (p < 0,05).

Na avaliação da clorofila dissolvida, a concentração variou de 3,5 a 8,1  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de clorofila no topo e de 9,8 a 31,33  $\mu$ g L<sup>-1</sup> no fundo dos cilindros (Fig. 4). O tratamento PAC+LMB foi o único a apresentar clorofila dissolvida zero, tanto no topo quanto no fundo dos cilindros. PAC e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB só apresentaram clorofila dissolvida no topo; no controle e no tratamento com apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, só registramos

clorofila dissolvida no fundo. O tratamento LMB foi o único que apesentou clorofila dissolvida no topo e no fundo dos cilindros, sendo a concentração do topo ~ 8,0 µg L<sup>-1</sup> e no fundo ~24,6 µg L<sup>-1</sup>. Não houve diferenças estatísticas para clorofila dissolvida no topo ( $F_{5,12} = 2,7$ ; p > 0,05), porém registramos diferença para o fundo ( $F_{5,12} = 12,61$ ; p < 0,05).



Figura 4 – Experimento *Floc & Sink*, clorofila nas amostras filtradas.

Legenda: Concentrações de clorofila-a dissolvida ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) nos 15 mL superiores (barras cinza-claros) e 15 mL inferiores (barras cinzaescuros) de 1 L de suspensões de cianobactérias de Lagoa de Jacarepaguá incubadas por 48 horas na ausência (controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L-1), algicida (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>), (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>), e coagulante PAC combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>) ou em misturas ternárias de algicida, coagulante e lastro (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>, policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>, e bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 3), e letras semelhantes indicam grupos homogêneos de acordo com o teste posthoc de Holm-Sidak (p < 0,05).

## Efeitos nas concentrações de microcistinas

Após aplicação dos tratamentos, MCs foram detectadas dissolvidas apenas nas amostras do controle, na concentração total de  $1.24 \ \mu g \ L^{-1}$ , com presença das variantes - LY (0,37  $\mu g \ L^{-1}$ ), -RR (0,33  $\mu g \ L^{-1}$ ), -[D-Asp<sup>3</sup>] LR (0,31  $\mu g \ L^{-1}$ ) e -YR (0,22  $\mu g \ L^{-1}$ ) (Fig. 5). Embora potenciais produtores de MC tenham sido dominantes na água utilizada neste experimento, a concentração de MC intracelular esteve abaixo do limite de detecção. Vale ressaltar que a nossa metodologia de análise foi *target*, em busca dos íons precursores m/z 520 (MC-RR), 981 (MC-[D-Asp<sup>3</sup>]LR), 995 (MC-LR), 1002 (MC-LY) e 1045(MC-YR).



Figura 5 – Experimento *Floc & Sink*, avaliação das microcistinas dissolvidas.

Legenda: Concentrações médias de microcistinas e suas variantes dissolvidas na água ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) em 15 ml de 1 L de suspensões de cianobactérias de Lagoa de Jacarepaguá incubadas por 48 horas na ausência (controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L-1), algicida (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>), (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>), e coagulante PAC combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,3 mg L<sup>-1</sup>) ou em misturas ternárias de algicida, coagulante e lastro (peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg L<sup>-1</sup>, policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>).

## DISCUSSÃO

201

Este estudo testou se a técnica Kill, Floc & Sink seria capaz de induzir a morte, além de remover eficientemente a biomassa composta principalmente por P. isothrix, sem a liberação de MC, em água proveniente de uma lagoa costeira, rasa, hipereutrófica e tropical. Nossos resultados evidenciaram que a combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou, não apenas, reduções significativas da biomassa dispersa na água, mas também reduziu a eficiência fotossintética das células de cianobactérias a valores abaixo de 0,1, indicando inviabilidade fisiológica após 48 horas. O tratamento com apenas floculante (PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) também foi eficiente na remoção de biomassa, estando de acordo com o observado em estudos anteriores no mesmo sistema, quando a dominância era de Microcystis (DE MAGALHÃES et al., 2017b); entretanto, com valores de  $\Phi$ PSII de ~ 0,55, a biomassa permaneceu fisiologicamente viável após incubação, possibilitando uma possível recolonização da coluna d'água. Resuspensão de células de Planktothrix na coluna d'água, após precipitação usando coagulante e lastro, foi observado em estudos realizados em laboratório e até mesmo em intervenções realizadas no Lago De Kuil (MUCCI, 2019; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). Já o tratamento com PAC+LMB, sem a aplicação prévia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sedimentou 3 vezes menos biomassa, ao final de 48 horas, do que as unidades amostrais que continham  $H_2O_{2+}PAC+LMB$ , embora não tenham sido estatisticamente diferentes (p > 0.05); esse resultado sugere que, a eficácia da técnica de floculação e sedimentação pode ser maior devido à ação previa do algicida que inviabilizou as células de *Planktothrix*, impedindo a resuspensão destas ao longo do tempo de incubação. Quanto a avaliação de MC após aplicação dos tratamentos, todos os tratamentos testados reduziram a MC dissolvida de  $1.2 \ \mu g \ L^{-1}$  a níveis abaixo do limite de detecção.

Uma vez que a sensibilidade ao  $H_2O_2$  pode diferir entre cianobactérias (LUSTY; GOBLER, 2020) e entre cepas (DZIALLAS; GROSSART, 2011; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), testamos a sensibilidade de *P. isothrix* da Lagoa de Jacarepaguá a este algicida e previamente ao experimento com a técnica *Kill, Floc & Sink*. O objetivo desta etapa no estudo foi encontrar a dosagem mais efetiva à espécie e ao ambiente de origem da amostra.

Com exceção do controle, após 24h da aplicação, observamos aumento significativo na concentração de clorofila nas dosagens de  $H_2O_2$  acima de 10 mg L<sup>-1</sup>;

entretanto sem detecção de clorofila dissolvida para estas mesmas dosagens. Esse aumento nas medições de fluorescência na amostra integral não expressam, aqui, aumento de biomassa, mas são resultado da ação oxidativa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que promoveu desprendimento de ficobilissoma do fotossistema II, aumentando o sinal de fluorescência detectado pelo PHYTO-PAM (DRÁBKOVÁ et al., 2007). Além disso, a falta de fluorescência nas amostras filtradas de nosso experimento nas concentrações igual ou maiores que 7,5 mg L<sup>-1</sup>, não deve ser interpretada como indicativo de não lise celular, mas de que a dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicada foi suficiente, não apenas para causar lise, como também para destruir os constituintes celulares liberados dentro do tempo de incubação, nesse caso a clorofila (LIU et al., 2004). Essa afirmação tem respaldo baseado nas medições do  $\Phi_{PSII}$ , que evidenciaram reduções maiores que 50% no  $\Phi_{PSII}$ para as estas mesmas dosagens ( $\geq$  7,5 mg L<sup>-1</sup>). Em geral,  $\Phi_{PSII}$  reflete o estado fisiológico dos organismos fotossintéticos e é usado para demonstrar o dano do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao fotossistema de cianobactérias (DRÁBKOVÁ; ADMIRAAL; MARSÁLEK, 2007; DRÁBKOVÁ et al., 2007; PIEL et al., 2019).

Comparativamente, *P. isothrix* proveniente da Lagoa de Jacarepaguá, aparenta ter mais resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que *P. rubescens* de clima temperado; amostras com dominância de *P. rubescens* proveniente do Lago De Kuil apresentaram valores de  $\Phi_{PSII}$  zero após aplicação de dosagens em concentrações acima de 10 mg L<sup>-1</sup>; *P. rubescens* de amostras do Lago Rauwbraken, foram ainda mais susceptíveis, obtendo  $\Phi_{PSII}$  zerado em dosagem de 4 mg L<sup>-1</sup> (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). Entretanto, essas mesmas dosagens de 4 mg L<sup>-1</sup> não foi suficiente para reduzir a zero o  $\Phi_{PSII}$  de *P. agardhii* do Lago Koetshuis (MATTHIJS et al., 2012). Vale ressaltar que, fatores inerentes ao ambiente (ex., quantidade de matéria orgânica, pH, luminosidade) influenciam a ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando ou reduzindo seus efeitos (BAUZÁ et al., 2014; CRAFTON et al., 2019), contribuindo para os resultados observados nas populações de cianobactérias.

Embora os estudos acima mencionados sejam comparáveis, visto que o parâmetro de efetividade do  $H_2O_2$  nos organismos testados também foi o  $\Phi$ PSII, devemos considerar que o  $H_2O_2$  reagirá não apenas com a espécie-alvo, mas também com outros organismos da comunidade fitoplanctônica, sejam elas cianobactérias ou não. Além disso, a matéria orgânica e inorgânica, assim como as cianotoxinas, também reagem ao algicida, o que pode reduzir a efetividade do composto no grupo ou espéciealvo (BARRINGTON; REICHWALDT; GHADOUANI, 2013). Em biculturas contendo Microcystis e a clorofita Chlorella, a resistência de Microcystis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dobrou; aparentemente, a alta taxa de degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por Chlorella protegeu Microcystis contra o estresse oxidativo (WEENINK et al., 2021). A mesma dinâmica foi observada em testes com amostras do mar, onde a bactéria heterotrófica Alteromonas porece ter protegido Prochlorococcus do estresse oxidativo, degradando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MORRIS et al., 2011). A concentração de MC no ambiente é outra variável importante, uma vez que, também pode influenciar na ação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sob cianobactérias; Schuurmans et al. (2018), evidenciaram que MC interfere contra o estresse oxidativo  $H_2O_2$ em *Microcystis* (PCC 7806). Em nosso estudo, trabalhamos com água contendo população natural, e embora dominada por P. isothrix, havia a presença das cianobactérias Synechococcus nidulans, Aphanocapsa delicatissima e da alga verde Desmodesmus cuneatus; além disso, a Lagoa de Jacarepaguá possui grande quantidade de matéria orgânica em seu sedimento (até 30%), que pode, eventualmente, estar suspensa na coluna d'água devido a sua baixa profundidade associada a ação de ventos, além de suspensão por bioturbação (SANTOS et al., 2020); por último, nossas amostras continham, na forma dissolvida, aproximadamente 1.24  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de MC. Todos esses fatores podem ter, de alguma forma, minimizado os efeitos do H2O2 sob P. isothrix, aumentando a resistência da espécie-alvo ao composto testado.

Em geral, as intervenções em ambientes com recorrentes florações de direcionadas especificamente cianobactérias abrangem ações aos sintomas (cianobactérias), ou as causas (nutrientes) (LÜRLING; MUCCI, 2020). O direcionamento direto às cianobactérias é comumente feito de forma econômica com algicidas (JANČULA; MARSÁLEK, 2011); o problema com este tipo de abordagem é que algicidas geralmente ocasionam lise celular, promovendo liberação de nutrientes e cianotoxinas na coluna d'água (JONES, 1994; JANČULA; MARSÁLEK, 2011; COLOMA et al., 2017). Entretanto, os riscos provenientes do uso de algicida podem ser minimizados se, um método integrado com associação de um lastro com propriedades de adsorção de P for considerada (LÜRLING et al., 2020). Em geral, alguns adsorventes de P também tem capacidade de reduzir MC dissolvida no água (DAIL et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b; ARRUDA et al., 2021).

Em nosso estudo, ao testarmos a combinação do algicida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o floculante PAC e o lastro LMB (*Kill, Floc & Sink*), observamos que: primeiro, o processo fotossintético da biomassa foi afetado drasticamente em 48h; segundo, promoveu a remoção/sedimentação desta biomassa, além de reduzir as concentrações de MC dissolvidas. Com valores de  $\Phi_{PSII}$  inferiores a 0,1, a biomassa predominantemente composta por P. isothrix, permaneceu no fundo dos cilindros. O mesmo não foi observado no tratamento PAC+LMB, cuja concentração de clorofila no fundo foi 3 vezes menor do que quando associamos  $H_2O_2$  à técnica; estando viável fotossinteticamente, flotação de flocos da biomassa pode ocorrer, isso devido à bolhas de oxigênio geradas pela fotossíntese presas aos flocos (ELDRIDGE; HILL; GLADMAN, 2012); ou ainda, células podem escapar dos flocos de biomassa por conta de seu movimento, e associado a permeabilidade dos agregados celulares (GORCZYCA; GANCZARCZYK, 2001). Células de P. rubescens puderam ser removidas apenas com a ação combinada de floculante e lastro, tanto em testes de laboratório, quanto em intervenções in situ; entretanto, após 24h, grande parte dos filamentos retornam a coluna d'água (MUCCI, 2019; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). Espécies do gênero Planktothrix, como mencionado anteriormente, possuem adaptações fisiológicas e morfológicas que reduzem a eficácia da técnica de floculação e sedimentação (KROMKAMP et al., 2001; OBERHAUS et al., 2007). Por exemplo, em nossos experimentos, PAC apresentou valores de remoção de biomassa semelhantes ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB, porém com valor de  $\Phi_{PSII}$  similar ao controle; com  $\Phi_{PSII}$  de ~0,59, essa biomassa permaneceu fotossinteticamente ativa no fundo dos cilindros, o que nos leva a concluir que se fosse uma intervenção in situ, no caso da Lagoa de Jacarepaguá, um ambiente raso, a biomassa poderia permanecer viva no sedimento, ou retornar à coluna d'água em algum momento. Logo, apenas a remoção da biomassa de cianobactérias para o fundo do lago é ineficaz, trazendo a necessidade de que a biomassa removida esteja inviável fisiologicamente (morta), seja para ambientes rasos ou fundos.

Embora a técnica *Kill, Floc & Sink* possa ser efetiva, induzindo a morte e removendo a biomassa de cianobactérias para o fundo do ambiente, um avaliação das concentrações de MCs é extremamente necessária (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). Liberação de MC intracelulares na água após uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sozinho ou em associação com PAC e LMB, já foram reportadas para *Planktothrix* e *Microcystis* (MATTHIJS et al., 2012; ZHOU et al., 2013; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b); embora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja um forte oxidante, se comparado a outros algicidas, o que favoreceria a degradação de microcistinas dissolvidas (CORNISH; LAWTON; ROBERTSON, 2000; BANDALA et al., 2004). Em nossas análises identificamos quatro variantes de MC (-LY, -RR, -[D-Asp<sup>3</sup>] LR, -YR) totalizando em média 1,24 µg L<sup>-1</sup> de MC (todas as

unidades amostrais), apenas na forma dissolvida. Porém, 48h após aplicação, essas concentrações foram reduzidas em 100% em todos os tratamentos testados. Tal redução na concentração de MC é resultado não apenas da ação oxidativa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também da ação dos demais compostos aqui testados, combinados ou sozinhos; LMB possui grande capacidade de adsorver MC, sozinho (DAIL et al., 2020), ou associado ao PAC (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b; ARRUDA et al., 2021b). Outro fator que merece atenção é o mecanismo natural de adsorção de MC por material particulado em suspensão (LIU et al., 2008; WU et al., 2011; MAGHSOUDI et al., 2015), também já descrito para a Lagoa de Jacarepaguá (SANTOS et al., 2020). Esse mecanismo seria o responsável, por exemplo, pela redução das MCs no tratamento com apenas PAC, de acordo com o observado em nossos experimentos. Entretanto, mesmo com compostos que contribuem para redução de MCs dissolvidas, é preciso levar em consideração que, o tratamento pode não ser 100% eficaz na remoção, ou ainda não ter efeitos de redução. Testes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mesocosmos instalados no Lago Roth (NY, USA) e também intervenção no próprio lago, mostraram reduções parciais na concentração de MCs total; as reduções de MCs no mesocosmos foram maiores do que fora registrado para o lago (LUSTY; GOBLER, 2023). Já em testes laboratoriais com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Microcystis, 0,5nM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,017 mg  $L^{-1}$ ) aumentou em 18 vezes a concentração de MC-LR dissolvida na água em 48h; em 96h a concentração aumentou 20 vezes em relação ao momento inicial do experimento (ZHOU et al., 2013). Também em testes com água dos lagos De Kuil e Rauwbraken (Holanda), dominadas por P. rubescens, a aplicação de 5 mg  $L^{-1}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou significativamente a concentração de MC dissolvida na água (~16x); entretanto, quando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi associado a PAC+LMB, a concentração foi 60% menor do que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinho (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b). Importante ressaltar que a concentração inicial de MC para estes estudos é pelo menos 10 vezes maior que o registrado em nosso experimento; além disso, a concentração de MC intracelular estava abaixo do nosso limite de detecção (0,1 ng L<sup>-1</sup>) em nossas amostras, o que impossibilitaria o incremento significativo de MCs pós aplicação de  $H_2O_2$ , no caso de lise celular.

Outro parâmetro aferido neste estudo, que está relacionado indiretamente com lise celular é a concentração de clorofila dissolvida. De forma inesperada, os tratamentos com  $H_2O_2$  apresentaram concentrações variando de 0 a 5 µg L<sup>-1</sup> de clorofila dissolvida, valores inferiores ao observado no controle, por exemplo. Porém, sabe-se que a clorofila é bastante instável quando se trata de reter sua atividade antioxidante, quando exposta ao oxigênio, altas temperaturas ou ambientes claros (HSIAO et al., 2020). Logo, é esperado que o  $H_2O_2$ , se promoveu lise celular, também tenha contribuído para degradação da clorofila liberada na água após 48h; degradação de clorofila por  $H_2O_2$  foi observada após 20h pós exposição (SAMUILOV et al., 2004). Entretanto, em testes com sob *P. rubescens* e diferentes concentrações de  $H_2O_2$ , após 24h, a clorofila dissolvida representou de 17% a 60% do total de clorofila para a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020b).

## CONCLUSÃO

Nossos experimentos revelaram que o tratamento combinado de  $H_2O_2$ , PAC e LMB (técnica *Kill, Floc & Sink*) foi capaz de remover da coluna d'água a biomassa dominada por *P. isothrix,* além de ser eficaz em a manter precipitada no fundo das unidades amostrais após 48h. A baixa eficiência fotossintética das células de *P. isothrix,* pós-tratamento, impossibilitam a ressuspensão dos agregados celulares precipitados. Além disso, a técnica foi capaz de reduzir as concentrações de MC dissolvida em 100%. Entretanto, as divergências entre nossos resultados e a literatura existente, reforçam a necessidade de testar primeiro as intervenções selecionadas para cada ambiente, sempre considerando os organismos-alvo.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. M.; GLIBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. M. Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences. *Estuaries*, v. 25, n. 4, p. 704–726, ago. 2002.

ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

BAUZÁ, L. et al. Application of Hydrogen Peroxide to the Control of Eutrophic Lake Systems in Laboratory Assays. *Toxins*, v. 6, p. 2657–2675, 2014.

BANDALA, E. R. et al. Degradation of Microcystin-LR Toxin by Fenton and Photo-Fenton Processes. *Toxicon*, v. 43, n. 7, p. 829–832, jun. 2004. BARRINGTON, D.; 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, 2013.

CARMICHAEL, W. W. et al. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 7, p. 663–668, jul. 2001.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water. [s.l: s.n.]

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. 2005.

COLOMA, S. E. et al. Newly Isolated *Nodularia* Phage Influences Cyanobacterial Community Dynamics. *Environmental Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 273–286, jan. 2017.

COOKE, G. D. et al. Restoration and Management of Lakes and Reservoirs. [s.l: s.n.]

CORNISH, B. J. P. A.; LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J. Hydrogen Peroxide Enhanced Photocatalytic Oxidation of Microcystin-LR Using Titanium Dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 25, n. 1, p. 59–67, fev. 2000.

CRAFTON, E. A. et al. Modulating the Effect of Iron and Total Organic Carbon on the Efficiency of a Hydrogen Peroxide-Based Algaecide for Suppressing Cyanobacteria. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 230, p. 1–14, 2019.

DAIL, H. et al. Sorption of dissolved microcystin using lanthanum-modified bentonite clay Molecular diversity of polar cyanobacteria View project Diverse aspects of testate amoebae evolution View projectArticle in Journal of Aquatic Plant Management. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.researchgate.net/publication/337227788">https://www.researchgate.net/publication/337227788</a>>.

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*, v. 40, n. 1, p. 121–133, jan. 2017.

DRÁBKOVÁ, M. et al. Selective effects of H2O2 on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica*, v. 45, p. 363–369, 2007.

DRÁBKOVÁ, M.; ADMIRAAL, W.; MARSÁLEK, B. Combined exposure to hydrogen peroxide and light–selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental science & technology*, v. 41 1, p. 309–14, 2007.

DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic Microcystis Sp. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25569, 28 set. 2011.

ELDRIDGE, R. J.; HILL, D. R. A.; GLADMAN, B. R. A Comparative Study of the Coagulation Behaviour of Marine Microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 6, p. 1667–1679, dez. 2012.

GORCZYCA, B.; GANCZARCZYK, J. Fractal Analysis of Pore Distributions in Alum Coagulation and Activated Sludge Flocs. *Water Quality Research Journal*, v. 36, n. 4, p. 687–700, 1 nov. 2001.

HÄDER, D. P. *Photomovement*. 1° ed. Berlin, Germany: Springer Science and Business Media LLC, 1984.

HEISLER, J. et al. Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harmful Algae*, v. 8, n. 1, p. 3–13, dez. 2008.

HSIAO, C.-J. et al. Enhancement of the Stability of Chlorophyll Using Chlorophyll-Encapsulated Polycaprolactone Microparticles Based on Droplet Microfluidics. *Food Chemistry*, v. 306, p. 125300, fev. 2020.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, 2018.

JANČULA, D.; MARSÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, v. 85 9, p. 1415–22, 2011.

JEPPESEN, E. et al. Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation - The successful strategy varies with lake size and climate. Em: Hydrobiologia, 1, *Anais*...2007.

JEPPESEN, E. et al. Climate Change Effects on Runoff, Catchment Phosphorus Loading and Lake Ecological State, and Potential Adaptations. *Journal of Environmental Quality*, v. 38, n. 5, p. 1930–1941, set. 2009.

JONES, G. Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a Microcystis Aeruginosa Bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Water Research*, v. 28, n. 4, p. 871–876, abr. 1994.

KROMKAMP, J. C. et al. Changes in Photosynthetic Properties Measured by Oxygen Evolution and Variable Chlorophyll Fluorescence in a Simulated Entrainment Experiment with the Cyanobacterium Planktothrix Rubescens: *Aquatic Sciences*, v. 63, n. 3, p. 363–382, set. 2001.

LIU, G. et al. Adsorption of Microcystin LR and LW on Suspended Particulate Matter (SPM) at Different PH. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 192, n. 1–4, p. 67–76, jul. 2008.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 2, 2004.

LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, v. 158, 2020.

LÜRLING, M.; MUCCI, M. Mitigating Eutrophication Nuisance: In-Lake Measures Are Becoming Inevitable in Eutrophic Waters in the Netherlands. *Hydrobiologia*, v. 847, n. 21, p. 4447–4467, dez. 2020.

LÜRLING, M.; MUCCI, M.; WAAJEN, G. Removal of Positively Buoyant Planktothrix rubescens in Lake Restoration. *Toxins*, v. 12, n. 11, p. 700, 5 nov. 2020.

LUSTY, M. W.; GOBLER, C. The Efficacy of Hydrogen Peroxide in Mitigating Cyanobacterial Blooms and Altering Microbial Communities across Four Lakes in NY, USA. *Toxins*, v. 12, 2020. Disponível em:

<https://www.semanticscholar.org/paper/df169196cfa0a5333a052dc9975140cdedbfebf 3>.

LUSTY, M. W.; GOBLER, C. J. Repeated Hydrogen Peroxide Dosing Briefly Reduces Cyanobacterial Blooms and Microcystin While Increasing Fecal Bacteria Indicators in a Eutrophic Pond. *Journal of Environmental Sciences*, v. 124, p. 522–543, fev. 2023.

MAGHSOUDI, E. et al. Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. *Toxicon*, 2015.

MATTHIJS, H. et al. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water research*, v. 46 5, p. 1460–72, 2012.

MORRIS, J. J. et al. Dependence of the Cyanobacterium Prochlorococcus on Hydrogen Peroxide Scavenging Microbes for Growth at the Ocean's Surface. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, p. e16805, 3 fev. 2011.

MUCCI, M. N. T. From green to transparent waters: Managing eutrophication and cyanobacterial blooms by geo-engineering. 2019. Wageningen University, Wageningen, 2019. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.18174/471722">https://doi.org/10.18174/471722</a>. Acesso em: 19 jul. 2019.

NIXDORF, B.; MISCHKE, U.; RÜCKER, J. Phytoplankton Assemblages and Steady State in Deep and Shallow Eutrophic Lakes – an Approach to Differentiate the Habitat Properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia*, v. 502, n. 1–3, p. 111–121, jul. 2003.

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*, v. 97, p. 26–38, jun. 2016.

OBERHAUS, L. et al. Comparative Effects of the Quality and Quantity of Light and Temperature on the Growth of *Planktothrix Agardhii* and *P. Rubescens*<sup>1</sup>. *Journal of Phycology*, v. 43, n. 6, p. 1191–1199, dez. 2007.

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, fev. 2012.

PAERL, H. W. et al. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, v. 54, 2016.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 2009.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, 2012.

PIEL, T. et al. Suppressing Cyanobacteria with Hydrogen Peroxide Is More Effective at High Light Intensities. *Toxins*, v. 12, 2019. Disponível em: <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/27fc110bb8cca00b69180e8ab4f35e8d172bebc8">https://www.semanticscholar.org/paper/27fc110bb8cca00b69180e8ab4f35e8d172bebc8</a>>.

PREECE, E. P. et al. A Review of Microcystin Detections in Estuarine and Marine Waters: Environmental Implications and Human Health Risk. *Harmful Algae*, v. 61, p. 31–45, jan. 2017.

RÜCKER, J.; WIEDNER, C.; ZIPPEL, P. Factors controlling the dominance of Planktothrix agardhii and Limnothrix redekei in eutrophic shallow lakes. *Hydrobiologia*, v. 342/343, p. 107–115, 1997.

SAMUILOV, V. D. et al. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Induced Inhibition of Photosynthetic O <sub>2</sub> Evolution by Anabaena Variabilis Cells. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 8, p. 926–933, ago. 2004.

SANTOS, A. et al. Biotic and abiotic factors affect microcystin-LR concentrations in water/sediment interface. *Microbiological Research*, v. 236, 2020.

SCHEFFER, M. et al. ON THE DOMINANCE OF FILAMENTOUS CYANOBACTERIA IN SHALLOW, TURBID LAKES. *Ecology*, v. 78, n. 1, p. 272– 282, jan. 1997.

SCHUURMANS, J. M. et al. Microcystin interferes with defense against high oxidative stress in harmful cyanobacteria. *Harmful algae*, v. 78, p. 47–55, 2018.

VAN OOSTERHOUT, F. et al. Lanthanum in Water, Sediment, Macrophytes and Chironomid Larvae Following Application of Lanthanum Modified Bentonite to Lake Rauwbraken (The Netherlands). *Science of The Total Environment*, v. 706, p. 135188, mar. 2020.

WAAJEN, G. et al. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v. 97, 2016.

WANG, Z. et al. An Integrated Method for Removal of Harmful Cyanobacterial Blooms in Eutrophic Lakes. *Environmental Pollution*, v. 160, p. 34–41, jan. 2012.

WEENINK, E. et al. Interspecific protection against oxidative stress: green algae protect harmful cyanobacteria against hydrogen peroxide. *Environmental Microbiology*, v. 23, p. 2404–2419, 2021.

WU, X. et al. Mechanisms and Factors Affecting Sorption of Microcystins onto Natural Sediments. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 7, p. 2641–2647, 1 abr. 2011.

ZHOU, S. et al. Effects of Different Algaecides on the Photosynthetic Capacity, Cell Integrity and Microcystin-LR Release of Microcystis Aeruginosa. *Science of The Total Environment*, v. 463–464, p. 111–119, out. 2013.

# 7 ARTIGO: AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS FLOCULAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO NA REMOÇÃO DE FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS EFEITOS SOB MICROCISTINAS E SUA VARIANTES: UM ESTUDO EM MESOCOSMOS, LAGOA DE JACAREPAGUÁ

#### Resumo

A remoção de cianobactérias da coluna d'água utilizando uma combinação de uma baixa dose coagulante (cloreto de polialumínio, PAC - 'Floc') e um lastro capaz de se ligar ao fosfato (bentonita modificada com lantânio, LMB - 'Sink / Lock') têm sido usados com sucesso para controlar a proliferação de cianobactérias e a eutrofização. Entretanto, a eficiência da técnica pode ser reduzida de acordo com o sistema e espécie/cepa de cianobactéria. Em mesocosmos, testamos variações da técnica de floculação e sedimentação objetivando aumento de efetividade de remoção de cianobactérias (Algicida [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + PAC+LMB e PAC+LMB + uma reaplicação). A técnica Floc & Lock foi readequada para atender a particularidades da Lagoa de Jacarepaguá; sistema raso, em estado hipertrófico e atualmente dominada por Planktothrix isothrix. Nossos resultados evidenciaram que ambos os tratamentos testados foram eficientes, removendo, após 28 dias, quantidades semelhantes de biomassa da coluna d'água (92-97%) e MCs intracelulares (95-100%), sem liberação de MCs na água. Entretanto, não observamos aumento da eficiência da técnica de floculação e sedimentação pelo uso prévio do algicida (tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB) ou ainda pela reaplicação de nova dosagem de PAC+LMB. Efeitos do confinamento sob a população de cianobactérias foram observadas. Em mesocosmos que não receberam qualquer tipo de intervenção (Controles), registramos reduções significativas no ΦPSII e clorofila de cianobactérias; atribuímos esse efeito aos elementos traços potencialmente tóxicos contidos em altas quantidades no sedimento da lagoa (ex. Zn e Cd), que passaram a ter maior interação com a coluna d'água após o isolamento das unidades amostrais e podem ter afetado fisiologicamente o fitoplâncton. Dessa forma, concluímos que, embora a técnica de floculação e sedimentação tenha sido eficiente na remoção de P. isothrix, MCs intracelulares e sem liberação de MCs na água, o uso adicional prévio de H2O2 e também a reaplicação de nova dosagem de PAC e LMB foram desnecessárias; o que

torna a intervenção de floculação e sedimentação ainda menos onerosa para aplicação em larga escala. O possível efeito tóxico dos metais traços contidos no sedimento, por sua vez, podem ter contribuído para a redução da biomassa de cianobactérias, porém não inviabilizaria sua aplicação em larga escala no sistema estudado.

## INTRODUÇÃO

Lagoas costeiras desempenham um papel crucial na regulação do transporte, reciclagem e armazenamento de nutrientes, controlando os fluxos que ocorrem na interface entre os ecossistemas terrestres e marinhos (KJERFVE, 1994; KNOPPERS; KJERFVE, 1999). No entanto, o crescimento populacional desordenado, a poluição resultante do descarte inadequado de resíduos, a eutrofização decorrente da atividade humana e a expansão desenfreada das áreas urbanas têm exercido impactos altamente negativos sobre esses sistemas aquáticos (BRUUN, 1994; KJERFVE, 1994; HÅKANSON; BRYHN, 2008). A eutrofização, em particular, surge como um dos problemas mais significativos afetando a qualidade da água em âmbito global (DOWNING, 2014). Esse processo desencadeia o crescimento massivo de cianobactérias (florações), comprometendo a fauna aquática e, de maneira alarmante, a saúde humana devido ao potencial de contaminação por cianotoxinas (HUISMAN et al., 2018; CHORUS; WELKER, 2021). Dentre essas cianotoxinas, destaca-se o hepatopeptídeo microcistina (MC), que são amplamente disseminadas em sistemas aquáticos pelo mundo (SVIRČEV et al., 2019; CHORUS; WELKER, 2021). MCs, em geral, inibem a proteína fosfatase e induz estresse oxidativo, genotoxicidade e disfunção dos hepatócitos, resultando em danos hepáticos (MACHADO et al., 2018; CHORUS; WELKER, 2021).

Embora a abordagem mais coerente para atenuar a eutrofização e seus efeitos seja a redução da entrada externa de nutrientes (PAERL et al., 2016; HUISMAN et al., 2018), essa medida é particularmente desafiadora para países não ricos. Nesses países, os sistemas de tratamento de esgoto, sobretudo o processo de coleta, são ineficientes, demandando uma onerosa atualização (VAN LOOSDRECHT; BRDJANOVIC, 2014,

2014). Adicionalmente, dependendo do estado trófico do sistema aquático, é necessário adotar estratégias complementares para controlar a carga interna de nutrientes e acelerar a restauração do ecossistema (COOKE et al., 2016). Nesse contexto, a técnica de coagulação e precipitação de cianobactérias e fósforo (P) surgem como ferramentas promissoras para gerenciar a eutrofização e seus efeitos indesejados (LÜRLING et al., 2020). Nessa técnica, tanto as células de cianobactérias quanto o P são removidos da coluna d'água, se ligando ao lastro e precipitando no sedimento. É importante ressaltar que a etapa de coagulação é um ponto crítico, uma vez que o coagulante pode induzir estresse fisiológico ou químico nas membranas celulares, potencialmente resultando na liberação de toxinas intracelulares e fósforo na água (LIU et al., 2004; SUN et al., 2012; MIRANDA et al., 2017). Técnicas de coagulação e sedimentação se apresentam como uma alternativa econômica e segura, dependendo das escolhas de coagulantes e compostos de lastro (LÜRLING et al., 2020); testes de laboratório mostraram que a técnica pode realizar remoção de biomassa sem lise celular (MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019; LÜRLING et al., 2020; ARRUDA et al., 2021); embora haja registro de lise celular, dependendo do coagulante e dosagens utilizados, e até mesmo da espécie/cepa dominante no sistema (MIRANDA et al., 2017; MUCCI et al., 2017; LURLING; MUCCI; WAAJEN, 2020). Nesse mesmo sentido, o uso conjunto do lastro pode ainda adsorver MCs já dissolvida ou liberadas por lise (DAIL et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020; ARRUDA et al., 2021). É importante ressaltar que, as particularidades ambientais, as espécies, e até mesmo as cepas em floração devem ser cuidadosamente consideradas e avaliadas previamente para determinar as combinações e dosagens ideais desses compostos (NOYMA et al., 2017). Quando necessário, medidas adicionais, ou métodos integrados à técnica de floculação e sedimentação, devem ser considerados (ex., dragagem, remoção de peixes, algicidas, reaplicação) (WANG et al., 2012; MUCCI, 2019; LÜRLING et al., 2020, 2023)

A Lagoa de Jacarepaguá, lagoa costeira de água salobra, localizada na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), tem sofrido com o elevado aporte de nutrientes por descarte de esgoto (resíduos domésticos e industriais), promovendo um aporte anual de aproximadamente 55t de esgoto não tratado; a lagoa recebe 165 kg dia<sup>-1</sup> e possui carga interna de 751 µg P g<sup>-1</sup> em seus sedimentos (MERCEDES, 2020). Como resultado do processo de eutrofização, florações de cianobactérias são registradas desde 1986 na Lagoa de Jacarepaguá (SAIEG-FILHO, 1986; GOMES et al., 2009); sendo historicamente dominada por *Microcystis aeruginosa*, as cianobactérias podem atingir até 90% da biomassa total do fitoplâncton (FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; GOMES et al., 2009). Entretanto, dados mais recentes mostram a alteração da dominância da espécie dominante para *Planktothrix isothrix* (Capítulo II). MCs na Lagoa de Jacarepaguá foram detectados em águas superficiais, zooplâncton e tecidos de peixes (FREITAS DE MAGALHÃES; MORAES SOARES; AZEVEDO, 2001; FERRÃO-FILHO; DOMINGOS; AZEVEDO, 2002; MAGALHÃES et al., 2003; GOMES et al., 2009; HAUSER-DAVIS et al., 2015). Embora testes laboratoriais de curto prazo com a técnica de floculação e sedimentação, utilizando água da Lagoa de Jacarepaguá, mostraram resultados promissores na remoção de cianobactéria e P (DE MAGALHÃES et al., 2017, 2019), uma avaliação dos efeitos da técnica sob populações de *Planktothrix* e nas concentrações de MCs ainda não foram exploradas, bem como o uso de métodos integrados.

Nosso experimento em mesocosmos contemplou variações da técnica de floculação e sedimentação, e baseado em estudos prévios hipotetizamos que estas: i) remove a biomassa composta predominantemente de *P. isothrix* da coluna d'água; ii) remove MCs intracelulares sem aumento dos níveis da MCs dissolvidas na água; ii) não há ressuspensão/recolonização pela espécie dominante após aplicação das técnicas.

## MATERIALS AND METHODS

## Área de Estudo

A Lagoa de Jacarepaguá faz parte de um complexo lagunar costeiro localizado no Rio de Janeiro, RJ, Brasil (22°59'00,4″ S, 43°24'36,2″ W). É uma lagoa rasa (profundidade média das estações de coleta 1,4 m), oligohalina (0,8–9,0), com águas quentes (26 °C), turvas (zona eufótica corresponde a 57% da coluna d'água), alcalinas (8,1), baixa concentração de oxigênio no hipolímnio (3 mg L<sup>-1</sup>), elevado tempo de residência (77 dias), com uma alta concentração de P na coluna d'água (1260  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e no sedimento (751  $\mu$ g P g<sup>-1</sup>) e frequentes florações de cianobactérias, classificando-a como um sistema hipertrófico, de acordo com Nürnberg, 1996 (MERCEDES, 2020). A lagoa de Jacarepaguá possui a maior área de drenagem da região (102,8 km<sup>2</sup>); estes rios cortam grande parte dos bairros de Jacarepaguá e adjacências, trazendo em suas águas grande quantidade de sedimentos, resíduos industriais e domésticos o que contribuiu para seu atual estado trófico (GOMES et al., 2009)

## Produtos químicos Materiais

O coagulante PAC (policloreto de alumínio;  $Al_n(OH)_mCl3_{n-m}$ , r ~1,37 kg L<sup>-1</sup>, 9,5% Al, 21,0% Cl) foi obtido da Purewater Efluentes (São Paulo, Brasil). O algicida  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio;  $H_2O_2$ , r ~1,130 kg L<sup>-1</sup>,30%) foi adquirido da Isofar Industria e Comercio de Produtos Químicos (Rio de Janeiro, Brasil). A bentonita modificada com lantânio Phoslock<sup>®</sup> (LMB) foi obtida da HydroScience (Porto Alegre, Brasil). LMB foi usado como lastro.

## Experimentos de floculação e sedimentação

O experimento foi realizado em outubro de 2022, com a instalação de 12 mesocosmos cilíndricos em plástico transparente de 0,3 µm de espessura. Cada unidade experimental (mesocosmos) apresentava ~90cm de diâmetro x 5 m de profundidade, com volume aproximado de 3.183 litros. Anéis de arame (14mm) revestidos com PVC foram fixados na parte externa de cada unidade amostral, distribuídos a cada 1,5 m para evitar que o plástico colabasse. As unidades amostrais eram abertas na parte superior e inferior, sendo fixados ao sedimento através de um aro dentado de alumínio, permitindo dessa forma, que ocorressem comunicação entre o sedimento e a coluna d´água. Os

mesocosmos foram separados em dois flutuadores distintos, dispostos a aproximadamente 5 m de distância um do outro, contendo seis mesocosmos em cada píer (Figura 1).



Figura 1 - Representação esquemática da estrutura e alocação dos mesocosmos na Lagoa de Jacarepaguá.

Legenda: (A) Representação esquemática da organização do Píer flutuante; (B) representação da unidade amostral, mesocosmos; (C, D) imagens do píer flutuador; (E) imagem da estrutura das unidades amostrais. Fonte: próprio autor.

Com base nos experimentos descritos e discutidos no capítulo VI dessa tese, a dose de coagulante (PAC) de 8 mg de Al L<sup>-1</sup> e a dosagem do algicida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de 10 mg L<sup>-1</sup> foram utilizadas para o experimento em mesocosmos. A dosagem de lastro (LMB 0,4 g L<sup>-1</sup>) levou em consideração a fração biodisponível de P para o sistema, obtida pela soma da quantidade de fósforo presente nos primeiros 10 cm de sedimento (camada de troca entre o sedimento e a coluna d'água) e a fração encontrada na coluna d'água. O

experimento foi realizado em quadruplicatas. Testamos 2 tratamentos: 1) PAC+LMB, 2)  $H_2O_2+PAC+LMB$ , enquanto a terceira série (n = 4) permaneceu sem tratamento (Controle). No primeiro tratamento proposto, combinando floculante e lastro (*Floc & Lock*), o PAC foi adicionado primeiro, seguido pela adição imediata de uma pasta (água da unidade amostral + LMB) composta de LMB e água da própria unidade amostral. No segundo tratamento proposto (*Kill, Floc & Lock*), primeiro foi aplicado o  $H_2O_2$  seguido por homogeneização da unidade amostral e em seguida, o PAC foi adicionado primeiro, seguido pela adição imediata da pasta composta de LMB e água da própria unidade amostral. Posteriormente, as suspensões foram misturadas com auxílio do disco de Secchi.

## Amostragem

As amostragens ocorreram em todas as unidades amostrais antes da aplicação dos tratamentos, correspondendo ao tempo zero (T0). O experimento teve duração de 28 dias e teve o total de 6 amostragens ao longo desse período (T1, 24 horas; T3, 3 dias; T7, 7 dias; T15, 15 dias; T21, 21 dias e T28, 28 dias após o tratamento). Amostragens também foram realizadas na lagoa, ao lado dos flutuadores, 2 amostras para cada píer. Para o tratamento PAC+LMB, no 15° dia, foi realizada reaplicação de PAC 2 mg Al L<sup>-1</sup> e LMB 0.1 g L<sup>-1</sup>: a reaplicação ocorreu objetivando sedimentar a biomassa restante nas unidades amostrais e reduzir ainda mais o P da coluna d'água. A dosagem aplicada esteve relacionada com a quantidade de clorofila de cianobactérias e P registradas nas medições anteriores a T15. Em cada um dos tempos de amostragem mencionados acima, foram coletadas amostras do topo e do fundo dos mesocosmos, neste último caso com auxílio de garrafa de Van Dorn. 500 mL de amostra foram filtrados através de filtros de fibra de vidro de 1,2  $\mu$ m (85/70 BF, Macherey-Nagel) para quantificar MCs. Os filtros foram usados para quantificar a MC intracelular, e o filtrado foi usado para quantificar a MC extracelular. As amostras de filtro e filtrado foram imediatamente congeladas e mantidas a -20°C até a análise. Amostras de 5 mL foram usadas para quantificar clorofila-a e ΦPSII pelo analisador de fitoplâncton PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). As amostras para análise do fitoplâncton foram coletadas com garrafa de van Dorn em cada 0,5m em toda a extensão da zona eufótica e integradas em um recipiente, de onde foram retiradas alíquotas de 30 mL para o fitoplâncton para posterior contagem. A contagem da comunidade fitoplanctônica foi realizada pela equipe do Laboratório de Ficologia do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Extração de microcistinas

Antes das extrações, os filtros e filtrados foram liofilizados (Sartorius GmbH, Alemanha). Para a análise das toxinas intracelulares, 2,5 mL de 75% (v/v) de metanol (MeOH) (Merck®) foram adicionados aos filtros em um tubo de vidro de 8 mL. Após agitação no vórtex por 15 segundos, elas foram colocadas em banho-maria (Buchi Heating Bath b-491) por 30 minutos a 60 °C. As suspensões foram transferidas para novos tubos de vidro. Esta etapa de extração foi repetida duas vezes, mas desta vez com 2,0 mL de metanol 75% (v/v). Os novos tubos de vidro contendo 6,5 mL de extrato foram colocados concentrador de amostras (Tecncal, TE-019). Após a secagem, foram ressuspensos com 2 mL de MeOH 100% (v/v), agitados em vórtex por 15 segundos, filtrados em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45 µm (Analítica, Brasil) em frascos de vidro âmbar para análise por LC-MS. Se necessário, as amostras com altas concentrações de MC foram diluídas em metanol 75% v/v antes da reanálise. As amostras liofilizadas foram ressuspensas com 2 mL de MeOH (100%), agitadas em vórtice por 15 segundos, filtradas em filtros de seringa de membrana PVDF 0,45 µm (Analítica, Brasil) em frascos âmbar para análise de toxinas dissolvidas. As amostras foram então armazenadas em um freezer (-20 °C) até a análise LC-MS.

## Análise de microcistinas

A determinação da toxina nas amostras foi realizada por cromatografia líquidaespectrometria de massa tandem (LC-MS) usando um sistema de HPLC série 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de ionização por eletrospray (ESI). A análise foi realizada com coluna Luna C18 ( $150\times2$ mm; partículas de 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) e a fase móvel foi ácido fórmico 0,1% e acetonitrila, em eluição gradiente. A eluição gradiente foi realizada a uma taxa de fluxo de 300 µL min<sup>-1</sup> e seguiu um aumento linear de 10 a 90% B em 15 min, depois foi mantida a 90% B por 2 min e voltou à condição inicial (10% B) em 12 min. Os experimentos de MS realizados usaram um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (QqQ) API 365 (AB Sciex, Concord, ON, Canadá) equipado com uma fonte de spray de íon turbo no modo selecionado. Foi avaliado os seguintes íons precursores m/z 519 (RR), 910 (LA), 986 (LF), 995 (LR), 1025 (LW), 1045 (YR), 512 ([D-Asp3] RR), e 981 ([D-Asp3] LR).

#### Análise Estatística

As análises estatísticas descritivas, *t-test*, ANOVA e o Modelo Linear Misto (LMM) foram realizadas no software RStudio®, com os pacotes "ggpubr", "rstatix", "lme4", "lmerTest" e "emmeans". No LMM usado, as variáveis de respostas, foram modeladas em função do Tempo, Tratamento e a interação entre eles. Além disso, foi incluído um efeito aleatório para a variável chamada "Subject", representada pelas réplicas, para levar em consideração a dependência dos dados observados.

## RESULTADOS

## Clorofila

A clorofila de cianobactérias, no início do experimento (T0), apresentava uma concentração média de 164 ( $\pm$  16,5) µg L<sup>-1</sup> na superfície, enquanto no fundo, a concentração foi de 90 ( $\pm$  21) µg L<sup>-1</sup>. O LMM indicou efeito das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles no que tange remoção de biomassa, ou seja, para a variação na concentração de clorofila aferida no topo e fundo das unidades amostrais (Tab.1).

Tabela 1 – Resultado da análise de Variância para os dados de concentração de clorofila das amostras de topo e fundo dos mesocosmos realizado Lagoa de Jacarepaguá.

	Clorofila Topo		Clorofila Fundo	
	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Tempo	85.01	< 0.05	35.66	< 0.05
Tratamento	58.12	< 0.05	38.02	< 0.05
Tempo:Tratamento	7.22	< 0.05	7.35	< 0.05

Legenda: Resultado da análise de Variância com o método de Satterthwaite dos dados de concentração de clorofila das amostras de topo e fundo dos mesocosmos realizado na Lagoa de Jacarepaguá.

Após 24h da aplicação dos tratamentos (T1), a clorofila medida no topo das unidades amostrais dos tratamentos PAC+LMB e  $H_2O_2+PAC+LMB$  reduziu significativamente (p < 0,05) (Fig. 2); em PAC+LMB a redução foi de 92%, enquanto  $H_2O_2+PAC+LMB$  foi de 97%. A lagoa também apresentou oscilação significativa na clorofila do topo, com 40% de redução; o Controle não apresentou variações significativas (p > 0,05). A partir de T3, observamos um leve aumento nas concentrações de clorofila no topo das unidades amostrais com tratamento PAC+LMB; essa tendência de aumento seguiu até o fim do experimento (T28), onde a concentração de clorofila foi de 42,15 ( $\pm$  24) µg L<sup>-1</sup>. Assim, o tratamento PAC+LMB apresentou

redução final de biomassa no topo das unidades amostrais de 75% em relação a T0 (p < 0,05) e um aumento de 64% em relação ao Controle em T28 (p > 0,05) (Fig. 3a, b). O tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou tendencia de aumento em sua clorofila a partir de T7 até T21, seguido por redução em T28; finalizando o experimento com 85% de redução de biomassa no topo das unidades amostrais em relação a T0 (p < 0,05) e um aumento de 8,9% em relação ao Controle em T28 (p > 0,05) (Fig. 3a, b). Na lagoa, a clorofila também apresentou alterações significativas, totalizando em T28, 74% de redução da clorofila na superfície em relação a T0 (p < 0,05), e um aumento de 166% em relação ao controle em T28 (p > 0,05) (Fig. 3a, b). O Controle também apresentou tendência de redução na clorofila de cianobactérias ao longo do experimento, totalizando uma redução final de 84% em relação a T0.

No fundo dos mesocosmos, em T1, as oscilações significativas na clorofila de cianobactérias ocorreram apenas nos tratamentos PAC+LMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB, com reduções de 85% e 88%, respectivamente (p < 0,05) (Fig. 3, 4). A partir de T7, observamos um leve aumento na biomassa nestes mesmos tratamentos, porém ainda com valores abaixo do registrado em T0. PAC+LMB apresentou uma redução de clorofila final no fundo das unidades amostrais de 74% em relação a T0 (p < 0,05), e um aumento de 1,5% em relação ao Controle em T28 (p > 0,05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou redução final de 73% em relação a T0 (p < 0,05) e 9% em relação ao Controle em T28 (p > 0,05); e 9% em relação ao Controle em T28 (p > 0,05) (Fig. 3). Já a Lagoa, apresentou uma redução de clorofila final no fundo das unidades amostrais de 46% em relação a T0 (p < 0,05), e um aumento de 118% em relação ao Controle em T28

Figura 2 - Concentrações de clorofila-*a* de cianobactérias (µg L<sup>-1</sup>) no experimento de mesocosmos realizado na Lagoa de Jacarepaguá



Legenda: Concentrações de clorofila-*a* de cianobactérias ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) no topo e no fundo dos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4).

Figura 3 - Variação final média de clorofila-*a* de cianobactérias (%) no experimento de mesocosmos realizado na Lagoa de Jacarepaguá



Legenda: Variação final média de clorofila-*a* de cianobactérias (%) no topo e no fundo dos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T28) e tempo inicial (T0); \* representa diferenças significativas na concentração de clorofila de cianobactérias (p < 0,05). (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e Lagoa no fim do experimento (T28); as letras semelhantes indicam grupos homogêneos na concentração de clorofila de cianobactérias (p < 0,05).
As medições de **PPSII** evidenciaram os efeitos fisiológicos dos tratamentos na comunidade de cianobactérias (Fig. 4). 24h após a aplicação dos tratamentos (T1), enquanto Controle, PAC+LMB e Lagoa tinham valores de ΦPSII de ~0,57, T3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou valores zero. Em 72h após aplicação, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou atividade fotossintética média de 0,39, enquanto Controle, PAC+LMB e Lagoa apresentaram a média de 0,61. Em T7 a média de ФРSII do Controle, PAC+LMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB foram semelhantes, ~0,55. Em T15, enquanto a Lagoa apresentava  $\Phi$ PSII de ~0,49, todas as unidades amostrais do experimento, incluindo Controles, apresentaram eficiência fotossintética zero. Nas medições seguintes até o fim do experimento todas as unidades amostrais mantiveram  $\Phi$ PSII zero. Na Lagoa, os valores de  $\Phi$ PSII mantiveram a média de 0,46.

Nas amostras de fundo dos mesocosmos e Lagoa, a média de  $\Phi$ PSII inicial era de ~0,04. Em T1 e T3, enquanto a Lagoa manteve a média de  $\Phi$ PSII ~0,3, todas as unidades amostrais do experimento apresentam valor zero. Entre T7 e T28 as leituras de  $\Phi$ PSII para as unidades amostrais e Lagoa foram de zero.

Figura 4 – Evolução da eficiência fotossintética de cianobactérias no experimento em mesocosmos realizados na Lagoa de Jacarepaguá



Legenda: Variação da eficiência fotossintética de cianobactérias no topo e no fundo dos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4).

#### 3.2 Biovolume de Cianobactérias

O biovolume fitoplanctônico da Lagoa de Jacarepaguá, ao iniciarmos o experimento, era composto principalmente por cianobactérias, sendo *Planktothrix cf. isothrix* (99,68%) e *Microcystis aeruginosa* (0,21%) os gêneros mais representativos. *Synechococcus nidulans* e *Chroococcus minimus* também estavam presentes, mas somadas representavam menos de 0,1%. O biovolume total inicial de cianobactérias foi de ~ 32,76 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> (T0); a variação do biovolume durante o experimento, assim como a abundância relativa de cada espécie, pode ser visualizada na figura 5. Ao fim do experimento (T28), o biovolume total final de cianobactérias no Controle foi de ~ 15,3 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>, o tratamento PAC+LMB apresentou biovolume de 5,86 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>.

Figura 5 - Evolução do biovolume e da abundância relativa de cianobactérias durante o experimento de mesocosmos realizado no Lagoa de Jacarepaguá.



Legenda: Evolução do biovolume e da abundância relativa de cianobactérias para as amostras do topo dos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4). Não foram coletadas amostras em T3 para essa análise.

O LMM evidenciou efeitos das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles, para cada uma das espécies de cianobactérias, exceto *M. aeruginosa* (Tab. 2).

Tabela 2 – Resultado da análise de variância dos dados de Biovolume de cianobactérias das amostras de topo do experimento do experimento em mesocosmos realizado na Lagoa de Jacarepaguá.

	Tempo		Tratamento		Tempo:Tratamento	
	F value	P(>F)	F value	P(>F)	F value	P(>F)
C. minimus.	3.97	< 0.05	3.30	< 0.05	1.86	< 0.05

M. aeruginosa	9.186e-06	< 0.05	0.69	> 0.05	1.22	> 0.05
P. isothrix	2.2e-16	< 0.05	4.233e-12	< 0.05	1.815e-08	< 0.05
S. nidulans	0.54	> 0.05	4.17	< 0.05	0.76	> 0.05

Legenda: Resultado da análise de variância com o método de Satterthwaite dos dados de Biovolume de cianobactérias das amostras de topo do experimento de mesocosmos realizados na Lagoa de Jacarepaguá.

P. isothrix, espécie mais representativa durante o experimento, apresentou reduções significativas imediatamente após aplicação dos tratamentos (T1), sendo registrado 91,6% em PAC+LMB e 98,6% em  $H_2O_2$ +PAC+LMB (P < 0,05) (Fig. 5); M. aeruginosa apresentou reduções de 91% em PAC+LMB e 93,3% em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB (P > 0.05). Entretanto, reduções no biovolume de *P. isothrix* e *M. aeruginosa* também foram observadas no Controle, 64% e 97,3%, respectivamente; na Lagoa, P. isothrix apresentou redução de 45% e *M. aeruginosa* surgiu nas amostras com 0,04 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> de biovolume (Fig. 5). Em T7, as unidades amostrais com tratamentos apresentaram, pela primeira vez desde a aplicação, aumento do biovolume de P. isothrix, porém a população ainda permaneceu com biovolume menor do que em T0; PAC+LMB apresentou um acumulado de remoção de 79,8%, enquanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB de 90%. A população de M. aeruginosa também apresentou crescimento, 2,5 vezes em PAC+LMB, e 19 vezes em  $H_2O_2$ +PAC+LMB, em relação a TO. Nas amostragens seguintes, a população de *P. isothrix* seguiu tendência de redução em todas as unidades amostrais e Lago até o fim do experimento; PAC+LMB apresentou uma redução total final de 16 vezes em relação a T0 (p < 0.05) e 3 vezes em relação ao Controle em T28  $(p > 0.05; Fig. 6); em H_2O_2+PAC+LMB$  as reduções foram de 52,6 vezes em relação a T0 (p < 0,05) e 0,1 vezes em relação ao Controle em T28 (p > 0,05; Fig. 6). Já M. aeruginosa apresentou em PAC+LMB um aumento de 54 vezes da população em relação a T0, totalizando 1 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> de biovolume (p > 0.05), e aumento de 1.6 vezes em relação ao Controle em T28 (p > 0,05; Fig. 6). Em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB, registramos um aumento de 34 vezes da população de *M. aeruginosa* em relação a T0 (p > 0.05), mas com uma redução de 0.8 vezes em relação ao Controle em T28, totalizando 0,6  $mm^{3} L^{-1}$  de biovolume (p > 0,05; Fig. 6).

A população de *C. minimus*, foi a única da comunidade que apresentou incremento significativo de biovolume ao fim do experimento (T28), em relação ao Controle e em ambos os tratamentos testados; em PAC+LMB o incremento foi de 28

vezes, enquanto em  $H_2O_2$ +PAC+LMB o incremento total final foi de 39 vezes, também em relação ao Controle (Fig. 6).





Legenda: Variação final média do biovolume de cianobactérias (%) no topo dos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T27) e tempo inicial (T0); (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e Lagoa no fim do experimento (T28).

## 3.4 Microcistinas e suas variantes

Embora as medições das concentrações de MC e suas variantes terem sido realizadas para as amostras de topo e fundo, intra e extracelulares, as análises em LC-MS só detectaram MC nas amostras da porção intracelular.

O LMM evidenciou efeitos das variáveis Tempo e Tratamento, bem como interação entre eles, para a concentração de MC do topo das unidades amostrais e da lagoa (Tab. 3). Nas amostras de fundo, o modelo não identificou efeitos de nenhuma das variáveis testadas.

	Microci	Microcistinas Topo		Microcistinas Fundo		
	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)		
Tempo	39.31	< 0.05	1.34	> 0.05		
Tratamento	9.81	< 0.05	2.56	> 0.05		
Tempo:Tratamento	4.68	< 0.05	1.30	> 0.05		

A média inicial de MC intracelulares (T0) para o topo das unidades amostrais foi de 0,4 (± 0,4) µg L<sup>-1</sup>, média inferior ao encontrado na Lagoa, 1,0 µg L<sup>-1</sup> (Fig. 7). No Controle, detectamos MCs em todas as amostras de topo, coletadas durante o experimento; na lagoa, apenas em T15 as concentrações de MC estiveram abaixo do limite de detecção nas amostras de topo. A média de MC durante todo experimento foi de 0,19 (± 0,33) µg L<sup>-1</sup> para o Controle, enquanto na Lagoa, a média foi de 0,33 (± 0,39) µg L<sup>-1</sup>. 24h (T1) após a aplicação dos tratamentos, PAC+LMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentaram redução de 100% da MC intracelular nas amostras de topo (Fig. 5). O tratamento PAC+LMB manteve as concentrações de MC do topo abaixo do limite de detecção até T15; em T21 detectamos 0,01 µg L<sup>-1</sup> de MC totais, porém em T28 não identificamos MCs nas amostras. Já o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB teve MC detectada nas amostras de topo entre T21 e T28, ~0,02 µg L<sup>-1</sup> (Fig. 5). Apenas o tratamento PAC+LMB e a Lagoa apresentaram variações significativas para as concentrações de MC em T28 em relação a T0 (p < 0,05). Em T28, ao compararmos o controle, tratamentos e Lagoa, não identificamos variações significativas (p > 0,05).

Figura 7 – Variação da concentração de microcistinas intracelulares totais no experimento de mesocosmos realizados na Lagoa de Jacarepaguá.



Legenda: Concentração de microcistinas intracelulares totais ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>) em amostras de topo e fundo do experimento em mesocosmos realizados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 8 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,4 mg L<sup>-1</sup>) apenas ou posterior à aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). As barras de erro representam um desvio padrão (n = 4).

No fundo dos mesocosmos, a média de MC intracelulares total em T0 para as unidades amostrais foi de 0,07  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, enquanto na Lagoa a concentração foi de 1,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. A concentração média de MC no Controle durante o experimento foi de 0,06  $\mu$ g L<sup>-1</sup> com uma variação de 0,13  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, e entre T7 e T15 as concentrações em todas as réplicas estiveram abaixo do limite de detecção (Fig. 7). No tratamento PAC+LMB só identificamos MC em T15, na concentraçõe de 0,008  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; nos demais tempos, as concentrações foram zero (Fig. 7). No tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB só identificamos MC em T15 e em T21 (0,01  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), nas demais amostragens não ocorreu detecção de MC. Nas amostras do fundo da Lagoa, só foi identificado MC a partir de T15, com uma média de 0,03  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de MC (Fig. 7). Apenas PAC+LMB e a Lagoa apresentaram variação significativa na relação T28 e T0. Em T28, ao comparamos Controle, tratamentos e Lagoa, não verificamos diferenças significativas (p > 0,05; Fig. 8). Também não verificamos diferenças significativas para a concentração de MC no fundo das unidades amostras e da Lagoa (p > 0,05).

Figura 8 - Variação final média de microcistinas (%) nos mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá



Legenda: Variação final média de microcistinas (%) no topo e no fundo mesocosmos instalados na Lagoa de Jacarepaguá, durante 28 dias, na ausência (Controle) ou presença do coagulante (policloreto de alumínio, PAC 4 mg Al L<sup>-1</sup>) combinados com lastro (bentonita modificada com lantânio, LMB 0,2 mg L<sup>-1</sup>). (A) Diferença intratratamentos, relação entre o tempo final (T28) e tempo inicial (T0); \* representa diferenças significativas na concentração de microcistinas (p < 0,05). AU, microcistinas ausentes; AP, microcistinas só apareceram no fim do experimento. (B) Diferença intertratamento, relação entre Controle, demais tratamentos, e Lagoa no fim do experimento (T28); as letras semelhantes indicam grupos homogêneos na concentração de microcistinas (p < 0,05).

Ainda, as análises de LC-MS indicaram a presença de duas variantes de MCs durante o experimento, RR e LY, sendo MC-LY a variante mais abundante durante o início do experimento. Nas unidades amostrais de Controle, tratamento PAC+LMB e na Lagoa só identificamos a variante RR a partir de T15, se tornando então, a variante dominante. Em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB a MC-RR só foi identificada a partir de T21. Enquanto variante, nenhuma destas apresentou concentração acima de 1,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> durante o experimento.

Figura 9 - Evolução da concentração de microcistinas intracelulares durante o experimento de mesocosmos realizado no Lagoa de Jacarepaguá.



DISCUSSÃO

Neste estudo, através de experimento em mesocosmos, testamos a hipótese de que a técnica de floculação e sedimentação, e sua combinação com algicida, são eficientes na remoção de biomassa de cianobactérias e MCs de uma lagoa rasa, salobra e hipertrófica, dominada por Planktothrix isothrix. Baseado em estudos anteriores (WANG et al., 2012; NOYMA et al., 2016; MUCCI, 2019; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), alternativamente à usual combinação de uma dose baixa de floculante (PAC) associado a um lastro (LMB), técnica Floc & Lock, testamos: i) a prévia aplicação do algicida peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido pelo floculante e lastro (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB), técnica Kill, Floc & Lock; o objetivo do uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de forma prévia à floculação e sedimentação, é inviabilizar fisiologicamente as células de cianobactérias, evitando recolonização da coluna d'água; ii) no caso da técnica Floc & Lock (PAC+LMB), usamos os dados de clorofila e P dos 7 primeiros dias de experimento para adequar uma reaplicação do mesmo tratamento após 15 dias do início do experimento; o objetivo foi reduzir ao máximo a clorofila de cianobactérias e o P disponível na coluna d'água, minimizando o risco de recolonização. Nossos resultados evidenciaram que ambos os tratamentos testados foram eficientes, removendo, após 28 dias, quantidades semelhantes de biomassa da coluna d'água (92-97%) e MCs intracelulares (95-100%), sem liberação de MCs na água.

## Floculação e sedimentação

## Remoção de biomassa de cianobactérias

Técnicas de floculação e sedimentação tem se mostrado eficientes, seguras e baratas, agindo não apenas na remoção de biomassa de cianobactérias, mas também reduzindo o P na coluna d'água, sem liberação de cianotoxinas (DE MAGALHÃES et al., 2017b; MIRANDA et al., 2017; LUCENA-SILVA et al., 2019; ARRUDA et al., 2021). Entretanto, a eficiência da técnica pode variar de acordo com as características específicas da espécie de cianobactéria dominante (LAMA et al., 2016), temperatura (XIAO et al., 2008), intensidade de mistura (DU et al., 2021) e química da água (LÜRLING et al., 2017), pois influenciam, sobretudo, o processo de floculação. O Lago

De Kuil, quando tratado com a técnica *Floc & Lock*, apresentou melhores resultados de remoção quando a espécie dominante era *Aphanizomenon flos-aquae*, do que quando a dominância era de *P. rubescens* (WAAJEN et al., 2016; MUCCI, 2019). Lürling, Mucci e Waajen (2020) identificaram que os filamentos de *P. rubescens* provenientes do Lago De Kuil podiam ser removidos incialmente, mas retornavam à coluna d'água em algumas horas; contrariamente, a população de *P. rubescens* proveniente do Lago Rauwbraken, foi eficientemente removida com o mesmo tratamento e dosagens usados no Lago De Kuil, sem ressuspensão de células. Alternativamente, estes autores demonstraram que, o uso prévio de  $H_2O_2$  (5 mg L<sup>-1</sup>) reduziu a zero a eficiência do PSII de *P. rubescens* do Lago De Kuil, e que a posterior floculação e sedimentação foram mais eficientes neste caso. Em nosso estudo, considerando a variação da clorofila de cianobactérias e biovolume de cada potencial produtor de MC, não observamos diferenças significativas entre a aplicação prévia de  $H_2O_2$  e a não aplicação em nenhuma das amostragens durante experimento; tornando o uso do algicida dispensável.

O uso do algicida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passou a ser indicado no combate de florações de cianobactérias uma vez que esses organismos são mais susceptíveis a este composto; as cianobactérias carregam os seus complexos de captação de luz (ficobilissomas) no exterior da membrana tilacoidal diretamente exposta ao citoplasma, tornando-as mais suscetíveis a reagentes adicionados externamente, nesse caso o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; também, as cianobactérias têm vias de desintoxicação de H2O2 menos elaboradas, o que está relacionado com sua adaptabilidade à prevalência em baixas irradiâncias do que outros grupos de algas (DRÁBKOVÁ et al., 2007). De fato, em nosso estudo, o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB inviabilizou a biomassa no topo e fundo das unidades amostrais após 24h da aplicação, indicado pelo  $\Phi$ PSII de ~0. Entretanto, 3 dias após à aplicação (T3), o  $\Phi$ PSII da biomassa no tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou valor médio de 0,37, indicativo de recuperação fisiológica; em T7 ambos os tratamentos apresentaram **PSII** de ~ 0,61. O que aqui chamamos de recuperação fisiológica da biomassa, observada no tratamento  $H_2O_2$ +PAC+LMB entre T3 e T7, não se trata necessariamente do reparo do aparato fotossintético das células afetadas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas reflexo de uma possível sucessão da população de cianobactérias. Esta hipótese tem como fundamento o aumento de 19 vezes da contribuição relativa do biovolume de *M. aeruginosa* (Fig. 5), observada entre T0 e T7. Uma vez que a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode diferir entre cianobactérias (LUSTY; GOBLER, 2020) e entre cepas (DZIALLAS; GROSSART, 2011; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), especulamos que o efeito do algicida pode ter sido mais expressivo na espécie filamentosa *Planktothrix*, do que a colonial *Microcystis*. Dando suporte a nossa hipótese, um estudo de avaliação da sensibilidade de três diferentes espécies de cianobactérias ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Planktothrix* apresentou maior susceptibilidade ao composto, sendo o  $\Phi$ PSII afetado em concentrações  $\geq 2 \text{ mg L}^{-1}$ ; enquanto duas espécies de *Microcystis* não foram afetadas por concentrações < 3,5 mg L<sup>-1</sup> (WEENINK et al., 2021). Também podemos inferir que a redução de P, promovido pelo lastro, pode ter favorecido o crescimento de *Microcystis*; *Microcystis* spp. respondem à deficiência de P formando polifosfatos, que suprem suas necessidades fisiológicas quando o P disponível na coluna d'água é insuficiente (WAN et al., 2019; LI et al., 2023). Notem que, não existiu limitação de P mas uma redução significativa, o que pode ter favorecido espécies que apresentam rápido absorção/assimilação de P. É valido registrar que o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou redução de 16 vezes, em relação à T0, na concentração de SRP, atingindo em T7 30 µg L<sup>-1</sup> de P; PAC+LMB teve redução de 14 vezes, atingindo 37 µg L<sup>-1</sup> em T7 (dados não publicados).

Em T15, antes de realizarmos a reaplicação de PAC (2 mg Al L<sup>-1</sup>) e LMB (0,1 g L<sup>-1</sup>) no tratamento PAC+LMB, observamos que não havia diferenças significativas entre nenhum dos parâmetros de biomassa aferidos no topo e fundo das unidades amostrais entre os dois tratamentos testados. Assim podemos concluir que, o uso de  $H_2O_2$  não interferiu (aumentando) na efetividade da técnica *Floc & Lock*; fato que vai contra estudos prévios de curta duração (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020), e também contra ao observado em nosso experimento de microcosmos (Capítulo VI), que evidenciaram maior efetividade da remoção de cianobactérias quando a biomassa foi previamente tratada com  $H_2O_2$ . Vale lembrar que o experimento em microcosmos descrito no Capítulo VI foi realizado com a água e a população natural de cianobactérias provenientes da Lagoa de Jacarepaguá, porém com tempo de incubação de 48h.

A partir de T15, seguindo até o fim do experimento (T28) mesmo com a reaplicação de PAC e LMB, não observamos nenhuma diferença significativa nos parâmetros de biomassa entre os dois tratamentos, assim como ausência de oscilações significativas nestes mesmos parâmetros até o fim do experimento. Entretanto, no Controle, uma tendência de redução de clorofila foi registrada; em T28 a concentração de clorofila no Controle era de 25 ( $\pm$  7,5) µg L<sup>-1</sup>. Similarmente, as medições na Lagoa indicaram o mesmo padrão de redução, finalizando o experimento com 68 ( $\pm$  7,7) µg L<sup>-1</sup> de clorofila. Em T28, não havia diferenças entre tratamentos, Controle e Lago para

clorofila de cianobactérias medidas no topo e no fundo das unidades amostrais. Tais reduções, consequentemente, também foram evidentes no biovolume; uma gradual redução concomitante foi observada para as populações de P. isothrix, M. aeruginosa e S. nidulans em todas as unidades amostrais entre T15 e T28; não observamos diferenças significativas no biovolume dessas populações entre Controle, tratamentos e Lagoa. Já os dados de  $\Phi$ PSII, a partir de T15, para ambos os tratamentos e Controle, decaíram semelhantemente, atingindo valor zero, sem sofrer oscilações significativas até o fim do experimento (T28). De forma contrária, nas medições realizadas na Lagoa, o ФРSII apresentou valor médio de 0,46 (± 0,22) entre T15 e T28; indicativo de que o isolamento das unidades amostrais afetou a biomassa de cianobactérias. Um estudo de avaliação de risco ecológico do sedimento da Lagoa de Jacarepaguá mostrou, através de bioensaios com a clorofícea Chlorella vulgaris, efeitos crônicos de inibição de crescimento das cepas expostas ao sedimento de diferentes áreas da Lagoa de Jacarepaguá; em análise complementar, entre os metais pesados contidos no sedimento, Zinco (Zn) apresentou concentração 760,57 mg Kg<sup>-1</sup> (RODRIGUES, 2022). Em outro ensaio toxicológico, porém com a cianobactéria Anabaena sphaerica, mostrou que o  $IC_{50}$  de  $ZnC_{12}$  foi de 10 mg L<sup>-1</sup>; e em 8 dias de experimento, a densidade celular da espécie teste reduziu 50.37%, causou redução no conteúdo de clorofila-a (51%), carotenóides (32%) e ficobiliproteínas (44%), além da redução de 46% no ΦPSII das culturas (CHAKRABORTY; MISHRA, 2021). Assim, hipotetizamos que o confinamento da coluna d'água nos mesocosmos, ao prolongar o contato da massa de água isolada com o sedimento, aumentou a exposição de toda comunidade de cianobactérias aos compostos potencialmente tóxicos do sedimento, afetando o ΦPSII das cianobactérias nas unidades amostrais. Ressaltamos que os mesocosmos eram intencionalmente abertos em sua parte inferior, possibilitando interação coluna d'água/sedimento (Fig. 2). Efeitos da toxicidade do sedimento sobre a concentração de clorofila e biovolume também devem ser considerados em nosso experimento, embora não mensurados diretamente. Assim hipotetizamos que efeitos potencialmente tóxicos do sedimento possam, a longo prazo, ter contribuído também para a redução de biomassa nas unidades amostrais com tratamentos.

Em 28 dias de experimento, embora tenha sido registrado aumento de 54 vezes no biovolume de *M. aeruginosa* e de 4 e 1 vezes para *C. minimus* e *S. nidulans* nas unidades amostrais com tratamentos, ambos apresentaram valores de remoção semelhantes; em média 94% para clorofila e biovolume de cianobactérias. Resultados semelhantes ao observado na intervenção no lago De Kuil, 90% (LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020).

#### Efeitos das técnicas sob a concentrações de microcistinas

Em nossas análises, não identificamos MCs dissolvidas em nenhuma das unidades amostrais antes ou após aplicação dos tratamentos, em 28 dias de experimento. Além disso, 100% das MCs intracelulares foram removidas em ambos os tratamentos em 24h pós aplicação; resultado inédito, mesmo para testes de curta duração com técnicas de floculação e sedimentação. Detecção de MCs só ocorreu novamente em T21, 21 dias após aplicação dos tratamentos, em concentrações abaixo de 0.02  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 80 vezes menos do que no início do experimento. E em T28, apenas o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB apresentou detecção para MC intracelulares (0,02  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), um valor 20 vezes menor que o início do experimento; valor 50 vezes menor do que o limite definido pela legislação brasileira e pela World Health Organization para água de consumo

Em geral, PAC pode afetar a integridade da membrana de cianobactérias; durante sua ação, quando os íons hidrogênio são liberados durante a hidrólise do coagulante, eles podem causar um declínio no pH, promovendo lise celular (HAN; JEON; PARK, 2012; NOYMA et al., 2016). Existem registros de efeito de lise por uso de PAC em concentrações  $\geq 8 \text{ mg L}^{-1}$  (NOYMA et al., 2016; MIRANDA et al., 2017). Aqui, embora tenhamos usado a concentração 8 mg L<sup>-1</sup>, não observamos indício de lise celular, seja por declínio imediato do pH (7.4 ±0.5) ou por aumento da concentração de MC dissolvida nas amostras. Semelhantemente, Lucena et al., (2019) não observou alterações significativas no pH e na concentração de MCs extracelulares, usando 8 mg L<sup>-1</sup> de PAC, sozinho ou em combinações com lastros, em água proveniente de um reservatório dominado por *Planktothrix agardhii* e *Raphidiopsis raciborskii*. Além disso, a associação de PAC com LMB possibilita, ainda, a adsorção de MCs dissolvidas; efeitos de adsorção do LMB sobre MCs dissolvidas vem sendo descritas na literatura (DAIL et al., 2020; LÜRLING; MUCCI; WAAJEN, 2020; ARRUDA et al., 2021).

Já o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cianobactérias contendo MCs, ainda não é totalmente claro; embora a liberação de cianotoxinas intracelulares através da lise das células de cianobactérias seja uma consequência comum dos algicidas, foi demonstrado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage degradando as MCs em caso de lise (MATTHIJS et al., 2012; LUSTY; GOBLER, 2020); foi comprovado também que as MCs se ligam a proteínas sensíveis ao redox dentro de cepas tóxicas de Microcystis e podem fornecer proteção oxidativa às estruturas intracelulares para cepas tóxicas (ZILLIGES et al., 2011; LUSTY; GOBLER, 2020), potencialmente selecionando estas dentro da população de produtores e não produtores de MC (ZILLIGES et al., 2011; PAERL; OTTEN, 2013). Em nosso estudo, registramos o aumento da contribuição de Microcystis e aparecimento da variante MC-RR durante o experimento. Entretanto, essa tendência de aumento da abundância relativa de Microcystis foi observada em ambos os tratamentos e no Controle. Um estudo recente, que comparativamente testou  $H_2O_2$  (5 mg L<sup>-1</sup>) PAC+LMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB deixou evidente que o algicida promoveu libração de MCs, aumentando a concentração da toxina em ~150 vezes; entretanto, a concentração foi atenuada quando PAC+LMB foi aplicado em sequência; e, ainda quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi usado (tratamento PAC+LMB), a concentração de MC se manteve semelhante ao controle (LURLING; MUCCI; WAAJEN, 2020). Além do potencial efeito de adsorção de MC já promovido pelo LMB, a Lagoa de Jacarepaguá é rasa, sofrendo grande efeito do vento, que por sua vez promove circulação da coluna d'água e ressuspensão de sedimentos, podendo afetar a concentração de MC dissolvidas na água. A biodisponibilidade de MC na coluna d'água pode ser influenciada por sua adsorção e dessorção às partículas suspensas, especialmente partículas finas de barro (CHEN et al., 2008, 2010). O processo de adsorção, bem como a biodegradação de MCs já foram apontados como fator determinate, influenciando as concentrações e destino de MC-LR na Lagoa de Jacarepaguá (SANTOS et al., 2020).

Em relação ao aparecimento de MC-RR, entre T21 e T28, nas amostras de superfície, é notável que esteja relacionado como aumento da população de *Microcystis*; MC-RR e aumento na contribuição de *Microcystis* foram observadas não apenas nas unidades amostrais com tratamento, mas também no Controle e Lagoa. É válido ressaltar que a variante RR foi detectada inicialmente nas amostras de fundo em T15, seguida pela detecção nas amostras de topo em T21. Esse fato sugere que, pode ter ocorrido um recrutamento de células de *Microcystis* produtoras de MC do sedimento; a identificação de MC nas amostras de fundo e posteriormente na superfície suportam a

ideia de uma possível migração de células produtoras de MC do sedimento à coluna d'água. É amplamente aceito que as células de *M. aeruginosa* na coluna d'água se acomodam (afundam) na superfície do sedimento onde permanecem dormentes, sobrevivendo em condições ambientais desvantajosas, como baixa temperatura, fraca irradiância, má nutrição e outros fatores adversos (ROLLAND; VINCENT, 2014); quando as condições ambientais são favoráveis (ex., forte iluminação, baixa razão N:P, altas temperaturas), essas células 'bentônicas' de *M. aeruginosa* são recrutadas para a coluna de água a partir do sedimento, podendo a vir formar florações (MISSON; LATOUR, 2012; XIAO TAN, 2012; ZOU et al., 2018). Uma vez que o aumento da contribuição relativa de *M. aeruginosa* foi semelhante entre tratamentos, Controle e Lagoa, concluímos que se tratou de um processo natural e aparentemente recorrente no ambiente estudado, e não consequência direta da aplicação dos tratamentos.

Embora em baixas concentrações, e mesmo sendo uma variante menos tóxica que LY (LD<sub>50</sub>, LY 90 µg K<sup>-1</sup>; LD<sub>50</sub>, RR 600 µg K<sup>-1</sup>) (MERILUOTO et al., 1989; NAMIKOSHI et al., 1992), registramos aumento do conteúdo de toxina (tradução livre para "toxin content") nas unidades amostrais com o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB em 45 vezes, de 0,004 para 0.136  $\mu$ g / mm<sup>3</sup>. Embora geralmente o conteúdo de toxina seja expresso em µg ou mg por grama de peso seco (dw), muitos trabalhos recentes vendo expressando o conteúdo em µg por mm<sup>3</sup> (IBELINGS et al., 2021) sendo que o conteúdo de toxinas pode ser alterado por fatores ambientais (ex., temperatura, luz, pH, macronutrientes, salinidade) (SIVONEN; JONES, 1999; KARDINAAL; VISSER, 2005; PEARSON et al., 2016). Entretanto, sabemos que o conteúdo de toxina tende a ser maior durante a fase exponencial de crescimento de uma população, e apresenta reduções na fase estacionária (WIEDNER et al., 2003; YÉPRÉMIAN et al., 2007). Assim, mesmo com o aumento no conteúdo de MC nas unidades amostrais com o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB, os resultados obtidos pós-tratamento são promissores. De qualquer forma, um estudo de longevidade considerando não apenas a concentração de MCs, mas também o conteúdo de MC é indicado para identificação de uma possível seleção de cepas tóxicas.

## Conclusão

Neste estudo, demonstramos a eficácia de técnicas de floculação e sedimentação na remoção de biomassa de *Planktothrix isothrix* e MCs intracelulares, sem liberação de MCs na água, em uma lagoa tropical hipertrófica. Entretanto, a abordagem com o algicida Peróxido e Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seguido pelo uso do floculante e lastro não trouxe maior efetividade à técnica; assim como, a reaplicação estratégica de floculante e lastro, não contribuiu significativamente na remoção final de biomassa. Dessa forma, apenas uma baixa dose de floculante (PAC) e um adsorvente de P em fase sólida (LMB) apresenta-se como a opção de tratamento mais simples e menos onerosa. Estes resultados representam uma contribuição valiosa para o controle de cianobactérias e MCs em ambientes aquáticos tropicais, oferecendo alternativas eficazes e a baixo custo para o gerenciamento de águas e a preservação da qualidade da água.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

BRUUN, P. Engineering projects in coastal lagoons. Em: *Coastal lagoon processes*. Amsterdam: Kjerfve B., 1994. p. 507–533.

CHEN, W. et al. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions. *Water Research*, 2008.

CHEN, X. et al. An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Research*, v. 44, n. 6, 2010.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water. [s.l: s.n.]

COOKE, G. D. et al. Restoration and Management of Lakes and Reservoirs. [s.l: s.n.]

DAIL, H. et al. Sorption of dissolved microcystin using lanthanum-modified bentonite clay Molecular diversity of polar cyanobacteria View project Diverse aspects of testate amoebae evolution View projectArticle in Journal of Aquatic Plant Management. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.researchgate.net/publication/337227788">https://www.researchgate.net/publication/337227788</a>>.

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*, v. 40, n. 1, 2017a.

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*, v. 40, n. 1, p. 121–133, jan. 2017b. DE MAGALHÃES, L. et al. Managing Eutrophication in a Tropical Brackish Water Lagoon: Testing Lanthanum-Modified Clay and Coagulant for Internal Load Reduction and Cyanobacteria Bloom Removal. *Estuaries and Coasts*, v. 42, n. 2, p. 390–402, mar. 2019.

DOWNING, J. A. Limnology and oceanography: Two estranged twins reuniting by global change. *Inland Waters*, v. 4, n. 2, 2014.

DRÁBKOVÁ, M. et al. Selective effects of H2O2 on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica*, v. 45, p. 363–369, 2007.

DU, P. et al. Effect of Rapid-Mixing Conditions on the Evolution of Micro-Flocs to Final Aggregates during Two-Stage Alum Addition. *Environmental Technology*, v. 42, n. 20, p. 3122–3131, 6 set. 2021.

DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic Microcystis Sp. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25569, 28 set. 2011.

FERRÃO-FILHO, A. S.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S. M. F. O. Influences of a Microcystis Aeruginosa Kützing Bloom on Zooplankton Populations in Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Limnologica*, v. 32, n. 4, p. 295–308, dez. 2002.

FREITAS DE MAGALHÃES, V.; MORAES SOARES, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin Contamination in Fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological Implication and Human Health Risk. *Toxicon*, v. 39, n. 7, p. 1077– 1085, jul. 2001.

GOMES, A. M. da A. et al. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS EM UMA LAGOA COSTEIRA HIPEREUTRÓFICA DO RIO DE JANEIRO/RJ (BRASIL) E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA SAÚDE HUMANA. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 329–345, jun. 2009.

HÅKANSON, L.; BRYHN, A. C. *Tools and Criteria for Sustainable Coastal Ecosystem Management*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

HAN, J.; JEON, B. S.; PARK, H. D. Cyanobacteria cell damage and cyanotoxin release in response to alum treatment. *Water Science and Technology: Water Supply*, v. 12, n. 5, 2012.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Accumulation and Toxic Effects of Microcystin in Tilapia (Oreochromis Niloticus) from an Eutrophic Brazilian Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 112, p. 132–136, fev. 2015.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, 2018.

IBELINGS, B. W. et al. Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Chorus I and Welker M, 2021.

KARDINAAL, W.; VISSER, P. Dynamics of cyanobacterial toxins: sources of variability in microcystin concentrations. Em: *Harmful cyanobacteria*. [s.l.] Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM, 2005. p. 41–63.

KJERFVE, B. Coastal lagoon processes. Coastal lagoon processes, 1994.

KNOPPERS, B.; KJERFVE, B. Coastal Lagoons of Southeastern Brazil: Physical and Biogeochemical Characteristics. Em: PERILLO, G. M. E.; PICCOLO, M. C.; PINO-QUIVIRA, M. (Ed.). *Estuaries of South America*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 35–66.

LAMA, S. et al. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, v. 220, 2016.

LI, J. et al. Dynamic Characteristics of Total and Microcystin-Producing Microcystis in a Large Deep Reservoir. *Environmental Pollution*, v. 335, p. 122256, out. 2023.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 2, 2004.

LUCENA-SILVA, D. de et al. Removal Efficiency of Phosphorus, Cyanobacteria and Cyanotoxins by the "Floc & Sink" Mitigation Technique in Semi-Arid Eutrophic Waters. *Water Research*, v. 159, p. 262–273, ago. 2019.

LÜRLING, M. et al. Critical Assessment of Chitosan as Coagulant to Remove Cyanobacteria. *Harmful Algae*, v. 66, p. 1–12, jun. 2017.

LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, v. 158, 2020.

LÜRLING, M. et al. Combination of Measures to Restore Eutrophic Urban Ponds in The Netherlands. *Water*, v. 15, n. 20, p. 3599, 14 out. 2023.

LÜRLING, M.; MUCCI, M.; WAAJEN, G. Removal of Positively Buoyant Planktothrix rubescens in Lake Restoration. *Toxins*, v. 12, 2020. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/b9885674398b2b4efabff4e5aec0f8496efa9939 >.

LUSTY, M. W.; GOBLER, C. The Efficacy of Hydrogen Peroxide in Mitigating Cyanobacterial Blooms and Altering Microbial Communities across Four Lakes in NY, USA. *Toxins*, v. 12, 2020. Disponível em:

<https://www.semanticscholar.org/paper/df169196cfa0a5333a052dc9975140cdedbfebf 3>.

MACHADO, J. et al. Mode of Action and Toxicity of Major Cyanobacterial Toxins and Corresponding Chemical Variants. Em: STILES, B. et al. (Ed.). *Microbial Toxins*. Toxinology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2018. p. 441–464.

MAGALHÃES, V. F. et al. Microcystins (Cyanobacteria Hepatotoxins) Bioaccumulation in Fish and Crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, v. 42, n. 3, p. 289–295, set. 2003. MATTHIJS, H. et al. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water research*, v. 46 5, p. 1460–72, 2012.

MERCEDES, J. de S. Balanço de fósforo em uma laguna tropical rasa (Lagoa de Jacarepaguá – RJ): implicações para o gerenciamento da eutrofização. 2020. Rio de Janeiro State University, Brazil, 2020.

MERILUOTO, J. A. O. et al. Structure and Toxicity of a Peptide Hepatotoxin from the Cyanobacterium Oscillatoria Agardhii. *Toxicon*, v. 27, n. 9, p. 1021–1034, jan. 1989.

MIRANDA, M. et al. The Efficiency of Combined Coagulant and Ballast to Remove Harmful Cyanobacterial Blooms in a Tropical Shallow System. *Harmful Algae*, v. 65, p. 27–39, maio 2017.

MISSON, B.; LATOUR, D. Influence of Light, Sediment Mixing, Temperature and Duration of the Benthic Life Phase on the Benthic Recruitment of Microcystis. *Journal of Plankton Research*, v. 34, n. 2, p. 113–119, 1 fev. 2012.

MUCCI, M. et al. Chitosan as Coagulant on Cyanobacteria in Lake Restoration Management May Cause Rapid Cell Lysis. *Water Research*, v. 118, p. 121–130, jul. 2017.

MUCCI, M. N. T. From green to transparent waters: Managing eutrophication and cyanobacterial blooms by geo-engineering. 2019. Wageningen University, Wageningen, 2019. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.18174/471722">https://doi.org/10.18174/471722</a>. Acesso em: 19 jul. 2019.

NAMIKOSHI, M. et al. Identification of 12 Hepatotoxins from a Homer Lake Bloom of the Cyanobacteria Microcystis Aeruginosa, Microcystis Viridis, and Microcystis Wesenbergii: Nine New Microcystins. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 57, n. 3, p. 866–872, jan. 1992.

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*, v. 97, p. 26–38, jun. 2016.

NOYMA, N. P. et al. Coagulant plus Ballast Technique Provides a Rapid Mitigation of Cyanobacterial Nuisance. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0178976, 9 jun. 2017.

PAERL, H. W. et al. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, v. 54, 2016.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, v. 65, n. 4, p. 995–1010, maio 2013.

PEARSON, L. A. et al. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae*, v. 54, p. 98–111, 2016.

RODRIGUES, I. Y. da C. *Avaliação de risco ecológico do sedimento da Lagoa de Jacarepaguá - RJ*. 2022. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2022. Disponível em: <a href="http://www.bdtd.uerj.br/handle/1/18500">http://www.bdtd.uerj.br/handle/1/18500</a>>. Acesso em: 28 set. 2023.

ROLLAND, D. C.; VINCENT, W. F. Characterization of Phytoplankton Seed Banks in the Sediments of a Drinking Water Reservoir. *Lake and Reservoir Management*, v. 30, n. 4, p. 371–380, 2 out. 2014.

SAIEG-FILHO, E. Ecologia do Fitoplâncton Marginal das Lagunas da Baixada de Jacarepaguá, Rio de Janeiro-RJ., 1986. .

SANTOS, A. et al. Biotic and abiotic factors affect microcystin-LR concentrations in water/sediment interface. *Microbiological Research*, v. 236, 2020.

SIVONEN, K.; JONES, G. J. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. [s.l: s.n.]

SUN, F. et al. The lysis of Microcystis aeruginosa in AlCl 3 coagulation and sedimentation processes. *Chemical Engineering Journal*, v. 193–194, 2012.

SVIRČEV, Z. et al. Global Geographical and Historical Overview of Cyanotoxin Distribution and Cyanobacterial Poisonings. *Archives of Toxicology*, v. 93, n. 9, p. 2429–2481, set. 2019.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; BRDJANOVIC, D. Anticipating the next century of wastewater treatment. *Science*, v. 344, n. 6191, 2014.

WAAJEN, G. et al. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v. 97, 2016.

WAN, L. et al. Phosphorus Strategy in Bloom-Forming Cyanobacteria
(Dolichospermum and Microcystis) and Its Role in Their Succession. *Harmful Algae*, v. 84, p. 46–55, abr. 2019.

WANG, Z. et al. An Integrated Method for Removal of Harmful Cyanobacterial Blooms in Eutrophic Lakes. *Environmental Pollution*, v. 160, p. 34–41, jan. 2012.

WEENINK, E. et al. Interspecific protection against oxidative stress: green algae protect harmful cyanobacteria against hydrogen peroxide. *Environmental Microbiology*, v. 23, p. 2404–2419, 2021.

WIEDNER, C. et al. Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 1475–1481, mar. 2003.

XIAO, F. et al. Effects of Low Temperature on Coagulation of Kaolinite Suspensions. *Water Research*, v. 42, n. 12, p. 2983–2992, jun. 2008.

XIAO TAN. Comparison of benthic recruitment with pelagic growth of bloom-forming cyanobacteria. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 14, 16 abr. 2012. Disponível em:

<http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract%202012/16Apr/Ta n.htm>. Acesso em: 3 out. 2023.

YÉPRÉMIAN, C. et al. Microcystin Ecotypes in a Perennial Planktothrix Agardhii Bloom. *Water Research*, v. 41, n. 19, p. 4446–4456, nov. 2007.

ZILLIGES, Y. et al. The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of Microcystis under Oxidative Stress Conditions. *PLoS ONE*, v. 6, n. 3, p. e17615, 18 mar. 2011.

ZOU, W. et al. Recruitment-Promoting of Dormant Microcystis Aeruginosa by Three Benthic Bacterial Species. *Harmful Algae*, v. 77, p. 18–28, jul. 2018.

# 8 ARTIGO: PRIMARY SCREENING OF CYANOBACTERIAL BIOMASS FROM A TROPICAL RESERVOIR: BIOLOGICAL ACTIVITY AND METABOLOMICS ANALYSES

#### Abstract

Cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHABs) can pose risks to ecosystems and human health worldwide due to their capacity to produce natural toxins. Nevertheless, the potential danger associated with numerous metabolites produced by cyanobacteria remains undisclosed. Only select classes of cyanopeptides have been extensively studied to yield substantial evidence regarding their toxicity, resulting in their inclusion in risk management and water quality regulations. Information about exposure concentrations, co-occurrence, and toxic impacts of several cyanopeptides remains largely unexplored. This research utilized LC-MS-based metabolomics to ascertain the chemical profile of environmental cyanobacterial biomass collected from a eutrophic reservoir in Brazil. Using NP Analyst and Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery) platforms, we examined the correlation between the various cyanopeptides identified in the cyanobacterial crude extract, fractions, and the acute toxicity of these samples against the Artemia. salina microcrustacean. Four classes of cyanopeptides were revealed through metabolomics: microcystins, microginins, aeruginosins, and cyanopeptolins. The bioinformatics tools showed high bioactivity correlation scores for compounds of the cyanopeptolin class, in some cases even higher than those attributed to microcystins. These results emphasize the pressing need for a comprehensive evaluation of the (eco)toxicological risks associated with different cyanopeptides, considering their potential for exposure. This work also demonstrates the feasibility of conducting risk assessments using a more efficient approach involving LC-MS/MS-based metabolomics and chemometric techniques that require less time and reagents.

Keywords: cyanotoxins, cyanopeptolins, risk assessment, LC-MS-based metabolomics, bioinformatics

## INTRODUCTION

247

Cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHAB) have been a significant problem in freshwater ecosystems. CyanoHABs events affect water quality, cause ecosystem degradation, and can produce a range of biologically active compounds, which can have adverse effects on both the environment and human health (Huisman et al., 2018; Beversdorf et al., 2017; Huang and Zimba, 2019; Ujvárosi et al., 2020). Cyanobacterial metabolites include lipopolysaccharides, oligopeptides, and alkaloids, many classified as hepatotoxins or neurotoxins. (Buratti et al. 2017; Pearson et al. 2016; Stewart et al. 2018; Violi et al. 2019). Numerous cases of poisoning involving cyanotoxins have been reported (Azevedo et al., 2002; Carmichael et al., 2001; Hilborn et al., 2014; Merel et al., 2013). Among the cyanotoxins, the microcystin (MC) group is undoubtedly the most extensively documented in the literature (Chorus e Welker 2021). MC are a group of cyclic heptapeptides with more than 300 structurally similar congeners (Jones et al., 2020) and the most commonly cyanotoxin class found in cyanobacterial blooms in freshwater systems (De Figueiredo et al., 2004; O'neil et al., 2012). Its ubiquitous presence and proven toxicity led the World Health Organization (WHO) to suggest monitoring cyanobacteria and the MC-LR congener in water reservoirs for human consumption. In response to the toxicological hazards posed by cyanotoxins, numerous countries including Australia, Brazil, Canada, China, Japan, South Africa, USA and the EU have established limit values for MC in drinking water; these measures are implemented to safeguard the population from potential exposure (Picardo et al., 2019).

However, recent advances in analytical techniques have allowed researchers to identify numerous cyanopeptides beyond the well-known class of MC, including, but not limited to, cyanopeptolins, anabaenopeptins, aerucyclamides, aeruginosins, and microginins (Welker and von Döhren, 2006). Over the past decades, hundreds of cyanopeptides from different classes have been identified in biomasses from CyanoHABs events (Beversdorf et al., 2017; Welker et al., 2004; Welker and Von Döhren, 2006). Nevertheless, the occurrence, distribution, and toxicity of many of these bioactive metabolites, especially in tropical freshwater systems, have been poorly explored (Jones et al., 2020). Information about the co-occurrence of different classes of cyanopeptides, exposure concentrations in surface waters, and toxic and synergic effects

are lacking. Researchers state that it is paramount to question the diversity of biologically active and potentially toxic cyanopeptides to which humans and wild animals can be exposed during CyanoHABs (Jansen et al., 2019). Some ecotoxicological studies already suggested that the effects of cyanobacterial extracts cannot be attributed solely to MC, indicating that other bioactive metabolites should be studied and considered when assessing risk (Keil et al., 2002; Baumann and Jüttner, 2008; Le Manach et al., 2016; Smutná et al., 2014).

In a time- and reagent-consuming process, traditional ecotoxicological approach assays are typically performed through a series of fractionations that gradually isolate and purify compounds for bioactivity testing (Weller, 2012). However, advances in 'omics' technologies allow researchers to use bioinformatics tools to identify bioactive compounds in the early phases of natural product studies, thus avoiding the exhaustive laborious fractionation steps that can lead to redundant results (Lautié et al., 2020). These new approaches address critical challenges in a comprehensive risk assessment of cyanopeptides, such as the lack of reference standards that address their structural diversity and the large amount of sample required for quantification and identification (Janssen et al., 2019).

Considering this, the present study employs LC-MS-based metabolomic methods associated with chemometric tools in an innovative approach to evaluate the toxicity of cyanopeptides in a cyanobacteria extract from natural biomass collected in a eutrophic reservoir in southeastern Brazil. We applied two chemometric tools (NP Analyst and Data Fusion-based Discovery – DAF discovery) to investigate the correlation between LC-MS/MS data and observed acute toxicity tests. We hypothesize that the combination of metabolomic methods with bioinformatic tools is efficient for evaluating the toxicity of different cyanopeptides contained in the crude cyanobacteria extract without requiring compound isolation. These methodologies can make the environmental monitoring process more agile and with less reagent consumption, accelerating risk assessment and decision-making.

## METHODOLOGY

## Sampling

A water sample was collected in the dry season (August 2019) at Funil Reservoir, a eutrophic system located in southern Brazil (22°30'S and 44°45'W) at 440 m of altitude, in a humid tropical climate area (Cwa in the Köppen, ALVARES et al.,2013). At that moment, a thick scum accumulated near the shore. The biomass was concentrated with a plankton net (50 µm mesh) to create a cyanobacterial suspension. Five liters of slag were collected, stored in a plastic bottle, and kept refrigerated during transport. The samples were kept at -20°C until processing and performing the LC-MS/MS analyses and biological activity assays. The sample's pH and temperature were measured at the time of collection.

#### **Biomass extraction and clean-up**

Cyanobacterial biomass was extracted according to the sequential extraction method recommended by the United States National Cancer Institute (NCI) for highthroughput extraction and screening of natural products from plants, microorganisms, and marine organisms (McCLOUD, 2010). Briefly, a mixture of dichloromethane:methanol (DCM: MeOH) (1:1) was added to the lyophilized biomass (265 mg), sonicated for 2 minutes in an ultrasonic bath, and left in contact overnight. The supernatant was collected and stored in a glass vial. The remaining biomass was extracted one more time with MeOH (100%) for eight hours. The supernatant was collected and added to the previous one to form the organic crude extract.

Crude extracts were subjected to a solid phase extraction (SPE) clean-up using C18 cartridges (3 mL/500 mg, Chromabond<sup>©</sup>) previously the LC-MS/MS analysis.

#### Fractionation

An aliquot of the crude extracts was fractionated using a chromatography column containing Diaion<sup>©</sup> HP-20SS resin as a solid phase. A gradient of isopropyl alcohol:  $H_2O$  (0:100, 20:80, 40:60, 70:30, 90:10, and 100:0), was applied to form the fractions F1, F2, F3, F4, F5, and F6, respectively.

## **LC-MS Analysis**

Analyses were carried out on a high-performance liquid chromatography system (Shimadzu<sup>®</sup> Prominence Liquid Chromatography) coupled with a high-resolution tandem mass spectrometer (Micro TOF-QII; Bruker Daltonics<sup>®</sup>, MA, USA) with electrospray ionization (ESI) – (HPLC-ESI-QTOF-MS/MS). Chromatographic separations were performed over a Luna Kinetex C18 column (50 x 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m particle diameter). Mobile phase comprised 0.2% v/v formic acid in ultrapure water (solvent A) and 0.2% v/v formic acid in acetonitrile (solvent B). The gradient was as follow: A:B 95:5 (0 min), A:B 0:100 (in 12 min), A:B 0:100 (1 min), A:B 95:5 (in 0.1 min), A:B 95:5 (until 15 min). Flow rate 0.6 mL.min<sup>-1</sup>. The ESI conditions were capillary potential at 3.5 kV, drying gas (N<sub>2</sub>) at 200°C at a flow rate of 9.0 mL.min<sup>-1</sup>, and nebulization pressure at 40.0 psi. The mass spectrometer (QTOF) was operated in auto scan MS/MS mode, and the mass spectra were acquired in positive mode with two mass ranges, 50-1500 *m/z* and 800-2000 *m/z* (MS1), and in negative with a single mass range, 150-2000 *m/z* (MS1).

## **LC-MS/MS based Metabolomics**

LC-MS/MS data were converted to .mzXML format with DataAnalysis<sup>®</sup> software and pre-filtered in MSConvert<sup>®</sup>. The data were entered into the GNPS<sup>®</sup> platform (https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp) to generate the molecular network using the Classical Molecular Networking tool. Along with the sample data, data of MS2 internal standard of known compounds were also introduced into the GNPS and seeded into the molecular network (aeruginosin NAL2 *m/z* 587.3571 [M+H]<sup>+</sup>; guanitoxin *m/z* 253.1051 [M+H ]<sup>+</sup>; cyanopeptolin 1020 *m/z* 1021.5368 [M+H]<sup>+</sup>; cyanostatin B *m/z* 754.4426 [M+H]<sup>+</sup>; MC-RR *m/z* 519.7960 [M+H]<sup>+</sup>; mycosporins-lysine *m/z* 317.1368 [M+H]<sup>+</sup>; microginin KR787 *m/z* 788.4016 [M+H]<sup>+</sup>; namalide B *m/z* 576.3391 [M+H]<sup>+</sup>; namalide C *m/z* 562.3235 [M+H]<sup>+</sup>; namalide D *m/z* 

560.3561  $[M+H]^+$ ; nodularin-R *m/z* 825.4490  $[M+H]^+$ ; Dhb5-nodularin *m/z* 811.4328  $[M+H]^+$  porphyra 334 *m/z* 347.1431  $[M+H]^+$ ; shizopeptin 791 *m/z* 792.4802  $[M+H]^+$ ; shinorine *m/z* 333.128  $[M+H]^+$  and spumigin 638 *m/z* 639.3109  $[M+H]^+$ ). Cytoscape<sup>®</sup> software was used to visualize molecular networks. The SIRIUS<sup>®</sup> and ChemCalc<sup>®</sup> platforms were used to search for prospective molecular formulas. The search for known compounds took place in the databases PubChem<sup>®</sup>, Chemspider<sup>®</sup>, Metlin<sup>®</sup>, NPAtlas<sup>®</sup>, Dictionary of Natural Products<sup>®</sup>, GNPS, and CyanoMetDB (JONES et al., 2020).

In order to investigate the correlation between the molecules found and the observed bioactivity we used two different chemometrics tools: NP Analyst, an open online data integration platform for predicting compound biological activities from complex mixtures (LEE et al., 2022), and DAFdiscovery, a notebook-based application that allows users to combine MS, NMR, and bioactivity data, or any combination of two, enabling data fusion and discovery of compounds of interest through correlation calculations (BORGES et al., 2022).

#### Acute toxicity bioactivity assay with Artemia salina

*Artemia salina* cysts were hatched for 24 h in artificial seawater under constant aeration and lighting, at an average temperature of 25°C. The motile nauplii were transferred, along with seawater, to 96-well plates. Biological assays were performed in triplicate, using potassium dichromate as a positive control and 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) as a negative control. A blank test was performed with an artificial seawater solution. The crude extract samples were dissolved in DMSO by serial dilution (100 mg mL<sup>-1</sup>, 50 mg mL<sup>-1</sup>, 10 mg mL<sup>-1</sup>, 5 mg mL<sup>-1</sup>, 1 mg mL<sup>-1</sup>, 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, and 0.01 mg mL<sup>-1</sup>). Fraction samples were prepared at a single concentration of 100 mg mL<sup>-1</sup>.

To each well were added 99  $\mu$ l of artificial seawater solution containing 10~20 nauplii of *A. salina* and 1  $\mu$ l of sample or control solution (final sample concentrations: 1000, 500, 100, 50, 10, 1, and 0.1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>; final concentration of negative control: 1%; final concentration of positive control: 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Plates were incubated at 25°C in the dark for 24h.

Dead nauplii were counted using a colony counter, and mortality was calculated as the ratio of dead nauplii to the total number of nauplii in the respective well. The  $LC_{50}$  was calculated by nonlinear regression according to Nguta (2011), and the dose-response function was calculated using the software Origin<sup>©</sup> 2019.

## Integration of MS-based metabolomics data and biological assay results

NP Analyst (https://www.npanalyst.org/) and Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery) were employed to integrate MS-based metabolomics data and bioactivity assay results. NP Analyst is an open online data integration platform for predicting compound biological activities from complex mixtures (LEE et al., 2022). DAFdiscovery is a notebook-based application that allows users to combine MS, NMR, and bioactivity data, or any combination of two, enabling data fusion and discovery of compounds of interest through correlation calculations (BORGES et al., 2022).

The fractions' MS data generated by the Classic Molecular Networking GNPS pipeline (same parameters aforementioned) were uploaded to the NP Analyst platform as .graphml network file. NP Analyst results were displayed as activity scores and cluster scores (a measure of the consistency of the activity profile).

For the DAF discovery platform, MS data and bioactivity results were uploaded as .csv files, pipeline option 4 (fusion of MS and bioassay data). The output was a scatter plot (retention time vs. m/z) that shows the correlation (bioactivity correlation: -1 to 1) between the MS profile and the bioactivity readouts.

#### RESULTS

#### Sample characterization

The total cyanobacteria biomass in the sample was composed of 71.75% Dolichospermum circinalis (Rabenhorst) Wacklin, Hoffmann & Komárek, 23.43% *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, 3.27% *Dolichospermum spiroidis* (Klebhan) Wacklin, L.Hoffmann & Komárek, and 1.21% *Microcystis panniformis* Komárek et al. When sampling, the pH was 7.38, and the water temperature was 21°C.

## Dereplication and annotation of compounds found in the extracts

MS/MS data from extracts and standard samples were analyzed using the Classic GNPS Molecular Network tool to generate a molecular network. This molecular network presented 464 nodes, 11 exclusives to the standard "seeds" analyzed with the extract samples. MS data were also analyzed by the GNPS tools DEREPLICATOR+ and the Network Annotation Propagation (NAP) to help with features' dereplication. Additionally, we manually checked for the features' exact masses, isotope patterns, and fragmentation patterns during the dereplication process. The combination of these tools revealed the presence of cyanopeptides of four different classes: microcystins (MC), microginins (MG), aeruginosins (AER), and cyanopeptolines (CP).

The MC cluster (Fig. 1A) revealed the presence of the microcystin variants MC-LR (m/z 995.5508 [M+H]<sup>+</sup> and m/z 498.2807 [M+2H]<sup>+</sup>), MC-YL (m/z 1002.5105 [M+H]<sup>+</sup>), MC-YR (m/z 1045.5435 [M+H]<sup>+</sup>), [D-Asp] MC-YR (m/z 1031.5229 [M+H]<sup>+</sup>), MC-WR (m/z 1068.5594 [M+H]<sup>+</sup>), [D-Asp3] MC-Hphr (m/z 1029.5434, MC-RR (m/z 519.7880 [M+2H]<sup>+</sup>), and [D-Asp3] MC-RR (m/z 512.7806 [M+2H]<sup>+</sup>).

The dereplication of the MG cluster (Fig. 1B) revealed the presence of cyanostatin B (m/z 754.4426 [M+H]<sup>+</sup>), microginin MG KR787 (m/z 788.4016 [M+H]<sup>+</sup>), and microginin MG KR604 (m/z 605.3879 [M+H]<sup>+</sup>). The proposition of the molecular formula C<sub>41</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> (error 5.40 ppm) for the feature of m/z 768.4589 [M+H]<sup>+</sup> was based on the mass difference of 14.0163 Da between that feature and cyanostatin B, suggesting that its molecular formula an additional -CH<sub>2</sub> group. This molecular formula was not found in databases, indicating the possibility of an unprecedented variant of the microginins class.

In the CP cluster (Fig. 1C), compounds CP 986 and CP 972 were annotated according to their spectral similarity to the standard seeds. Based on the mass difference of 14.0224 Da between CP 986 and the feature of m/z 1001.5777 [M+H]<sup>+</sup>, we proposed

the molecular formula  $C_{48}H_{76}N_{10}O_{13}$  ( $\Delta$  error -1.70 ppm). Based on the mass difference of 85.0476 Da between CP 986 and m/z 1072.6029 [M+H]<sup>+</sup>, the molecular formula  $C_{51}H_{81}N_{11}O_{14}$  ( $\Delta$  error -1.21 ppm) was proposed. Also, considering the difference of 28.0324 Da between compounds m/z 1072.6029 [M+H]<sup>+</sup> and m/z 1044.5702 [M+H]<sup>+</sup>, the formula  $C_{49}H_{77}N_{11}O_{14}$  ( $\Delta$  error -2,65 ppm) was suggested. The SIRIUS<sup>©</sup> tool supported this annotation and suggested the same molecular formulas for these compounds based on MS1 and MS2 data. The tool classified the first one as a depsipeptide, the second as a peptide, and the last as a cyclic depsipeptide. A search in the literature did not show studies that addressed these cyanopeptolins, indicating that they may be new analogs of this class.

In the AER cluster (Fig. 1D), aeruginosin 298A (m/z 605.3661 [M+H]<sup>+</sup>) was annotated based on spectral similarity to the standard. Based on the mass difference (83.9835 Da) between AER NAL2 (standard seed - C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) and the feature of m/z671.3392 [M+H]<sup>+</sup>, we proposed the molecular formula C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> ( $\Delta$  error -1.86 ppm). Based on the mass difference of 15.9968 Da between this last compound and the compound with m/z 655.3424 [M+H]<sup>+</sup>, we propose the molecular formula C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> ( $\Delta$  error -4.79 ppm). The SIRIUS<sup>©</sup> tool suggested the same molecular formulas for these features; but did not suggest a chemical class for them.

Figure 1. Molecular network cluster of features identified as the microcystins, microginins, cyanopeptolins, and aeruginosins.



Subtitle: (A) microcystins, (B) microginins, (C) cyanopeptolins, and (D) aeruginosins. Nodes display m/z values for each feature, putative molecular formula annotations, and calculated error ( $\Delta$ ). Molecular network generated by the GNPS platform and visualized and edited with the CytoScape<sup>©</sup> program.

#### Analysis of acute toxicity against the microcrustacean Artemia salina

Acute toxicity tests with *A. salina* showed more than 50% mortality of nauplii at concentrations  $\geq$  500 µg.mL<sup>-1</sup> of crude extract (Fig. 2); resulting in an LC50 = 278 µg.mL<sup>-1</sup> (± 33.7 µg.mL-1) (Nguta, 2011). Regarding the fractions, F2 and F3 were those that showed significant toxicity, causing 54% and 74% of nauplii mortality, respectively (Fig. 2).

Figure 2. Mortality (%) of A. salina nauplii for extracts



Subtitle: Dose-response mortality curves of nauplii of *Artemia* salina relative to mg dry biomass equivalents ( $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), following exposure to varying concentrations. Error bars represent one standard deviation (n = 3).

The extracts at 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> showed more than 50% of nauplii mortality. Based on these results, a dose-response curve was constructed, and the value of LC<sub>50</sub> = 278  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (± 33.7  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Regarding the fractions, F2 and F3 were the ones that showed toxicity, causing 54% and 74% of nauplii mortality, respectively (Fig. 6).

Figure 3. Mortality (%) of A. salina nauplii for fractions



Subtitle: Dose-response mortality curves of nauplii of *Artemia* salina relative to 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of fractions (gradient of isopropyl alcohol:H<sub>2</sub>O. F2 = 20:80; F3 = 40:60; F4 = 70:30; F5 = 90:10; and F6 =100:0). Error bars represent one standard deviation (n = 3).

## Prediction of compound biological activities

NP Analyst results (Job ID: e40a0786-bb6e-4274-992d-4c82665b37a8) attributed activity scores to the fractions' features that ranged from 0.04 to 0.54. Cluster scores were considered between 0.1 and 1. The activity scores varied widely between the different classes of cyanopeptides. However, within the same cyanopeptide class, the activity scores were consistent between the compounds. (Table 1). The MC activity scores range from 0.35 to 0.40. The highest score (0.40) was given to MC-WR m/z 1068.55 [M+ H]<sup>+</sup> and the lowest (0.35) to the variant [D-Asp]<sup>3</sup>MC-Hphr, both present in the active fractions F2 and F3. The MG and AER compounds received the lowest activity scores (0.10 - 0.18). The highest activity score (0.54) was attributed to the CP analogs.

The DAFdiscovery platform attributed bioactivity correlations between 0.31 and 0.99 to the fractions' features. Similar to observed in the NP Analyst analysis, AER compounds received the lowest bioactivity correlation scores, and compounds of the CP class received the highest ones by this platform. Compounds from the MC class also received similar bioactivity correlation scores (0.54 - 0.58) except for MC-YR (0.44) and MC-RR (0.99). Still, unlike the

NP Analyst results, cyanostatin B and MG KR787 received a high bioactivity correlation value,

0.81 and 0.75, respectively.

m/7	Putative compound/class	NP Analyst		DAFdiscovery	
111/ Z	r diative compound/class	Activity Score	Cluster Score	Bioactivity correlation	Fraction
519.7854	MC-RR/microcystin	0.08	0.17	0.99	F2, F3, F4, F5, F6
605.36	Aeruginosin 298A/aeruginosin	0.18	0.4	0.31	F2, F3, F6
754.4456	Cyanostatin B/microginin	0.1	0.21	0.81	F2, F3, F4, F5
973.528	CP 972/cyanopeptolin	0.54	1	0.71	F2, F3
987.542	CP 986/cyanopeptolin	0.54	1	0.76	F2, F3
788.4016	MG KR787/microginin	0.18	0.4	0.75	F2, F3, F4
995.55	MC-LR/microcystin	0.39	1	0.58	F2, F3
1002.51	MC-YL/microcystin	0.39	1	0.44	F2, F3
1029.53	[D-Asp3] MC- HphR/microcystin	0.35	1	0.57	F2, F3
1044.56	C49H77N11O14*/cyanopeptolin	0.54	1	0.81	F3
1045.54	MC-YR/microcystin	0.39	1	0.54	F2, F3
1068.55	MC-WR/ microcystin	0.4	1	0.55	F2, F3
1072.59	$C_{51}H_{81}N_{11}O_{14}*/cyanopeptolin$	0.54	1	0.75	F3

Table 1. Activity score and bioactivity correlation attributed to different cyanopeptides by the NP Analyst and DAF Discovery platforms.

## DISCUSSION

In this study, we applied LC-MS-based metabolomics and bioinformatic tools (DAF Discovery and NP Analyst) to investigate the toxicity/bioactivity of cyanobacteria crude extract from a tropical and eutrophic reservoir. We hypothesized that merging data from untarget metabolomic analyses with toxicological assays could be applied to evaluate the toxicity of cyanopeptides contained in cyanobacteria biomass more quickly and efficiently than traditional ecotoxicological methods. Our results revealed the presence of compounds belonging to four cyanopeptides classes, microcystins, microginins, cyanopeptolins, and aeruginosins, in the tested cyanobacterial biomass. All these compound classes consist of biologically active metabolites that can influence the function of cellular enzymes, disrupt cellular signaling pathways, and induce tissue apoptosis, potentially leading to the mortality of organisms (Huang and Zimba, 2019). However, only microcystins figure in the

management legislation for freshwater legislation worldwide (Chorus and Welker, 2021). Both chemometric tools used in this work efficiently graded the biological activity of the compounds found in the cyanobacterial biomass, each one with its specific characteristics of the data interpretation method.

## **Biomass toxicity**

In aquatic systems, the cyanobacterial community produces a complex array of metabolites. All these compounds can be released mainly after the cyanobacterial cells' lysis (Rohrlack and Hyenstrand, 2007), affecting aquatic organisms (Pearson et al., 2016; Toporowska et al., 2014; Ferrão-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011; Metcalf and Codd, 2012; Osswald et al., 2007). Although cyanobacterial toxins and secondary metabolites co-occurrence are ecologically relevant (Fernandes et al., 2019), few studies explored the biological activities of crude extracts, especially in tropical systems. In this study, to assess the biomass ecotoxicity, we performed an acute toxicity test with crude extract from collected sample against A. salina. The evaluated biomass was composed predominantly of *Dolichospermum* spp. (~75%) and *Microcystis* spp. (~25%); and we have observed 100% mortality of A. salina nauplii with 500 µg.mL<sup>-1</sup> of crude extract after 24 hours of exposure, generating a  $LC_{50}$  of 278 mg.L<sup>-1</sup>. According to Nguta et al. (2011) criteria, the crude extract used in this study was categorized as moderately toxic  $(LC_{50} = 278 \ \mu g.mL^{-1})$ . The LC<sub>50</sub> provided by our test is higher than previously reported LC<sub>50</sub> values for *Microcystis* bloom extracts collected from tropical reservoirs in Morocco (ranging from 1 to 46 mg.L<sup>-1</sup>) that used similar evaluation methodology (Douma et al., 2017, 2010; Sabour et al., 2002). Although both Dolichospermum spp. and Microcystis spp. are known producers of microcystins (Chorus, 2001; Dreher et al., 2019), the variation in the results from acute testes can be attributed to the difference in the biomass species composition, the fluctuation of toxic clones in the samples, and the specific environmental conditions from which the biomass originated (Ibelings et al., 2021). For example, a comparison between extracts of Microcystis spp. and Planktothrix agardhii, which had similar total microcystin concentrations, revealed
significant differences in the profile of microcystin types and other oligopeptides, leading to varying toxic effects in the organisms tested (Pawlik-Skowrońska et al., 2019). Furthermore, stronger toxic effects were observed by the binary mixture of anabaenopeptin-B with MC-LR at a total concentration equal to the concentration of the compounds when tested individually (Pawlik-Skowrońska & Bownik, 2022). This wide variation in results reinforces the need for toxicity studies with crude extracts from biomass environmental samples. Although there are already several studies investigating the toxicity of cyanopeptides, the biomass used generally comes from cultures of isolated strains, and toxicity tests are mainly performed with extracts from a single strain. The problem with these methodologies is that they ignore the chemo-ecological complexity of the interaction of different compounds. Also, the tested concentrations will hardly be found in natural conditions, distancing the results obtained from environmental reality.

### **Cyanopeptide profile and Bioactivity Correlation**

The bioactivity correlation analysis in this study links different classes of cyanopeptides (MC, MG, CP, and AER) with the toxicity observed in the tests with *A. salina*. The cyanopeptides group with the highest diversity of congeners identified in our extract were MCs, with seven congeners. This class is the most widely described and includes diverse cyanobacterial toxins documented in the literature (Preece et al., 2017), with nearly 300 known congeners (Jones et al., 2020). All MC variants recorded in this study, except the MC-YL, already have an oral LC<sub>50</sub> described in the literature, ranging from 50 (-LR) to 600 (-RR)  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> of body weight intraperitoneal injection in mice bioassays (Botes et al., 1985; del Campo and Ouahid, 2010; Kusumi et al., 1987; Meriluoto et al., 1989; Namikoshi et al., 1992; Stoner et al., 1989). For all MC analogs found in our extract, except the MC-RR, results from the NP Analyst platform gave the second-highest activity scores (0.35 - 0.40). The DAFdiscovery platform results attributed bioactivity correlations to the MC variants ranging from 0.44 (-YL) to 0.99 (-RR). Although MC-RR showed the lowest activity score in the NP Analyst analysis (0.08), the bioactivity correlation in the DAFdiscovery analyses presented the highest

value (0.99). This variation is probably due to the different algorithms used by each platform. NP Analyst considers the molecule's presence in the active fraction(s) and its absence in the inactive ones (cluster score). If a molecule is present only in the active fraction, it will have a higher score, and if it also appears in inactive fractions, even at much lower concentrations, it will receive a lower score. The DAFdiscovery platform considers the peak intensity in each fraction. High concentrations in bioactive fractions pull the bioactivity correlation up. In a small number of samples, if a compound has a high concentration in a given bioactive fraction and a low concentration in a non-active fraction, it will still have a high bioactivity correlation.

The MG are linear peptides that vary, with few exceptions, from four to six amino acids and generally present a decanoic acid derivative, Ahda (3-amino-2-hydroxy-decanoic acid), at the N-terminus (Welker and Von Döhren, 2006). Approximately 40 congeners are known, and this number is still increasing (Lodin-Friedman and Carmeli, 2018; Riba et al., 2019; Ujvárosi et al., 2020). In this work, we found the presence of cyanostatin B (m/z 754.4426 [M+H]<sup>+</sup>), microginin MG KR787 (m/z 788.4016 [M+H]<sup>+</sup>), microginin MG KR604 (m/z 605.3879 [M+H]<sup>+</sup>). We proposed the molecular formula C<sub>41</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> to the feature m/z 768.4589 [M+H]<sup>+</sup> that may be a potentially new MG congener.

MG analogs have been named as microginines, nostoginins, oscillaginins and cyanostatins, according to their producing species (Bagchi et al., 2016; Ujvárosi et al., 2020). These compounds are inhibitors of zinc metalloprotease and are known to be inhibitors of aminopeptidase M (APM), leucine aminopeptidase (LAP) and angiotensinconverting enzyme (ACE) (Ishida et al., 2000; Lifshits et al., 2011; Lodin-Friedman and Carmeli, 2018; Sano et al., 2005). The mechanism of enzyme inhibition is mainly attributed to the Ahda portion, although NeMe-Tyr-Tyr at the C terminus favors binding to the active site of the enzymes (Ishida et al., 2000). Data on the toxic activity of MG on animal models are scarce. Ujvárosi et al. (2020) determined *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of four MG congeners (cyanostatin B, MG FR3, MG GH787, MGL 402) and a well-characterized cyanobacterial extract encompassing these metabolites. In that study, the extract significantly affected the viability of cells in the MTT assay with the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). Also, the extract and all tested congeners induced DNA strand breaks. Fernandes et al. (2019) tested a crude extract of *Microcystis* sp. containing several MG. They demonstrated its acute toxicity in larvae of a tropical freshwater fish *Astyanax altiparanae*, reporting numerous abnormalities, including abdominal and pericardial edema. In our study, the DAFdiscovery shows a high bioactivity correlation (0.75 - 0.81) for MG compounds. However, a low activity score (0.1 - 0.18) was assigned by NP Analyst. This difference is likely due to the different parameters considered by each algorithm. For example, MG KR787 appears in higher concentration in the active fraction F3, which gives it a high correlation of activity in DAFdiscovery. However, it is also present, although at a lower concentration, in the non-active fraction F4, which makes it assigned a low activity score by the NP Analyst. The scores assigned to the cyanostatin B variant followed the same reasoning.

The CP are a broad group of cyclic depsipeptides that can be produced by various cyanobacterial genera, including *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc and Microcystis* (Welker and Von Döhren, 2006). These molecules comprise a six-amino acid ring and a side chain with one or two residues. All CP are characterized by 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) in position 3 (Mazur-Marzec et al., 2018). All positions in the ring, except Thr and Ahp, can be occupied by variable amino acids, giving the CP a wide structural variability (Welker and Von Döhren, 2006).

Certain CP have demonstrated inhibitory effects on serine proteases, including elastase, chymotrypsin, thrombin, and trypsin (Gesner-Apter and Carmeli, 2009; Linington et al., 2008; Weckesser et al., 1996). In our study, both platforms attributed to CP compounds the highest bioactivity correlations (0.54 by NP Analyst and 0.71 - 0.81 by DAFdiscovery), including the potentially novel analogs ( $C_{49}H_{77}N_{11}O_{14}$  and  $C_{51}H_{81}N_{11}O_{14}$ ). These results provide compelling evidence supporting the hypothesis that CP are indeed one of the classes that should be considered among the monitoring cyanotoxins. Furthermore, these findings illustrate the importance of environmental monitoring for discovering new cyanopeptides congeners. Gademann et al. (2010) has already shown that CP 1020, isolated from *Microcystis*, was toxic ( $LC_{50} = 8.8 \,\mu$ M) to the freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* in similar concentrations to some well-known MC. Additionally, Faltermann et al. (2014) pointed out that exposure of zebrafish embryos to different concentrations of CP 1020 resulted in transcriptional alterations of genes related to several biological pathways.

The AER is a class of linear tetrapeptides with uncommon 2-carboxy-6hydroxyoctahydroindole (Choi) and (4-hydroxy) phenyl lactic acid (Hpla) moieties and an arginine derivative at the *C terminus* (Ishida et al., 1999). AER is a cyanopeptide family with some potent inhibitors of serine proteases (Ersmark et al., 2008). The inhibitory mechanisms have been elucidated by X-ray crystallography of aeruginosin-protease complexes (Hicks et al., 2006). In our analysis, the presence of AER 298A was correlated with bioactivity by both platforms (scores 0.18 and 0.31 using NP Analyst and DAF discovery, respectively). Scherer et al., (2016), stated that some AER variants match the well-known MC-LR in the toxicity against crustaceans. Their studies reported a  $LC_{50} = 34.5 \mu M$  for the synthetic AER 828A, a chlorosulfopeptide analogue, against the organism *T. platyurus*. Similar results were found by Kohler et al. (2014), that reported a  $LC_{50}$  value of 22.4  $\mu M$  for this AER variant against *T. platyurus*.

### Using chemometric tools to predict the toxicity of compounds in complex mixtures

In this study, we used DAFdiscovery and NP Analyst tools to investigate the bioactivity correlation of different cyanopeptides in a complex extract from a biomass collected in a tropical reservoir. Both tools proved to be effective, each one with its Bioinformatics tools are suggested as a cost-effective particularities. and straightforward way to determine if a compound contributes to toxicity in a complex extract without the need to isolate the compound or use standards for biological tests (Atasanov et al., 2021). The bioactivity correlation results from this study reinforce that different cyanopeptides in the sample contribute to the overall toxicity observed. Based on current literature, MC was expected to exhibit the highest bioactive activity. However, to our surprise, microginins, aeruginosins, and, mainly, cyanopeptolins also strongly correlated with the toxicity observed in our tests. This study also suggested that the biomass extract contained potentially novel cyanopeptolins with high bioactivity correlations. Furthermore, we cannot rule out the synergistic action of these substances, as we are talking about a complex extract and not isolated compounds. Regarding the particularities of the tested tools, DAFdiscovery is suggested when the number of samples (pre-fractions) is high and when the separation achieved between each extract or fraction is inefficient since it considers the ionized compound's peak intensity in each sample. In turn, NP Analyst works better for a small number of samples and when the separation of compounds occurs efficiently, as the tool tends to smooth the correlation values if a compound appears in non-active fractions. Although this can lead to underestimating the molecule's toxicity, NP Analyst also provides another index, the cluster compound value, that helps interpret the results.

### CONCLUSION

Metabolomics and chemometric tools proved be a promising alternative for identifying cyanopeptides congeners and studying the toxicity/bioactivity in complex extracts and fractions without the need to isolate the compounds in a less time-andreagent consuming process. Both tools, DAFdiscovery and NP Analyst, used in this study contributed substantially to the toxicity assessment process, and the choice between them will depend on the user's data (e.g. number of samples, efficiency in the pre-fractionation process). We observed that both results could be complementary in the toxicity assessment. The findings presented herein highlight that the toxicity observed in the cyanobacteria biomass can not solely attributed to MC, underscoring the importance of thoroughly evaluating the (eco)toxicological hazards associated with various classes of cyanopeptides.

#### REFERENCES

ATASANOV, A.G., ZOTCHEV, S.B., DIRSCH, V.R., 2021. Natural Products in drug discovery: advances and opportunities. Nat. Rev. Drug Discov. 2021, 20 (3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z.

AZEVEDO, S.M., CARMICHAEL, WAYNE W JOCHIMSEN, E.M., RINEHART, K.L., LAU, S., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. Toxicology 182, 441–446. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2

BAGCHI, S.N., SONDHIA, S., AGRAWAL, M.K., BANERJEE, S., 2016. An angiotensin-converting enzyme-inhibitory metabolite with partial structure of microginin in a cyanobacterium Anabaena fertilissima CCC597, producing fibrinolytic protease. J Appl Phycol 28, 177–180. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0541-5

BAUMANN, H.I., JÜTTNER, F., 2008. Inter-annual stability of oligopeptide patterns of Planktothrix rubescens blooms and mass mortality of Daphnia in Lake Hallwilersee. Limnologica 38, 350–359. https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.05.010

BEVERSDORF, L., WEIRICH, C., BARTLETT, S., MILLER, TODD., 2017. Variable Cyanobacterial Toxin and Metabolite Profiles across Six Eutrophic Lakes of Differing Physiochemical Characteristics. Toxins 9, 62. https://doi.org/10.3390/toxins9020062

BORGES, R.M., DAS NEVES COSTA, F., CHAGAS, F.O., TEIXEIRA, A.M., YOON, J., WEISS, M.B., CRNKOVIC, C.M., PILON, A.C., GARRIDO, B.C., BETANCUR, L.A., FORERO, A.M., CASTELLANOS, L., RAMOS, F.A., PUPO, M.T., KUHN, S., 2022. Data Fusion -based Discovery compound annotation and bioactive compound discovery across diverse spectral data. Phytochemical Analysis pca.3178. https://doi.org/10.1002/pca.3178

BOTES, D.P., WESSELS, P.L., KRUGER, H., RUNNEGAR, M.T.C., SANTIKARN, S., SMITH, R.J., BARNA, J.C.J., WILLIAMS, D.H., 1985. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from Microcystis aeruginosa. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 2747. https://doi.org/10.1039/p19850002747

BOUAÏCHA, N., MILES, C.O., BEACH, D.G., LABIDI, Z., DJABRI, A., BENAYACHE, N.Y., NGUYEN-QUANG, T., 2019. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. Toxins 11, 1–40.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M., AN, J.S., MOLICA, R.J., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Perspectives 109, 663–668. https://doi.org/10.1289/ehp.01109663

CATHERINE, A., BERNARD, C., SPOOF, L., BRUNO, M., 2017. Microcystins and Nodularins, in: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Eds.), Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 107–126. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11

CHORUS, I., WELKER, M. (Eds.), 2021. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, Second edition. ed. CRC Press, an imprint of Informa, Boca Rataon.

DEL CAMPO, F.F., OUAHID, Y., 2010. Identification of microcystins from three collection strains of Microcystis aeruginosa. Environmental Pollution 158, 2906–2914. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.018

DOUMA, M., MANAUT, N., EL KHALLOUFI, F., OUDRA, B., LOUDIKI, M., 2017. Journal of Materials and Environmental Sciences. Toxicity assessment and detection of cyanobacterial toxins (Microcystins) in a Mediterranean natural lake (Dayete Aoua, Morocco) 8, 3247–3251.

DOUMA, M., OUAHID, Y., CAMPO, F.F. DEL, LOUDIKI, M., MOUHRI, KH., OUDRA, B., 2010. Identification and quantification of cyanobacterial toxins (microcystins) in two Moroccan drinking-water reservoirs (Mansour Eddahbi, Almassira). Environ Monit Assess 160, 439–450. https://doi.org/10.1007/s10661-008-0708-5

E. CHLIPALA, G., MO, S., ORJALA, J., 2011. Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery. CDT 12, 1654–1673. https://doi.org/10.2174/138945011798109455

ERSMARK, K., DEL VALLE, J.R., HANESSIAN, S., 2008. Chemistry and Biology of the Aeruginosin Family of Serine Protease Inhibitors. Angew. Chem. Int. Ed. 47, 1202–1223. https://doi.org/10.1002/anie.200605219

FAASSEN, E.J., LÜRLING, M., 2013. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. Marine Drugs 11. https://doi.org/10.3390/md11072643

FALTERMANN, S., ZUCCHI, S., KOHLER, E., BLOM, J.F., PERNTHALER, J., FENT, K., 2014. Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms : Global transcriptome analysis in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology 149, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.018

FERNANDES, K., GOMES, A., CALADO, L., YASUI, G., ASSIS, D., HENRY, T., FONSECA, A., PINTO, E., 2019a. Toxicity of Cyanopeptides from Two Microcystis Strains on Larval Development of Astyanax altiparanae. Toxins 11, 220. https://doi.org/10.3390/toxins11040220

FERNANDES, K., GOMES, A., CALADO, L., YASUI, G., ASSIS, D., HENRY, T., FONSECA, A., PINTO, E., 2019B. Toxicity of Cyanopeptides from Two Microcystis Strains on Karval Development of Astyanax altiparanae. Toxins 11, 1–18. https://doi.org/10.3390/toxins11040220

FERRÃO-FILHO, A. DA S., KOZLOWSKY-SUZUKI, B., 2011. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. Marine Drugs 9, 2729–2772. https://doi.org/10.3390/md9122729

GADEMANN, K., PORTMANN, C., BLOM, J.F., ZEDER, M., JU, F., 2010. Multiple Toxin Production in the Cyanobacterium Microcystis : Isolation of the Toxic Protease Inhibitor Cyanopeptolin 1020. Journal of Natural Products 73, 980–984. https://doi.org/10.1021/np900818c

GESNER-APTER, S., CARMELI, S., 2009. Protease Inhibitors from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Nat. Prod. 72, 1429–1436. https://doi.org/10.1021/np900340t

GKELIS, S., HARJUNPÄÄ, V., LANARAS, T., SIVONEN, K., 2005. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. Environ. Toxicol. 20, 249–256. https://doi.org/10.1002/tox.20105

GREER, B., MAUL, R., CAMPBELL, K., ELLIOTT, C.T., 2017. Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms. Analytical and Bioanalytical Chemistry 409, 4057–4069. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0352-4

HICKS, L.M., MOFFITT, M.C., BEER, L.L., MOORE, B.S., KELLEHER, N.L., 2006. Structural Characterization of *in Vitro* and *in Vivo* Intermediates on the Loading Module of Microcystin Synthetase. ACS Chem. Biol. 1, 93–102. https://doi.org/10.1021/cb500007v

HILBORN, E.D., ROBERTS, V.A., BACKER, L., DECONNO, E., EGAN, J.S., HYDE, J.B., NICHOLAS, D.C., WIEGERT, E.J., BILLING, L.M., DIORIO, M., MOHR, M.C., HARDY, J.F., WADE, T.J., YODER, J.S., HLAVSA, M.C., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014. Algal bloom-associated disease outbreaks among users of freshwater lakes--United States, 2009-2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 63, 11–15.

HUANG, I.-S., ZIMBA, P.V., 2019. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. Harmful Algae 83, 42–94. https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.008

IBELINGS, B.W., KURMAYER, R., AZEVEDO, S.M.F.O., WOOD, S.A., CHORUS, I., WELKER, M., 2021. Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins, in: Toxic Cyanobacteria in Water. Chorus I and Welker M.

ISHIDA, K., KATO, T., MURAKAMI, M., WATANABE, M., WATANABE, M.F., 2000. Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Tetrahedron 56, 8643–8656. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00770-5

ISHIDA, K., OKITA, Y., MATSUDA, H., OKINO, T., MURAKAMI, M., 1999. Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Tetrahedron 55, 10971–10988. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00621-3

JANSSEN, E.M.L., 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. Water Research 151. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048

JONES, M.R., PINTO, E., TORRES, M.A., DÖRR, F., MAZUR-MARZEC, H., SZUBERT, K., TARTAGLIONE, L., DELL'AVERSANO, C., MILES, C.O., BEACH, D.G., MCCARRON, P., SIVONEN, K., FEWER, D.P., JOKELA, J., JANSSEN, E.M.L., 2020. Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.04.16.038703

KEIL, C., FORCHERT, A., FASTNER, J., SZEWZYK, U., ROTARD, W., CHORUS, I., KRÄTKE, R., 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a Planktothrix bloom and two laboratory strains. Water Research 36, 2133–2139. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00417-1

KEMP, A., JOHN, J., 2006. Microcystins associated withMicrocystis dominated blooms in the Southwest wetlands, Western Australia. Environ. Toxicol. 21, 125–130. https://doi.org/10.1002/tox.20164

KODANI, S., SUZUKI, S., ISHIDA, K., MURAKAMI, M., 1999. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). FEMS Microbiology Letters 178, 343–348. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08697.x

KOHLER, E., GRUNDLER, V., HÄUSSINGER, D., KURMAYER, R., GADEMANN, K., PERNTHALER, J., BLOM, J.F., 2014. The toxicity and enzyme activity of a chlorine and sulfate containing aeruginosin isolated from a non-microcystin-producing Planktothrix strain. Harmful Algae 39, 154–160. https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.07.003

KUSUMI, T., OOI, T., WATANABE, M.M., TAKAHASHI, H., KAKISAWA, H., 1987. Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga). Tetrahedron Letters 28, 4695–4698. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96600-0

LAUTIÉ, E., RUSSO, O., DUCROT, P., BOUTIN, J.A., 2020. Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. Front. Pharmacol. 11, 397. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00397

LE MANACH, S., KHENFECH, N., HUET, H., QIAO, Q., DUVAL, C., MARIE, A., BOLBACH, G., CLODIC, G., DJEDIAT, C., BERNARD, C., EDERY, M., MARIE, B., 2016. Gender-Specific Toxicological Effects of Chronic Exposure to Pure Microcystin-LR or Complex *Microcystis aeruginosa* Extracts on Adult Medaka Fish. Environ. Sci. Technol. 50, 8324–8334. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01903

LEE, S., VAN SANTEN, J.A., FARZANEH, N., LIU, D.Y., PYE, C.R., BAUMEISTER, T.U.H., WONG, W.R., LININGTON, R.G., 2022. NP Analyst: An Open Online Platform for Compound Activity Mapping. ACS Cent. Sci. 8, 223–234. https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01108

LIFSHITS, M., ZAFRIR-ILAN, E., RAVEH, A., CARMELI, S., 2011. Protease inhibitors from three fishpond water blooms of Microcystis spp. Tetrahedron 67, 4017–4024. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.04.042

LININGTON, R.G., EDWARDS, D.J., SHUMAN, C.F., MCPHAIL, K.L., MATAINAHO, T., GERWICK, W.H., 2008. Symplocamide A, a Potent Cytotoxin and Chymotrypsin Inhibitor from the Marine Cyanobacterium *Symploca* sp. J. Nat. Prod. 71, 22–27. https://doi.org/10.1021/np070280x

LODIN-FRIEDMAN, A., CARMELI, S., 2018. Microginins from a Microcystis sp. Bloom Material Collected from the Kishon Reservoir, Israel. Marine Drugs 16, 78. https://doi.org/10.3390/md16030078

MAZUR-MARZEC, H., FIDOR, A., CEGŁOWSKA, M., WIECZERZAK, E., KROPIDŁOWSKA, M., GOUA, M., MACASKILL, J., EDWARDS, C., 2018. Cyanopeptolins with trypsin and chymotrypsin inhibitory activity from the cyanobacterium nostoc edaphicum CCNP1411. Marine Drugs 16, 1–19. https://doi.org/10.3390/md16070220

MEREL, S., WALKER, D., CHICANA, R., SNYDER, S., BAURÈS, E., THOMAS, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environment International 59, 303–327. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013

MERILUOTO, J.A.O., SANDSTRÖM, A., ERIKSSON, J.E., REMAUD, G., GREY GRAIG, A., CHATTOPADHYAYA, J., 1989. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium Oscillatoria agardhii. Toxicon 27, 1021–1034. https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90153-0

METCALF, J.S., CODD, G.A., 2012. Ecology of Cyanobacteria II, in: Cyanotoxins. Brian A. Whitton, pp. 651–675.

MOWE, M.A.D., MITROVIC, S.M., LIM, R.P., FUREY, A., YEO, D.C.J., 2014. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. J Limnol 73. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.1005

NAMIKOSHI, M., RINEHART, K.L., SAKAI, R., STOTTS, R.R., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R., CARMICHAEL, W.W., EVANS, W.R., 1992. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria Microcystis aeruginosa, Microcystis viridis, and Microcystis wesenbergii: nine new microcystins. J. Org. Chem. 57, 866–872. https://doi.org/10.1021/jo00029a016

NGUTA, J.M, MBARIA, J. M., GAKUYA, D. W., GATHUMBI, P. K., KABASA, J. D., KIAMA, S. G., 2011. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae).

OLIVON, F., ALLARD, P.-M., KOVAL, A., RIGHI, D., GENTA-JOUVE, G., NEYTS, J., APEL, C., PANNECOUQUE, C., NOTHIAS, L.-F., CACHET, X., MARCOURT, L., ROUSSI, F., KATANAEV, V.L., TOUBOUL, D., WOLFENDER, J.-L., LITAUDON, M., 2017. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks. ACS Chem. Biol. 12, 2644–2651. https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00413

O'NEIL, J.M., DAVIS, T.W., BURFORD, M.A., GOBLER, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae 14. https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027

OSSWALD, J., RELLÁN, S., CARVALHO, A.P., GAGO, A., VASCONCELOS, V., 2007. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish— Cyprinus carpio L. Toxicon 49, 693–698. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.010

PAERL, H.W., HALL, N.S., CALANDRINO, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. Science of the Total Environment 409. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.001

PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., TOPOROWSKA, M., MAZUR-MARZEC, H., 2019. Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters Brachionus calyciflorus and Daphnia pulex. Environ Sci Pollut Res 26, 11793–11804. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04543-1

PEARSON, L.A., DITTMANN, E., MAZMOUZ, R., ONGLEY, S.E., D'AGOSTINO, P.M., NEILAN, B.A., 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. Harmful Algae 54, 98–111. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002

PREECE, E.P., HARDY, F.J., MOORE, B.C., BRYAN, M., 2017. A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. Harmful Algae 61, 31–45. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006

PUDDICK, J., PRINSEP, M.R., WOOD, S.A., KAUFONONGA, S.A.F., CARY, S.C., HAMILTON, D.P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. Marine Drugs 12. https://doi.org/10.3390/md12115372

RIBA, M., KISS-SZIKSZAI, A., GONDA, S., BOROS, G., VITÁL, Z., BORSODI, A.K., KRETT, G., BORICS, G., UJVÁROSI, A.Z., VASAS, G., 2019. Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp. Toxins 11, 288. https://doi.org/10.3390/toxins11050288

ROHRLACK, T., HYENSTRAND, P., 2007. Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa (Chroococcales, Cyanophyceae). Phycologia 46, 277–283. https://doi.org/10.2216/06-14.1

SABOUR, B., LOUDIKI, M., OUDRA, B., VASCONCELOS, V., MARTINS, R., OUBRAIM, S., FAWZI, B., 2002. Toxicology of aMicrocystis ichthyoblabe waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). Environ. Toxicol. 17, 24–31. https://doi.org/10.1002/tox.10028

SANO, T., TAKAGI, H., MORRISON, L.F., METCALF, J.S., CODD, G.A., KAYA, K., 2005. Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. Phytochemistry 66, 543–548. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.001

SIVONEN, K., JONES, G.J., 1999. CYANOBACTERIAL TOXINS. IN: CHORUS, I., BARTRAM, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management., E and FN Spon, London, pp. 41–111.

SMUTNÁ, M., BABICA, P., JARQUE, S., HILSCHEROVÁ, K., MARŠÁLEK, B., HAEBA, M., BLÁHA, L., 2014. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in Daphnia magna and the role of microcystins. Toxicon 79, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.009

STONER, R.D., ADAMS, W.H., SLATKIN, D.N., SIEGELMAN, H.W., 1989. The effects of single l-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystins. Toxicon 27, 825–828. https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90051-2

TOPOROWSKA, M., PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., KALINOWSKA, R., 2014. Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-a on benthic larvae of Chironomus spp. (Diptera: Chironomidae). Eur. J. Entomol. 111, 83–90. https://doi.org/10.14411/eje.2014.010

UJVÁROSI, A.Z., HERCOG, K., RIBA, M., GONDA, S., FILIPIČ, M., VASAS, G., ŽEGURA, B., 2020. The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Chemosphere 240, 124880. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880

VAN HASSEL, W.H.R., ANDJELKOVIC, M., DURIEU, B., MARROQUIN, V.A., MASQUELIER, J., HUYBRECHTS, B., WILMOTTE, A., 2022. A Summer of Cyanobacterial Blooms in Belgian Waterbodies: Microcystin Quantification and Molecular Characterizations. Toxins 14, 61. https://doi.org/10.3390/toxins14010061

VASCONCELOS, V., 2001. Freshwater cyanobacteria and their toxins in Portugal, in: Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. Chorus I, Berlin, pp. 62–67.

WECKESSER, J., MARTIN, C., JAKOBI, C., 1996. Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria. Systematic and Applied Microbiology 19, 133–138. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80038-5

WELKER, M., CHRISTIANSEN, G., VON DÖHREN, H., 2004. Diversity of coexisting Planktothrix (Cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microystins and other oligopeptides. Arch Microbiol 182, 288–298. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0711-3

WELKER, M., VON DÖHREN, H., 2006. Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiol Rev 30, 530–563. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x

# **DISCUSSÃO GERAL**

Por meio de experimentos em escala laboratorial (microcosmos) e *in situ* (mesocosmos) testamos a efetividade e avaliamos efeitos adversos sob microcistinas de técnicas de floculação e sedimentação. Entretanto, antes de efetivamente definirmos e testarmos intervenções de mitigação efetivas precisávamos reconhecer a dinâmica das populações de cianobactérias e seu perfil metabolômico (cianopaptídeos) nos sistemas escolhidos como 'modelos'; e compreender as relações entre cianobactéria, metabólitos e variáveis ambientais.

Como primeira etapa, monitoramos mensalmente por um ano o Reservatório do Funil e a Lagoa de Jacarepaguá. Por meio de espectrometria de massas, identificamos em ambos os ambientes, não apenas MCs, mas outros cianopeptídeos com atividades biológicas já descritas na literatura (ex., microgininas, cianopeptolinas, microviridinas, aeruginosinas). Ao todo, registramos no Reservatório do Funil 31 diferentes peptídeos, enquanto na Lagoa de Jacarepaguá foram aproximadamente 21. Infelizmente, apenas as MCs puderam ser quantificadas; isso devido a indisponibilidade de padrões analíticos para os demais compostos. Porém, independentemente da quantificação, foi possível observar sazonalidade na presença destes compostos, tal qual observado para MCs e em ambos os ambientes.

Em relação as espécies potencialmente produtoras de MCs, *Microcystis aeruginosa* foi indicada, através de análises correlacionais, como principal potencial produtor para ambos os ambientes estudados. No Reservatório do Funil, especificamente, o aumento da contribuição relativa de *Microcystis* trouxe consigo a aumento da concentração total de MC e o aparecimento da variante -LR, congênere mais tóxico dentre as variantes já identificadas. É valido ressaltar que, no reservatório, a espécie de cianobactéria dominante durante o estudo foi *Dolichospermum circinalis*, também considerada potencialmente produtora de MCs. Na Lagoa de Jacarepaguá, registramos uma mudança de dominância, onde *Planktothrix isothrix* substituiu *M. aeruginosa*; acreditamos ser o motivo para a redução da concentração de MCs naquele ambiente. As análises correlacionais entre MCs, MC-produtores e variáveis ambientais evidenciaram a complexidade dessas interações; chuva, nutrientes e temperatura da água são os fatores que melhor se relacionaram com MCs, porém de forma distinta para

os dois ambientes. A chuva, por exemplo, tem efeitos positivos sobre as cianobactérias e nas concentrações de MCs no reservatório; o aporte de água no sistema, traz consigo quantidades significativas de P, além de aumentar a profundidade do sistema, favorecendo estratificação térmica, e espécies de *Microcystis*. Já na laguna, a chuva também traz consigo grandes quantidades de P, ao mesmo tempo que 'lava' o sistema, reduzindo a biomassa de *Planktothrix* e MCs, e favorecendo a ressurgimento de *Microcystis* spp. Grande parte das divergências observadas nessas relações e entre os sistemas estudados, estão associadas às características limnológicas e geomorfológicas dos ambientes estudados (ex., profundidade, tempo de residência da água). E foram essas mesmas diferenças que fundamentaram a escolha destes ambientes como sistemas modelos; estas vinham ao encontram à uma de nossas principais perguntas: pode a mesma técnica de floculação e sedimentação ser eficiente em ambientes tão distintos?

Os testes com as técnicas de floculação e sedimentação de cianobactérias contemplaram os dois ambientes modelos e foram realizadas em micro e meso escalas. Nos testes em microcosmos, uma variedade maior de tratamentos e dosagens eram previamente testadas em laboratório, objetivando ajustar a técnica ao ambiente modelo. Nessa etapa também considerávamos, sobretudo, a espécie de cianobactéria dominante, a flutuabilidade dessa população, e a quantidade de P na água e sedimento. Esses fatores foram determinantes para escolha das dosagens do floculante e do adsorvente de P, assim como a opção do uso integrado de algicida.

No Reservatório do Funil, por exemplo, a efetividade da técnica variou entre os experimentos realizados em estações climáticas diferentes; na estação chuvosa PAC (4 mg Al L<sup>-1</sup>) + LMB (0,2 mg L<sup>-1</sup>) foi a combinação mais efetiva na remoção de biomassa; enquanto na estação seca a combinação de floculante e dois diferentes lastros, PAC (3 mg Al L<sup>-1</sup>) + LMB (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + LRS (0,1 mg L<sup>-1</sup>), mostrou maior efetividade. Já a remoção de MC intracelulares seguiu proporcionalmente o padrão observado para remoção de biomassa; a medição de MC extracelulares só ocorreu no experimento realizado na estação seca, onde registramos redução da concentração de MC dissolvidas. Em nenhum desses experimentos, tendo como proxy o valor de pH e eficiência do PSII, houve indícios de lise celular. Quanto as diferenças nos resultados entre experimentos de um mesmo sistema, atribuímos isso exclusivamente a espécie dominante e seu estado fisiológico no momento da realização dos testes. Na estação seca, a biomassa era dominada por *Raphidiopsis raciborskii* (70%) e *Microcystis* 

*aeruginosa* (30%), enquanto no período chuvoso a biomassa era dominada por *Dolichospermum circinalis* (71.75%) e *Microcystis aeruginosa* (23.43%). Além das diferenças morfológicas inerentes às espécies, a condição de flutuabilidade da população no momento dos testes é extremamente relevante, mas não determinante, na escolha da dosagem do floculante; *R. raciborskii* apresentava flutuabilidade positiva na ocasião dos experimentos, *D. circinalis*, contrariamente, apresentou flutuabilidade negativa no momento da escolha da dosagem de PAC, mas apresentou alteração dessa resposta no momento do experimento *Floc & Sink*. Embora o tratamento considerado mais efetivo tenha divergido entre estações climáticas – em relação às dosagens do floculante e quanto ao tipo de adsorvente de P usado – em ambos os momentos a técnica *Floc & Sink* foi eficiente em remover a biomassa de cianobactérias, MCs intracelulares e sem indícios de lise celular. Vale ressaltar ainda que, registramos indícios de adsorção de MCs dissolvidas por ação do LMB, em acordo com estudos recentes.

Já na Lagoa de Jacarepaguá, apenas um experimento de microcosmos foi realizado devido a pandemia de SARS-CoV-2. Nesse sistema, dominado por *P. isothrix* (99,3%), optamos por usar uma metodologia integrada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PAC+LMB (*Kill, Floc & Lock*) devido a espécie dominante; estudos prévios observaram ressuspensão de células de *Planktothrix* após floculação e sedimentação, e alternativamente sugeriram aplicação prévia do algicida (*Kill*) à técnica *Floc & Lock*. Assim, ao inviabilizar fisiologicamente a biomassa de cianobactérias, reduziríamos os riscos de retorno das células sedimentadas à coluna d'água. Em acordo com a literatura, após 24h, o tratamento *Kill, Floc & Lock* apresentou os melhores resultados de remoção de biomassa. Além disso, com exceção do Controle, as MCs dissolvidas na água usada no experimento foram reduzidas significativamente nos cinco tratamentos testados, ficando abaixo do limite de detecção. Não identificamos MCs intracelulares nas amostras desse experimento.

Nos experimentos de mesocosmos, testamos dois diferentes tratamentos para cada sistema modelo; tratamentos e dosagens utilizadas nesse ensaio tiveram como base os resultados obtidos nos testes em microcosmos. Nesses experimentos, além do aumento na dimensão/escala, monitoramos as unidades amostrais por aproximadamente 28 dias. Dessa forma, além da eficiência de remoção e da avaliação de risco de liberação de conteúdo celular, podemos avaliar a sucessão da comunidade de cianobactérias pós-tratamento.

No Reservatório do Funil, ao iniciarmos os experimentos em mesocosmos, a comunidade de cianobactérias era representada por R. raciborskii, Dolichospermum spp. e Microcystis spp.. Após 27 dias, a redução de clorofila de cianobactérias foi de 88 e 94% para os tratamentos PAC+LMB e PAC+LMB+LRS, respectivamente. Em relação aos potenciais produtores de MCs, R. raciborskii, Dolichospermum spp. e Microcystis spp., apresentaram valores de remoção entre 95 e 100% ao fim do experimento, e em ambos os tratamentos testados. Na avaliação de liberação de MCs, não identificamos MCs dissolvidas antes ou após aplicação dos tratamentos em nenhuma das unidades amostrais. Entretanto, ao avaliar o conteúdo celular da biomassa, identificamos cinco variantes de MCs (-RR, - LR, -LY, -YR, [D-Asp<sup>3</sup>] LR), que 24h após aplicação dos tratamentos foram reduzidas em aproximadamente 98%. Nas amostragens seguintes, a concentração de MCs intracelulares apresentou tendência de crescimento, incluindo aumento da proporção e concentração da variante -LR; porém, ao fim do experimento, o tratamento PAC+LMB+LRS apresentou redução de 100% nas concentrações de MCs intracelulares, enquanto PAC+LMB apresentou redução final de 94%.

No experimento de mesocosmos realizado na Lagoa de Jacarepaguá, P. isothrix representava 99,3% da biomassa de cianobactérias. Diferentemente do observado nos testes em microcosmos, os tratamentos testados apresentaram valores inferiores de remoção; o tratamento  $H_2O_2$ +PAC+LMB apresentou redução final de 85% na biomassa, enquanto PAC+LMB removeu apenas 75%. A avaliação do biovolume dos potenciais produtores de MC, mostrou uma significativa redução da representatividade de P. isothrix, ao mesmo tempo que M. aeruginosa apresentou incremento em sua abundância. É evidente que, mesmo com valores de remoção inferiores ao microcosmos, estes resultados são promissores, especialmente considerando o estado de degradação do ambiente modelo. Além disso, não identificamos MCs dissolvidas na água antes ou após a aplicação dos tratamentos; na Lagoa de Jacarepaguá, um sistema raso e rico em partículas em suspensão, as concentrações de MCs dissolvidas sofrem grande influência (adsorção e dessorção) desse material, o que justificaria a não detecção de MCs dissolvidas em nosso experimento. Já na porção intracelular, identificamos duas variantes (-RR, -LY) ao longo do experimento. A variante -LY representava 100% da concentração total de MC antes da aplicação dos tratamentos, sendo totalmente reduzida 24h após aplicação em ambos os tratamentos. Já a variante -

RR surgiu na biomassa após 15 dias da aplicação, também para ambos os tratamentos, Controle e Lagoa. O aparecimento da variante MC-RR está diretamente relacionado com o aumento da abundância de *M. aeruginosa*; nossos dados ainda sugerem recrutamento de células dormentes de *M. aeruginosa* do sedimento à coluna d'água. Ao fim do experimento, apenas a biomassa do tratamento  $H_2O_2$ +PAC+LMB apresentava algum vestígio da variante – RR (~0,02 µg L<sup>-1</sup>). No tratamento PAC+LMB não identificamos MCs intracelulares após 27 dias. Concluindo, destacamos que, o método integrado ( $H_2O_2$ +PAC+LMB) não parece ter influenciado, positiva ou negativamente, na efetividade da remoção de biomassa; da mesma forma, a reaplicação de uma nova dosagem de floculante e lastro no tratamento PAC+LMB, não parece ter afetado a efetividade deste tratamento. Assim, apenas uma baixa dose de floculante (PAC) e um adsorvente de P em fase sólida (LMB), técnica *Floc & Sink*, opção mais simples e menos oneroso, já seria suficiente para atingir os mesmos resultados obtidos nesse experimento.

Por fim, tendo ciência que há uma grande necessidade de compreensão dos efeitos de outros cianopeptídeos além das MCs em cenários de exposição ambiental, utilizamos métodos metabolômicos e quimiométricos para avaliar o perfil químico de um extrato de cianobactérias obtido a partir de biomassa coletada no Reservatório do Funil. Nosso objetivo foi, primeiramente, identificar as principais classes de cianopeptídeos deste extrato e correlacionar sua presença com a toxicidade aguda contra o microcrustáceo *A. salina*. Tudo isso foi realizado sem a necessidade de isolamento de compostos, tornando o processo mais ágil; além de considerar simultaneamente os efeitos da presença concomitante de cianopeptídeos potencialmente tóxicos no mesmo extrato, como ocorre naturalmente no ambiente. Nossos resultados destacam que a toxicidade observada em nossos experimentos não é atribuída apenas às MCs, ressaltando a importância de avaliar minuciosamente os riscos (eco) toxicológicos associados às diversas classes de cianopeptídeos; enfatizando a necessidade imediata de uma avaliação de risco mais abrangente.

# CONCLUSÃO GERAL

Este estudo forneceu uma descrição detalhada da ocorrência e diversidade de microcistinas e outros cianopaptídeos em dois sistemas aquáticos tropicais brasileiros, estudo inédito para a América Latina; além de destacar que a toxicidade nos eventos de floração de cianobactérias não deve ser apenas atribuída às MCs, mas ao complexo de metabólitos produzidos por estes organismos. Já as técnicas de floculação e sedimentação, mostraram alta efetividade na remoção de biomassa, remoção de MCs intra e extracelulares e sem indícios de lise celular; embora, essa efetividade tenha variado minimamente entre estações climáticas, entre sistemas, ou ainda em dependência das espécies de cianobactérias que dominavam o sistema. Também evidenciamos que testes prévios em escala laboratorial são extremamente necessários para um ajuste fino e adequação do melhor material a ser usado e dosagem mais adequada ao sistema a ser tratado. Assim, concluímos que técnicas de floculação e sedimentação são alternativas viáveis e seguras na mitigação de florações tóxicas de cianobactérias em sistemas aquáticos tropicais; visando o melhoramento da qualidade de água e recuperação de ecossistemas aquáticos.

# REFERÊNCIAS

AGUILERA, A. et al. Bloom-Forming Cyanobacteria and Cyanotoxins in Argentina: A Growing Health and Environmental Concern. *Limnologica*, v. 69, p. 103–114, mar. 2018.

AGUILERA, A. et al. Cyanobacterial Bloom Monitoring and Assessment in Latin America. *Harmful Algae*, v. 125, p. 102429, jun. 2023.

ARRUDA, R. S. et al. 'Floc and Sink' Technique Removes Cyanobacteria and Microcystins from Tropical Reservoir Water. *Toxins*, v. 13, n. 6, p. 405, 8 jun. 2021.

AZEVEDO, S. M. F. O. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology*, v. 181–182, 2002.

BASHIR, F. et al. Cyanotoxins, Biosynthetic Gene Clusters, and Factors Modulating Cyanotoxin Biosynthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 9, p. 241, set. 2023.

BAUMANN, H. I.; JÜTTNER, F. Inter-Annual Stability of Oligopeptide Patterns of Planktothrix Rubescens Blooms and Mass Mortality of Daphnia in Lake Hallwilersee. *Limnologica*, v. 38, n. 3–4, p. 350–359, out. 2008.

BOUAÏCHA, N. et al. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, v. 11, n. 12, p. 714, 7 dez. 2019.

BOURNE, D. G. et al. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Research*, v. 40, n. 6, 2006.

CARMICHAEL, W. W. et al. Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria (Blue-Green Algae). *Toxicon*, v. 26, n. 11, p. 971–973, jan. 1988.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxinsJournal of Applied Bacteriology. [s.l: s.n.].

CHEN, L. et al. A Review of Reproductive Toxicity of Microcystins. *Journal of Hazardous Materials*, v. 301, p. 381–399, jan. 2016.

CHEN, L. et al. Responses of the Proteome and Metabolome in Livers of Zebrafish Exposed Chronically to Environmentally Relevant Concentrations of Microcystin-LR. *Environmental Science & Technology*, v. 51, n. 1, p. 596–607, 3 jan. 2017.

CHEN, L. et al. Effects of Acute Exposure to Microcystins on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA), -Gonad (HPG) and -Thyroid (HPT) Axes of Female Rats. *Science of The Total Environment*, v. 778, p. 145196, jul. 2021.

CHERNOFF, N. et al. The Comparative Toxicity of 10 Microcystin Congeners Administered Orally to Mice: Clinical Effects and Organ Toxicity. *Toxins*, v. 12, n. 6, p. 403, 18 jun. 2020. CHORUS, I.; BARTRAM, J. (ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London; New York: E & FN Spon, 1999.

COOKE, G. D. et al. Restoration and Management of Lakes and Reservoirs. [s.l: s.n.]

DAIL, H. et al. Sorption of dissolved microcystin using lanthanum-modified bentonite clay Molecular diversity of polar cyanobacteria View project Diverse aspects of testate amoebae evolution View projectArticle in Journal of Aquatic Plant Management. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.researchgate.net/publication/337227788">https://www.researchgate.net/publication/337227788</a>>.

DE FIGUEIREDO, D. R. et al. Microcystin-producing blooms - A serious global public health issue. Em: Ecotoxicology and Environmental Safety, *Anais*...2004.

DICK, G. J. et al. The Genetic and Ecophysiological Diversity of *Microcystis*. *Environmental Microbiology*, v. 23, n. 12, p. 7278–7313, dez. 2021.

DITTMANN, E. et al. Insertional Mutagenesis of a Peptide Synthetase Gene That Is Responsible for Hepatotoxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 779–787, nov. 1997.

DOKULIL, M. T.; TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, v. 438, n. 1/3, p. 1–12, 2000.

DOMINGOS, P. et al. First Report of Microcystin Production by Picoplanktonic Cyanobacteria Isolated from a Northeast Brazilian Drinking Water Supply. *Environmental Toxicology*, v. 14, n. 1, p. 31–35, fev. 1999.

DÖRR, F. A. et al. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*, 2010.

DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic Microcystis Sp. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25569, 28 set. 2011.

EDMONDSON, W. T. VOLLENWEIDER, R. A. 1968. Water management research. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Organization for Economic Co-operation and De. *Limnology and Oceanography*, v. 15, n. 1, 1970.

EDMONDSON, W. T.; ANDERSON, G. C.; PETERSON, D. R. Artificial Eutrophication of Lake Washington1. *Limnology and Oceanography*, v. 1, n. 1, p. 47–53, jan. 1956.

EDWARDS, C. et al. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere*, v. 73, n. 8, 2008.

ERRATT, K. J.; CREED, I. F.; TRICK, C. G. Harmonizing Science and Management Options to Reduce Risks of Cyanobacteria. *Harmful Algae*, v. 116, p. 102264, jul. 2022.

FASTNER, J.; HUMPAGE, A. HEPATOTOXIC CYCLIC PEPTIDES – MICROCYSTINS AND NODULARINS. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Ingrid Chorus and Martin Welker, 2021. p. 156–162.

FERRÃO-FILHO, A. da S. et al. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL: DINÂMICA SAZONAL E CONSEQÜÊNCIAS PARA O ZOOPLÂNCTON. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 346–365, jun. 2009.

FONSECA, J. R. et al. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 27, n. 1, p. 78–92, mar. 2015.

GOMES, A. M. da A. et al. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS EM UMA LAGOA COSTEIRA HIPEREUTRÓFICA DO RIO DE JANEIRO/RJ (BRASIL) E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA SAÚDE HUMANA. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 329–345, jun. 2009.

GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. Algae. 2<sup>a</sup> ed. [s.l: s.n.]

GUEDES, I. A. et al. Fluctuations in microcystin concentrations, potentially toxic Microcystis and genotype diversity in a cyanobacterial community from a tropical reservoir. *Harmful Algae*, v. 39, 2014.

HARADA, K. I. Recent advances of toxic cyanobacteria researches. *Journal of Health Science*, v. 45, n. 3, 1999.

HARKE, M. J.; GOBLER, C. J. Global Transcriptional Responses of the Toxic Cyanobacterium, Microcystis aeruginosa, to Nitrogen Stress, Phosphorus Stress, and Growth on Organic Matter. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.

HOLST, T. et al. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Water Research*, v. 37, n. 19, 2003.

HUANG, I.-S.; ZIMBA, P. V. Cyanobacterial Bioactive Metabolites—A Review of Their Chemistry and Biology. *Harmful Algae*, v. 83, p. 42–94, mar. 2019.

HUDNELL, H. K. (ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer, 2008.

HUISMAN, J. et al. CHANGES IN TURBULENT MIXING SHIFT COMPETITION FOR LIGHT BETWEEN PHYTOPLANKTON SPECIES. *Ecology*, v. 85, n. 11, p. 2960–2970, nov. 2004.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, 2018.

HUMBERT, J. F. Toxins of cyanobacteria. Em: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 371–379.

IBELINGS, B. W. et al. Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second ed. [s.l.] Chorus I and Welker M, 2021.

JÄHNICHEN, S.; LONG, B. M.; PETZOLDT, T. Microcystin Production by Microcystis Aeruginosa: Direct Regulation by Multiple Environmental Factors. *Harmful Algae*, v. 12, p. 95–104, dez. 2011.

JANG, M.-H.; JUNG, J.-M.; TAKAMURA, N. Changes in Microcystin Production in Cyanobacteria Exposed to Zooplankton at Different Population Densities and Infochemical Concentrations. *Limnology and Oceanography*, v. 52, n. 4, p. 1454–1466, jul. 2007.

JANSSEN, E. M. L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on cooccurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, v. 151, 2019.

JEPPESEN, E. et al. Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation - The successful strategy varies with lake size and climate. Em: Hydrobiologia, 1, *Anais*...2007.

JOCHIMSEN, E. M. et al. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 13, 1998.

JONES, M. R. et al. Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. *bioRxiv*, 2020.

KAEBERNICK, M. et al. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, 2000.

KAEBERNICK, M. et al. A Spontaneous Mutant of Microcystin Biosynthesis: Genetic Characterization and Effect on Daphnia. *Environmental Microbiology*, v. 3, n. 11, p. 669–679, nov. 2001.

KEIL, C. et al. Toxicity and Microcystin Content of Extracts from a Planktothrix Bloom and Two Laboratory Strains. *Water Research*, v. 36, n. 8, p. 2133–2139, abr. 2002.

KOPF, M. et al. Expression Profiling of the Bloom-Forming Cyanobacterium Nodularia CCY9414 under Light and Oxidative Stress Conditions. *The ISME Journal*, v. 9, n. 10, p. 2139–2152, out. 2015.

KOSTEN, S. et al. Lake and watershed characteristics rather than climate influence nutrient limitation in shallow lakesEcological Applications. [s.l: s.n.].

KOTAK, B. G. et al. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 53, n. 9, 1996.

LE MANACH, S. et al. Gender-Specific Toxicological Effects of Chronic Exposure to Pure Microcystin-LR or Complex *Microcystis Aeruginosa* Extracts on Adult Medaka Fish. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 15, p. 8324–8334, 2 ago. 2016.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. A Review on Application of Flocculants in Wastewater Treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 92, n. 6, p. 489–508, nov. 2014.

LI, D. et al. Seasonal dynamics of photosynthetic activity, Microcystis genotypes and microcystin production in Lake Taihu, China. *Journal of Great Lakes Research*, v. 43, p. 710–716, 2017.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 2, 2004.

LUCENA-SILVA, D. de et al. Removal Efficiency of Phosphorus, Cyanobacteria and Cyanotoxins by the "Flock & Sink" Mitigation Technique in Semi-Arid Eutrophic Waters. *Water Research*, v. 159, p. 262–273, ago. 2019.

LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, v. 158, 2020.

LÜRLING, M.; MUCCI, M.; WAAJEN, G. Removal of Positively Buoyant Planktothrix rubescens in Lake Restoration. *Toxins*, v. 12, 2020. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/b9885674398b2b4efabff4e5aec0f8496efa9939 >.

LÜRLING, M.; OOSTERHOUT, F. V. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research*, v. 47, n. 17, 2013.

MACHADO, J. et al. Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environmental Research*, v. 153, 2017.

MACKINTOSH, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, v. 264, n. 2, 1990.

MATTHIJS, H. et al. Existing and emerging cyanocidal compounds: new perspectives for cyanobacterial bloom mitigation. *Aquatic Ecology*, v. 50, p. 443–460, 2016.

MEISSNER, S.; FASTNER, J.; DITTMANN, E. Microcystin Production Revisited: Conjugate Formation Makes a Major Contribution: Production of Cyanobacterial Toxins Strongly Underestimated. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1810– 1820, jun. 2013.

MEREL, S. et al. State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. *Environment International*, v. 59, p. 303–327, set. 2013.

MIKALSEN, B. et al. Natural Variation in the Microcystin Synthetase Operon *mcyABC* and Impact on Microcystin Production in *Microcystis* Strains. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 9, p. 2774–2785, maio 2003.

MIRANDA, M. et al. The Efficiency of Combined Coagulant and Ballast to Remove Harmful Cyanobacterial Blooms in a Tropical Shallow System. *Harmful Algae*, v. 65, p. 27–39, maio 2017.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecologia Brasiliensis*, 2009.

NISHIZAWA, T. et al. Polyketide Synthase Gene Coupled to the Peptide Synthetase Module Involved in the Biosynthesis of the Cyclic Heptapeptide Microcystin. *Journal of Biochemistry*, v. 127, n. 5, p. 779–789, 1 maio 2000.

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*, v. 97, p. 26–38, jun. 2016.

NOYMA, N. P. et al. Coagulant plus Ballast Technique Provides a Rapid Mitigation of Cyanobacterial Nuisance. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0178976, 9 jun. 2017.

OH, H.-M. et al. Microcystin Production by *Microcystis Aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 176–179, jan. 2000.

O'NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, v. 14, 2012.

OTTEN, T. G. et al. The Molecular Ecology of *Microcystis* Sp. Blooms in the San Francisco Estuary. *Environmental Microbiology*, v. 19, n. 9, p. 3619–3637, set. 2017.

PADISÁK, J. et al. Laboratory analyses of cyanobacteria and water chemistry. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. 2nd edition ed. [s.l: s.n.]

PAERL, H. W. et al. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, v. 54, 2016.

PAERL, H. W. Mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. *Toxins*, v. 10, n. 2, 2018.

PAERL, H. W.; HALL, N. S.; CALANDRINO, E. S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment*, v. 409, n. 10, 2011.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, v. 65, n. 4, p. 995–1010, maio 2013.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, 2012.

PAN, G.; CHEN, J.; ANDERSON, D. M. Modified Local Sands for the Mitigation of Harmful Algal Blooms. *Harmful Algae*, v. 10, n. 4, p. 381–387, maio 2011.

PARK, H. D. et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology*, v. 16, n. 4, 2001.

PASSOS, L. S. et al. Cyanotoxins and Water Quality Parameters as Risk Assessment Indicators for Aquatic Life in Reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 241, p. 113828, ago. 2022.

PENG, G. et al. Seasonally Relevant Cool Temperatures Interact with N Chemistry to Increase Microcystins Produced in Lab Cultures of *Microcystis Aeruginosa* NIES-843. *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 7, p. 4127–4136, 3 abr. 2018.

PICARDO, M. et al. Recent Advances in the Detection of Natural Toxins in Freshwater Environments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 112, p. 75–86, mar. 2019.

PIMENTEL, J. M.; GIANI, A. Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 1545–1554, 2013.

PRINCIOTTA, S. D.; HENDRICKS, S. P.; WHITE, D. S. Production of Cyanotoxins by Microcystis Aeruginosa Mediates Interactions with the Mixotrophic Flagellate Cryptomonas. *Toxins*, v. 11, n. 4, p. 223, 15 abr. 2019.

PUDDICK, J. et al. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Marine Drugs*, v. 12, n. 11, 2014.

PUDDICK, J. et al. Modulation of Microcystin Congener Abundance Following Nitrogen Depletion of a Microcystis Batch Culture. *Aquatic Ecology*, v. 50, n. 2, p. 235–246, jun. 2016.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and Industrial Significance of Cyanobacterial Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 521–539, jul. 2009.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. *Biologia Vegetal*. 8<sup>a</sup> ed. [s.l.] Guanabara, 2014.

REYNOLDS, C. S.; OLIVER, R. L.; WALSBY, A. E. Cyanobacterial Dominance: The Role of Buoyancy Regulation in Dynamic Lake Environments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 21, n. 3, p. 379–390, set. 1987.

RINTA-KANTO, J. et al. Lake Erie Microcystis: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae*, v. 8, p. 665–673, 2009.

SANT'ANNA, C. L. A. et al. Review of Toxic Species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, v. 126, p. 251–265, 1 abr. 2008.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. D. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, v. 71, n. 3–4, 2000.

SEVILLA, E. et al. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 10, 2008.

SEVILLA, E. et al. An Active Photosynthetic Electron Transfer Chain Required for mcyD Transcription and Microcystin Synthesis in Microcystis Aeruginosa PCC7806. *Ecotoxicology*, v. 21, n. 3, p. 811–819, abr. 2012.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 2009.

SMUTNÁ, M. et al. Acute, Chronic and Reproductive Toxicity of Complex Cyanobacterial Blooms in Daphnia Magna and the Role of Microcystins. *Toxicon*, v. 79, p. 11–18, mar. 2014.

SOARES, M. C. S. et al. Cyanobacterial Dominance in Brazil: Distribution and Environmental Preferences. *Hydrobiologia*, v. 717, n. 1, p. 1–12, out. 2013.

SONG, L. et al. Microcystin Production of *Microcystis Viridis* (Cyanobacteria) under Different Culture Conditions. *Phycological Research*, v. 46, n. s2, p. 19–23, dez. 1998.

SRIVASTAVA, A. et al. Microcystin Biosynthesis and *mcyA* Expression in Geographically Distinct *Microcystis* Strains under Different Nitrogen, Phosphorus, and Boron Regimes. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 1–13, 2016.

SUN, F. et al. The lysis of Microcystis aeruginosa in AlCl 3 coagulation and sedimentation processes. *Chemical Engineering Journal*, v. 193–194, p. 196–202, 15 jun. 2012.

SVIRČEV, Z. et al. Global Geographical and Historical Overview of Cyanotoxin Distribution and Cyanobacterial Poisonings. *Archives of Toxicology*, v. 93, n. 9, p. 2429–2481, set. 2019.

TANDEAU DE MARSAC, N. Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations*, v. 76, n. 1/3, p. 193–202, 2003.

TAO, M. et al. Use of a Generalized Additive Model to Investigate Key Abiotic Factors Affecting Microcystin Cellular Quotas in Heavy Bloom Areas of Lake Taihu. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e32020, 23 fev. 2012.

TONK, L. et al. Amino Acid Availability Determines the Ratio of Microcystin Variants in the Cyanobacterium Planktothrix Agardhii: Amino Acid Availability Determines Microcystin Variants. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 65, n. 3, p. 383–390, set. 2008.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; BRDJANOVIC, D. Anticipating the next century of wastewater treatment. *Science*, v. 344, n. 6191, 2014.

VAN OOSTERHOUT, F. et al. Lanthanum in Water, Sediment, Macrophytes and Chironomid Larvae Following Application of Lanthanum Modified Bentonite to Lake Rauwbraken (The Netherlands). *Science of The Total Environment*, v. 706, p. 135188, mar. 2020.

VIDAL, L. et al. Introduction to cyanobacteria. Em: *Toxic Cyanobacteria in Water*. 2<sup>a</sup> ed. [s.l: s.n.]p. 163–204.

VILAR, M. C. P. et al. Grazer-Induced Chemical Defense in a Microcystin-Producing Microcystis Aeruginosa (Cyanobacteria) Exposed to Daphnia Gessneri Infochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, v. 47, n. 10–11, p. 847–858, nov. 2021.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4<sup>a</sup> ed. USA: Hoboken, John Wiley & Sons, 2011.

WAAJEN, G. et al. Management of eutrophication in Lake De Kuil (The Netherlands) using combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment. *Water Research*, v. 97, 2016.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial Peptides — Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 530–563, jul. 2006.

WHO. *Guidelines for Drinking-water Quality FOURTH EDITION INCORPORATING THE FIRST ADDENDUM*. [s.l: s.n.].

WILHELM, S. W.; BULLERJAHN, G. S.; MCKAY, R. M. L. The Complicated and Confusing Ecology of *Microcystis* Blooms. *mBio*, v. 11, n. 3, p. e00529-20, 30 jun. 2020.

WILMOTTE, A. Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria. Em: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. [s.l: s.n.]

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. Em: ROBERTS, J. A. (Ed.). *Annual Plant Reviews online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 1–19.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environment International*, v. 91, 2016.

WU, S. et al. Field Studies on the Environmental Factors in Controlling Microcystin Production in the Subtropical Shallow Lakes of the Yangtze River. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, n. 4, p. 329–334, abr. 2008.

YUNES, J. S. FLORAÇÕES DE Microcystis NA LAGOA DOS PATOS E O SEU ESTUÁRIO: 20 ANOS DE ESTUDOS. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 02, p. 313–318, jun. 2009.

Aeruginosin	RT [min]	$m/z$ meas. $[M+H]^{2+}$
	6.3	759,301
Aeruginosin 618	5.7	621,361
	6.7	634,373
	6.4	689,386
	7.7	669,384
Aeruginosin 89A/Aeruginosin 89-B	5.4	717,265
	5.2	733,305
	6.5	655,314
	4.6	683,301
	6.3	715,247
	5.2	635,313
Aeruginosin NOL6	6.5	749,207
	5.9	751,230
	6.2	681,289
Spumigin 652	5.1	653,333
	5.3	637,362
Aeruginosin 670	6.1	671,271
Microviridin	RT [min]	$m/z$ meas. $[M+H]^{2+}$
	6.6	735,434
	6.9	827,868
	6.6	817,491
	7.1	832,361
	7.0	816
	6.9	843,305
	6.9	848,906
	6.1	859,408
Cyanopeptolin	RT [min]	$m/z$ meas. $[M+H]^+$
Cyanopeptolin 959	6.71	960,414
Cyanopeptolin S	6.63	926,431
	6.65	944,441

**ANEXO** - Cyanopeptides other than microcystins found in our samples from Jacarepaguá Lagoon.