

Ciências Ambientais

LEILA DOS SANTOS MACHADO

**A COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA DO RESERVATÓRIO DE
ITUPARARANGA (VOTORANTIM-SP) E A PROBLEMÁTICA DAS
CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS**

Sorocaba
2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



unesp
Sorocaba

LEILA DOS SANTOS MACHADO

**A COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA DO RESERVATÓRIO DE
ITUPARARANGA (VOTORANTIM-SP) E A PROBLEMÁTICA DAS
CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Ambientais da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” na Área de
Concentração Diagnóstico, Tratamento e
Recuperação Ambiental

Orientadora: Prof. Dra. Viviane Moschini
Carlos

Sorocaba
2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



M149c Machado, Leila dos Santos
A comunidade fitoplancônica do reservatório de Itupararanga (Votorantim-SP) e a problemática das cianobactérias e cianotoxinas / Leila dos Santos Machado.
-- Sorocaba, 2022
86 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba
Orientadora: Viviane Moschini Carlos

1. Limnologia. 2. Fitoplâncton. 3. Cianobactérias. 4. Cianotoxinas. 5. Saxitoxina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

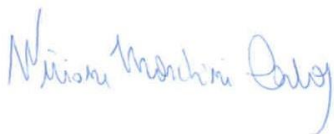
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: A comunidade fitoplanctônica do reservatório de Itupararanga (Votorantim-SP) e a problemática das cianobactérias e cianotoxinas

AUTORA: LEILA DOS SANTOS MACHADO

ORIENTADORA: VIVIANE MOSCHINI CARLOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, reading "Viviane Moschini Carlos".

Prof^ª. Dr^ª. VIVIANE MOSCHINI CARLOS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp Instituto de Ciencia e Tecnologia de Sorocaba

A handwritten signature in blue ink, reading "Sheila Cardoso da Silva".

Dr^ª. SHEILA CARDOSO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Oceanografia Física, Química e Geológica / Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo (USP)

A handwritten signature in blue ink, reading "Micheline Kézia Cordeiro de Araújo".

Dr^ª. MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO (Participação Virtual)
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / Universidade de São Paulo - USP - Piracicaba

Prof. Dr. BRUNO PAES DE CARLI (Participação Virtual)
Campus Rangel Santos, SP / Universidade Paulista (UNIP)

A handwritten signature in blue ink, reading "Eduardo Henrique Costa Rodrigues".

Prof. Dr. EDUARDO HENRIQUE COSTA RODRIGUES (Participação Virtual)
Universidade Ceuma (UNICEUMA)

Sorocaba, 04 de abril de 2022

Aos meus amados pais, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Docente Viviane Moschini Carlos, pelo valioso aprendizado que tem me proporcionado ao longo destes anos, confiando a mim esta pesquisa. Agradeço também pela confiança e pela amizade nesses anos de convivência durante o período do mestrado e doutorado.

Agradeço também ao prof. Dr. Marcelo Pompêo (IB-USP) pelo auxílio com todo o suporte, estrutura e disponibilidade em seu laboratório na USP durante as análises das amostras e por todas as contribuições durante estes anos de pesquisa.

Agradeço à prof. Dra. Sheila Cardoso pela amizade e inúmeras contribuições de várias formas, durante o desdobramento deste trabalho. Agradeço pelas dicas, contribuições, auxílios nas análises em laboratório, conversas, companhia e generosidade em cada gesto.

À todo o grupo de pesquisa de limnologia da UNESP Sorocaba e do instituto de biociências USP, pelas dicas, parcerias de experimentos e análises, contribuições e amizade, agradeço à Felícia, Juliana, Maria Clara, Vitória, Keith, Aline e Eduardo. Agradeço também à Daniele pelo auxílio na execução e planejamento das coletas das amostras e outras contribuições.

Agradeço à Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini da UFSCar – São Carlos-SP que gentilmente cedeu a biomassa para os experimentos com a saxitoxina, auxiliou com dicas e sugestões significativas, colaborando de maneira atenciosa e generosa neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Ernani, Fabiane, Felipe e Lucas do laboratório de cianotoxinas do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF – USP) pela atenção, esclarecimento de dúvidas, sugestões, acolhimento, disponibilidade e auxílio com a metodologia do SPE e LC-MS para análise das cianotoxinas.

Agradeço à Profa. Dra. Eliana Duek por disponibilizar seu laboratório de biomateriais da PUC-SP campus Sorocaba e à técnica Priscila, pelo auxílio e disponibilidade no processo de liofilização das amostras e no acesso aos equipamentos.

Agradeço ao programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais da UNESP Sorocaba, coordenadores, professores, colaboradores e colegas que fizeram parte deste processo.

Agradeço especialmente ao pessoal da secretaria da PGCA Carlos e Lilian, sempre muito atenciosos e cordiais. Agradeço também, às técnicas dos laboratórios de química e biologia Suzan, Letícia e Sandra pelo auxílio de diversas formas no decorrer dos experimentos.

Agradeço à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro nos projetos (processos 2016/17266-1 e 400305/2016) coordenados, respectivamente, pela Prof. Dra. Viviane e pelo Prof. Dr. Marcelo, aos quais esta pesquisa está vinculada.

Agradeço ao auxílio financeiro do programa DAAD/CAPES – PROBAL e ao Prof. Dr. André Henrique Rosa, pela oportunidade em poder participar em parte deste projeto.

Agradeço à minha amada família por todo o apoio, incentivo, compreensão e amor, desde sempre, vocês são as luzes que carrego comigo em cada passo percorrido neste caminho que escolhi. Agradeço também ao meu esposo Igor pelo amor, parceria, companheirismo, paciência e incentivo, participando em todos os aspectos deste trabalho, inclusive das coletas e experimentos. Sou eternamente grata pela contribuição de cada um de vocês, que direta ou indiretamente possibilitaram que eu chegasse até aqui.

(...)

“Fabiano tomou a cuia, desceu a ladeira, encaminhou-se ao rio seco, achou no bebedouro dos animais um pouco de lama. Cavou a areia com as unhas, esperou que a água marejasse e, debruçando-se no chão, bebeu muito. Saciado, caiu de papo para cima, olhando as estrelas, que vinham nascendo. Uma, duas, três, quatro, havia muitas estrelas, havia mais de cinco estrelas no céu. O poente cobria-se de cirros – e uma alegria doida enchia o coração de Fabiano.”

Graciliano Ramos – Vidas Secas

RESUMO

Reservatórios tropicais, em geral, são suscetíveis ao processo de eutrofização artificial, devido aos seus múltiplos usos. Além disso, as mudanças climáticas influenciam os regimes de precipitação, afetando a hidrologia destes ecossistemas, alterando vazão, tempo de retenção, promovendo estratificação da coluna da água, favorecendo o aporte de efluentes e processos de lixiviação. Assim, a produtividade primária é diretamente influenciada, devido a estas alterações na composição da comunidade fitoplantônica, as quais estão relacionadas à sensibilidade e tolerâncias ambientais que as espécies de fitoplâncton possuem. Uma forma de analisar a resposta destes organismos a alterações ambientais é por meio da aplicação dos grupos funcionais, que consiste em agrupar espécies com as mesmas características ecofisiológicas, e que respondem de maneira similar às alterações das condições ambientais. Em ambientes eutrofizados, é comum que cianobactérias sejam dominantes, devido às suas adaptações ecofisiológicas relatadas em diversos estudos no Brasil e no mundo. O reservatório de Itupararanga, responsável pelo abastecimento de grande parte da cidade de Sorocaba e região, foi avaliado como eutrófico e supereutrófico em estudos recentes. No presente estudo, dentre os organismos fitoplantônicos analisados, foi observada a dominância da cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*. No período chuvoso, porém, a biomassa de *R. raciborskii* diminuiu drasticamente, sugerindo sensibilidade da espécie à estratificação térmica da coluna da água, que ocorreu neste período. Contudo, quando houve a diminuição da biomassa de *R. raciborskii*, foi observada alternância na ocorrência de outras espécies potencialmente tóxicas como *Aphanizomenon gracile* e *Dolichospermum* spp. Esta resposta foi mais evidente na região fluvial do reservatório, a qual é a mais afetada pelo aporte de efluentes domésticos. A presença de cianotoxinas (saxitoxinas e microcistinas) foi analisada, de modo que as concentrações de saxitoxina foram relativamente maiores em comparação com as microcistinas, porém ambas estiveram abaixo dos limites determinados pela legislação. Não foi observada correlação significativa entre os teores de saxitoxina e a biomassa de *R. raciborskii*, o que sugere que possa haver alternância entre o desenvolvimento de cepas tóxicas e não tóxicas no reservatório, ou ainda, que a saxitoxina seja liberada em condições de estresse, já que os maiores teores foram observados no período chuvoso, quando a biomassa de *R. raciborskii* foi menor. Ainda que a saxitoxina tenha sido encontrada em baixas concentrações, esta toxina foi identificada em todas as cinco campanhas realizadas entre os anos de 2016 e 2017, evidenciando sua permanência constante no reservatório. Neste sentido, ensaios ecotoxicológicos foram elaborados com a finalidade de avaliar a toxicidade da saxitoxina em uma espécie nativa de quironomídeo, utilizando as concentrações próximas às ambientais identificadas para o reservatório. A hipótese inicial do estudo foi confirmada, ainda que as concentrações de saxitoxina testadas estejam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação, a exposição crônica à baixos teores de saxitoxina foi capaz de causar danos aos organismos.

Palavras chave: eutrofização, cianobactérias, cianotoxinas, saxitoxina, toxicidade

ABSTRACT

Tropical reservoirs, in general, are susceptible to the process of artificial eutrophication, due to their multiple uses. In addition, climate change influences precipitation regimes, affecting the hydrology of these ecosystems, changing flow, retention time, promoting stratification of the water column, favoring the increase of effluents and leaching processes. Thus, the primary productivity is directly influenced, due changes in the composition of the phytoplankton community related to the sensitivity and environmental tolerances of phytoplankton species. The analysis of the response of these organisms to environmental changes can be through the application of functional groups, which consists of grouping species with the same ecophysiological characteristics, which respond in a similar way to changes in environmental conditions. The dominance of cyanobacteria in eutrophic environments is common, due to their ecophysiological adaptations reported in several studies in Brazil and worldwide. The Itupararanga reservoir is responsible for supplying much of the city of Sorocaba and region, however, it has been assessed as eutrophic and super eutrophic in recent studies. In addition, in the present study, the dominance of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* was observed among the analyzed phytoplanktonic organisms and the biomass values were higher in the dry season. However, in the rainy season the *R. raciborskii* biomass decreases significantly, suggesting sensitivity of the species to the thermal stratification of the water column that occurred during this period. On the other hand, when there was a decrease in the biomass of *R. raciborskii*, alternation was observed in the occurrence of other potentially toxic species such as *Aphanizomenon gracile* and *Dolichospermum* spp. This response was more evident in the fluvial region of the reservoir, where the discharge of domestic effluents is intense. The presence of cyanotoxins (saxitoxins and microcystins) was analyzed and the concentrations of saxitoxin were relatively higher compared to microcystins, but both were below the limits determined by legislation. There was no significant correlation between the levels of saxitoxin and the biomass of *R. raciborskii*, which suggests that there may be an alternation between the development of toxic and non-toxic strains in the reservoir, or even that the saxitoxin is released under stress conditions, since the highest levels were observed in the rainy season, when the biomass of *R. raciborskii* was lower. Although saxitoxin was found in low concentrations, this toxin was identified in all five campaigns carried out between the years 2016 and 2017, showing its constant permanence in the reservoir. Thus, ecotoxicological tests were developed with the objective of evaluating the toxicity of saxitoxin in a native species of chironomid, using the environmental concentrations identified in the Itupararanga reservoir. The initial hypothesis of the study was confirmed, although the concentrations of saxitoxin tested are within the parameters established by the legislation, the chronic exposure to low levels of saxitoxin was capable of causing damage to the organisms.

Keywords: eutrophication, cyanobacteria, cyanotoxins, saxitoxin, toxicity

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
CAPÍTULO 1- EFEITO DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA COMPOSIÇÃO E NA DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA.....	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	17
2.2 CARACTERIZAÇÃO LIMNOLÓGICA.....	18
2.3 FITOPLÂNCTON	18
2.4 BIOVOLUME.....	19
2.5 ÍNDICES DE DIVERSIDADE	19
2.6 GRUPOS FUNCIONAIS	19
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	19
3 RESULTADOS.....	20
4 DISCUSSÃO	34
4 CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO 2 - PERMANENT OCCURRENCE OF <i>RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII</i> AND CYANOTOXINS IN A SUBTROPICAL RESERVOIR POLLUTED BY DOMESTIC EFFLUENTS (ITUPARARANGA RESERVOIR, SÃO PAULO, BRAZIL).....	43
1 INTRODUCTION	44
2 MATERIALS AND METHODS	46
1.1 STUDY SITE	46
1.2 SAMPLE COLLECTION METHODS.....	47
1.3 ANALYTICAL METHODS	48
1.4 STATISTICAL ANALYSIS	49
3 RESULTS	49
4 DISCUSSION	56
5 CONCLUSIONS.....	59
CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE CRÔNICA DA SAXITOXINA (STX) EM LARVAS DE <i>CHIRONOMUS SANCTICAROLLI</i> - (DIPTERA: CHIRONOMIDAE).....	60
1 INTRODUÇÃO	60

2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
2.2 BIOMASSA DE <i>RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII</i>	62
2.3 ORGANISMOS TESTE	63
2.4 CONDIÇÕES DO SEDIMENTO E DA ÁGUA PARA OS BIOENSAIOS	63
2.5 BIOENSAIO CRÔNICO.....	64
2.6 BIOMARCADORES	65
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	65
3 RESULTADOS.....	66
4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
MATERIAL SUPLEMENTAR	84

APRESENTAÇÃO

Em geral, reservatórios brasileiros possuem aspectos alterados em relação ao bom estado ecológico o qual, em tese, deveria caracterizá-los (TANIWAKI et al. 2013, CARDOSO-SILVA et al. 2015, BEGHELLI et al. 2016). A problemática gerada por conta da ocupação desordenada no entorno destes ambientes tem reduzido a área de vegetação ciliar e, em muitos locais, o cultivo de hortaliças, pastagens, condomínios, chácaras, substituíram esta área de proteção natural (TANIWAKI et al. 2013, FRASCARELI et al. 2015, , ROSA et al. 2015). Todos estes fatores caracterizam uma alta pressão antrópica, à qual os reservatórios estão condicionados, devido a sua utilização para diversas finalidades.

Neste contexto, a alteração da qualidade da água é um problema recorrente, já que os teores de nutrientes e outras variáveis físico-químicas estão vulneráveis à frequentes mudanças ambientais propiciando, inclusive, condições favoráveis à ocorrência de florações fitoplanctônicas (MOSCHINI-CARLOS et al. 2010, RODRIGUES, SANT'ANNA e TUCCI, 2010, ESTEVES 2011, CUNHA & CALIJURI 2011a, NISHIMURA et al. 2014, POMPEO et al. 2015). Além disso, nestes sistemas, há uma marcada heterogeneidade espacial na produtividade fitoplanctônica devido aos gradientes longitudinais da morfologia da bacia, velocidade de fluxo, tempo de residência, sólidos em suspensão, luz e disponibilidade de nutrientes (KIMMEL *et al.*, 1990; THORTON, 1990, NISHIMURA et al. 2014, FRASCARELI et al. 2015, POMPEO et al. 2015).

Diante de tais processos, existem ainda os fatores climáticos os quais exercem, também, grande influência na dinâmica dos reservatórios e, conseqüentemente, na comunidade fitoplanctônica, como estratificação da coluna da água, regime de precipitação e variações extremas de temperatura (PAERL E PAUL, 2012, VISSER et al. 2016, SANTOSO et al. 2017, HUISMAN et al. 2018). Adicionalmente, a elevação da temperatura global e períodos de estiagem cada vez mais intensos proporcionam condições favoráveis para o crescimento do fitoplâncton, inclusive de cianobactérias, impulsionando florações tóxicas (MOLICA et al. 2002, O'NEILL et al. 2012, PAERL & PAUL, 2012, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2014, MOSCHINI-CARLOS et al. 2017, PEDROSA et al. 2020).

Paralelamente, o fenômeno da eutrofização é uma ameaça potencial aos mananciais, pois, pode estar associado ao aumento exponencial da biomassa fitoplanctônica, em geral, dominada por espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, elevando a concentração de cianotoxinas no ambiente (MOSCHINI-CARLOS et al. 2009, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2014, NISHIMURA et al. 2014). Além disso, os efeitos das mudanças climáticas, relacionados ao grupo das cianobactérias, são ainda mais preocupantes devido às

características fisiológicas, morfológicas e ecológicas destes organismos; as quais representam grande vantagem adaptativa a, por exemplo, alterações abruptas de luminosidade, turbulência e teores de nutrientes (MISCHKE, 2003, PICCINI et al. 2011, MEREL et al. 2013, BURFORD et al. 2016, HUISMAN et al. 2018).

Visser et al. (2016) comentam a respeito das adaptações que algumas cianobactérias possuem, as quais permitem sua abundância, mesmo em ambientes estratificados ou em condições restritivas, como a presença de aerótopos em organismos dos gêneros *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* e *Cylindrospermopsis*. Tais adaptações, sensibilidades e tolerâncias, destes e de outros organismos fitoplanctônicos foram descritos por Reynolds et al. (2002) e Padisák et al. (2009), segundo a abordagem de grupos funcionais (GF). Segundo este conceito, o ambiente acaba segregando espécies menos adaptadas daquelas com adaptações e atributos que as permitem sobreviver (NISHIMURA et al. 2015). Consequentemente, as espécies mais adaptadas são mais propensas a crescer e contribuir para uma maior fração da biomassa da comunidade, caracterizadas como espécies dominantes (REYNOLDS, 2006).

No Brasil e no mundo, diversos estudos relatam a problemática das cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios de abastecimento público, na maior parte das vezes estes ambientes encontram-se artificialmente eutrofizados. Além do aspecto ecológico abordado nestes estudos, enfatiza-se também o problema que ele representa para a saúde pública, pois são estes lagos que temos como fonte de água potável. Neste sentido, estudar as alterações as quais estes ambientes estão expostos permite conhecer as características particulares destes ambientes, sua biota e os possíveis danos aos quais possa estar exposta, consequentemente, os efeitos destas interações na saúde humana (CHORUS & BARTRAM 1999, CARMICHAEL 2001, ALI et al. 2002, PEDROSA et al. 2020). Desta forma, é possível contribuir para mitigar tendências referentes à deterioração da qualidade dos ecossistema aquáticos, bem como, embasar ações de prevenção e correção que diminuam custos de tratamentos futuros, gerados por conta de episódios frequentes de eutrofização e ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas (MOWE et al. 2015).

Neste contexto, os capítulos apresentados na sequência deste documento foram produzidos apartir dos seguintes objetivos centrais do presente trabalho:

- Caracterizar a comunidade fitoplanctônica no reservatório de Itupararanga, quantitativa e qualitativamente e identificar os principais fatores ambientais relacionados a estes organismos. (Capítulo 1)

- Identificar os grupos funcionais fitoplancctônicos presentes no reservatório e avaliar os padrões de ocorrência dos grupos mais representativos. (Capítulo 1)
- Analisar a ocorrência de cianobactérias no reservatório, bem como, investigar a relação entre a biomassa destes organismos e a presença de cianotoxinas (Saxitoxina e Microcistina). (Capítulo 2 – Artigo publicado na Environmental Science and Pollution Research)
- Avaliar os efeitos da Saxitoxina em larvas de *Chironomus sancticaroli*, por meio de ensaios ecotoxicológicos. (Capítulo 3)

CAPÍTULO 1- EFEITO DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA COMPOSIÇÃO E NA DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA

1 INTRODUÇÃO

Reservatórios tropicais em geral estão constantemente vulneráveis a impactos negativos devido aos múltiplos usos a que se destinam, tais como a geração de energia, lazer e abastecimento público (ESTEVES, 2011, TANIWAKI et al. 2013). Muitas vezes a ocupação desordenada do entorno destes ambientes é um dos fatores que potencializam condições de degradação da qualidade da água, favorecendo o processo de eutrofização (CUNHA et al. 2013, TANIWAKI et al. 2013, MELO et al. 2019). Ambientes com elevados graus de eutrofização são relatados principalmente próximos a centros urbanos, nestas regiões é comum, por exemplo o relato de aporte de efluentes domésticos (MOSCHINI-CARLOS et al. 2009; MOSCHINI-CARLOS et al. 2010; CUNHA & CALIJURI 2011a, NISHIMURA et al. 2014, MACHADO et al. 2016). Entretanto, a eutrofização artificial não é um processo intrínseco à expansão urbanística, visto que usos voltados à atividades agropastoris também constituem impactos igualmente danosos aos mananciais (TANIWAKI et al. 2013, BEGHELLI et al. 2016, MELO et al. 2019).

Além de estarem sujeitos à eutrofização, os reservatórios exibem uma marcada heterogeneidade espacial e sazonal, relativas à variação de suas características físico-químicas (ESTEVES 2011, NISHIMURA et al. 2014, FRASCARELI et al. 2015, POMPEO et al. 2015). A heterogeneidade espacial está relacionada à compartimentalização destes ambientes devido a alterações no fluxo, turbulência, e tempo de retenção, constituindo a zona fluvial, intermediária e lacustre do reservatório (THORNTON et al. 1990). Devido a estas características, observa-se um gradiente nos teores de nutrientes e outras variáveis físico-químicas (tais como: turbidez, matéria orgânica, sólidos em suspensão), de modo que a zona fluvial é comumente caracterizada pela predominância de elementos orgânicos, como resultado da contribuição de rios tributários, por alta turbidez e baixa disponibilidade de luz (CUNHA & CALIJURI 2011a). Na zona intermediária, em geral, são identificadas condições ideais para produção primária, devido a disponibilidade de luz e nutrientes. Porém, na região da barragem, embora a disponibilidade de luz seja alta, os teores de nutrientes são reduzidos (THORNTON et al. 1990).

Por outro lado, a variação sazonal configura efeitos relativos às condições climáticas as quais o reservatório está exposto, como regime de precipitação, temperatura, radiação solar, ventos; cujos efeitos repercutem de maneira generalizada sobre a homeostasia do

reservatório (ESTEVES 2011). Uma das consequências mais discutidas, do ponto de vista ecológico, é a estratificação da coluna d'água, seja térmica ou química. Seus efeitos em ambientes eutróficos podem alterar substancialmente o metabolismo da matéria orgânica e a disponibilidade de nutrientes afetando a produtividade primária, diminuindo a capacidade de autodepuração, o potencial oxiredutor e pH (VISSER et al. 2016, SANTOSO et al. 2017, MELO et al. 2019). O regime de precipitação é um dos fatores mais relevantes, atuando como um potente desencadeador deste fenômeno nos reservatórios. Nas regiões tropicais, a precipitação promove perturbação na coluna d'água, podendo ser considerado um fator mais importante que a temperatura e a radiação solar na regulação da dinâmica sazonal do fitoplâncton nestes ecossistemas (FIGUEREDO & GIANI, 2009).

Os diferentes organismos pertencentes à comunidade fitoplanctônica possuem respostas específicas às variações ambientais, baseando-se nestas respostas foi criado o conceito dos grupos funcionais (GF) (REYNOLDS et al. 2002, PADISÁK et al. 2009). Nishimura et al. (2015) comentam que sua aplicação em estudos limnológicos em ecossistemas de água doce é muito eficaz na compreensão das características ambientais. A abordagem consiste em agrupar espécies com características morfológicas e fisiológicas similares, bem como, por semelhanças ecológicas. Paralelamente, busca-se diferenciar os organismos fitoplanctônicos quanto às suas adaptações e requerimentos específicos (alta afinidade por fósforo ou carbono e eficiência na captação luminosa, por exemplo) (HUSZAR & CARACO 1998, REYNOLDS et al. 2002, REYNOLDS et al. 2006). Ao aplicar a abordagem dos GFs, é possível prever a ocorrência de certas espécies nos ambientes, contribuindo para o entendimento e previsão da distribuição e dinâmica de populações naturais do fitoplâncton (REYNOLDS et al. 2002).

Assim a aplicação dos GFs de água doce é considerada uma ferramenta muito robusta no entendimento e na predição da dinâmica de comunidades naturais do fitoplâncton, devido à sensibilidade às latitudes, morfometrias e estados tróficos (NISHIMURA et al. 2015). Diversos estudos utilizaram a abordagem dos GFs fornecendo interpretações holísticas a respeito dos ecossistemas aquáticos estudados (ALVES-DE-SOUZA et al. 2006, MOURA et al. 2007, FONSECA & BICUDO 2008, NISHIMURA 2012, SANTOS et al. 2018)

Neste contexto, conhecer a comunidade fitoplanctônica, bem como, os GFs que a representam possibilita uma análise complementar do ecossistema aquático, pois sua composição, biomassa e abundância podem evidenciar potenciais riscos aos quais o reservatório possa estar exposto (NISHIMURA et al. 2015, MOSCHINI-CARLOS et al. 2017, SANTOS et al. 2018). A respeito da dominância de cianobactérias potencialmente tóxicas, por exemplo, seus padrões de ocorrência podem facilitar a compreensão de processos

biogeoquímicos e variações tróficas do ecossistema (CUNHA & CALIJURI 2011a,b, SANTOS et al. 2018). No caso das espécies diazotróficas, a capacidade de fixar o N_2 por meio do heterocisto é uma vantagem que facilita sua dominância em circunstâncias, cuja disponibilidade deste nutriente seja baixa (PICCINI et al. 2011, ANTUNES et al. 2015, HUISMAN et al. 2018).

Perante evidências de aumento do nível trófico do reservatório de Itupararanga nos últimos anos (CUNHA & CALIJURI 2011a,b, TANIWAKI et al 2013, FRASCARELI et al. 2015, BEGHELLI et al. 2016, CASALI et al. 2017, MELO et al. 2019), emerge a necessidade de avaliar o efeito destas condições ambientais na composição da comunidade fitoplanctônica e os grupos funcionais que a representam. Neste sentido, é possível fornecer subsídios para o manejo deste ecossistema, baseando-se na respostas destes organismos. Por tanto, o objetivo deste capítulo consistiu em analisar a relação entre as variáveis ambientais e a composição da comunidade fitoplanctônica, identificando os principais grupos funcionais (GF), também, investigar se seus padrões de ocorrência respondem à heterogeneidade longitudinal e sazonal do reservatório de Itupararanga.

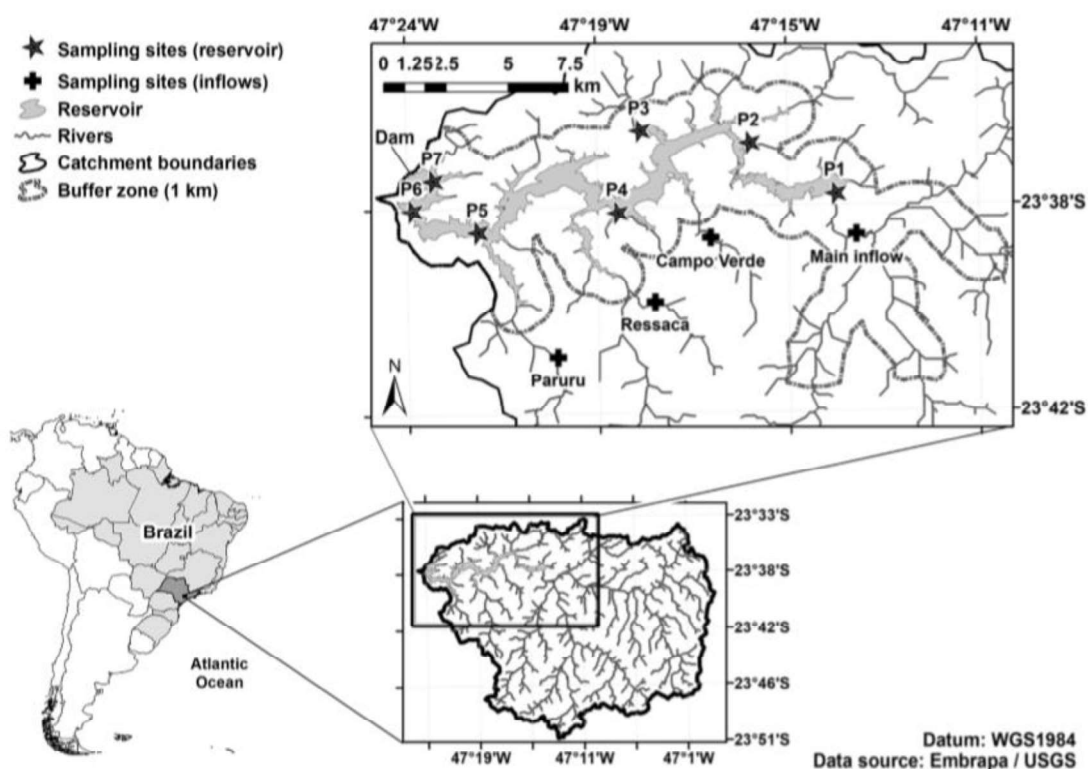
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O reservatório de Itupararanga é formado pelo represamento das águas do rio Sorocaba dentro do município de Votorantim (Figura 1), e foi construído em 1911 com a finalidade de gerar energia elétrica (ROSA et al., 2015). A área de drenagem é bastante extensa (936,51 km²) abrangendo os municípios de Ibiúna, Piedade, São Roque, Mairinque, Alumínio e Votorantim. Aproximadamente 63% da água do reservatório é destinada ao abastecimento público (cerca de 800.000 pessoas) de cidades como Sorocaba, Votorantim, Mairinque, Alumínio e Piedade.

No ano de 1998 foi estabelecida a Área de Proteção Ambiental (APA) no reservatório de Itupararanga. A APA foi criada pela Lei Estadual Nº 10.100/1998 devido a uma demanda do Comitê da Bacia Hidro-gráfica do Sorocaba e Médio Tietê, visando assegurar a manutenção da qualidade das águas do reservatório (TANIWAKI et al., 2013). Anteriormente ao estabelecimento da APA os usos do entorno do reservatório favoreceram práticas que impactaram negativamente o manancial. Com isso, estudos têm demonstrado um padrão de degradação para alguns índices de qualidade da água, ainda que seja considerada, relativamente, boa para potabilidade (ROSA et al., 2015).

Figura 1 - Mapa do reservatório de Itupararanga com localização dos pontos amostrais.



Fonte: Melo et al. (2019)

2.2 Caracterização limnológica

A caracterização limnológica na qual se baseou o presente estudo tem como referência os dados apresentados por Melo et al (2019) para o reservatório de Itupararanga. Tais dados foram coletados de maneira simultânea à coleta das amostras de fitoplâncton apresentadas nesta pesquisa.

2.3 Fitoplâncton

As amostras de água foram coletadas em sete pontos (Figura 1) em cinco campanhas, realizadas nos meses de dezembro/2016, março/2017, agosto/2017, outubro/2017 e dezembro/2017.

As amostras para análise qualitativa foram coletadas utilizando uma rede de malha de 20µm e fixadas com formaldeído a 4%. Para análise quantitativa, amostras integradas do fitoplâncton foram coletadas com uma mangueira plástica (1 m de profundidade), e fixadas com lugol acético 1%. A identificação foi feita utilizando literatura usual de acordo com os grupos fitoplanctônicos segundo Komárek e Anagnostidis (1989; 1999; 2005), Bogaertes et al. (2014) e Compère (1967, 1976, 1977). A contagem foi realizada por meio do método descrito por Utermöhl, em microscópio invertido (1958).

2.4 Biovolume

O biovolume foi determinado por aproximação geométrica, multiplicando a densidade de cada espécie pela média do volume das células (HILLEBRAND et al. 1999; SUN e LIU, 2003). A biomassa do fitoplâncton foi estimada convertendo os valores de biovolume, de modo que $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1} = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, segundo descrito por Wetzel e Likens (2000).

2.5 Índices de diversidade

Visando interpretar a composição da comunidade fitoplanctônica, foram calculados os índices de diversidade de Shannon (H'), Equabilidade de Pielou (J'), riqueza (S') para as classes e abundância/dominância para as espécies.

2.6 Grupos funcionais

A classificação dos Grupos Funcionais (GFs) foi baseada segundo a metodologia proposta por Reynolds et al. (2002) considerando contribuições realizadas por Padisák et al. (2009).

2.7 Análises estatísticas

A priori, foi aplicado um teste de correlação linear de Pearson ($p < 0,05$) utilizando toda a matriz do conjunto de dados ambientais físicos, químicos e biológicos, incluindo os grupos funcionais com as espécies abundantes ($> 5\%$). O teste foi aplicado com o objetivo de selecionar variáveis ambientais que estiveram correlacionadas com pelo menos um GF. O resultado deste teste foi utilizado como critério de inclusão e exclusão das variáveis ambientais a serem utilizadas nas análises posteriores.

A partir das variáveis ambientais selecionadas por meio da correlação de Pearson foi efetuada uma análise cluster utilizando método hierárquico aglomerativo de distância euclidiana, para a qual foram produzidos dendrogramas dos clusters acoplados a um “mapa de calor” (*heatmap*) a partir do pacote Heatmap3 versão 3.5.3 (ZHAO et al., 2014) do software R Project for Statistical Computing® 3.4.0. A análise foi efetuada com o objetivo de identificar a similaridade entre os GF's e variáveis ambientais, entre os locais amostrais, ao longo das cinco campanhas. Para isso, os foram selecionados os GFs que representaram mais de 1% da biomassa total entre as campanhas.

Na sequência, foi efetuada uma análise de correspondência canônica (ACC), a qual foi elaborada com o objetivo de avaliar a correlação entre a variação da biomassa dos GF's mais representativos e as variáveis limnológicas. Para tais análises, o conjunto de dados foi normalizado para $\log_{10}$. Com o objetivo de definir quais as variáveis ambientais tiveram efeito significativo no modelo da CCA, os escores foram submetidos à análise de variância ANOVA

($p < 0,05$). Após elegidas as variáveis mais influentes, foi efetuada uma Análise de Redundância (RDA) com o objetivo de verificar o efeito linear das variáveis ambientais sob a biomassa dos GF's descritores. Estas análises e as de diversidade foram efetuadas utilizando o pacote Vegan 2.5-2 (OKSANEN et al. 2018) do R[®] 3.4.0.

3 RESULTADOS

A diversidade na composição da comunidade fitoplanctônica, do reservatório de Itupararanga, foi elevada. Ao longo das cinco campanhas, foi identificado um total de 142 espécies e 69 gêneros pertencentes à 12 classes taxonômicas. As classes representativas do maior percentual de espécies foram Chlorophyceae (28%) e Cyanophyceae (23%), as quais detêm mais de 50% das espécies identificadas no reservatório. Em ordem decrescente do percentual restante, seguem as demais classes: Zygnematomyceae (11%), Euglenophyceae (7%), Dinophyceae (6%), Bacillariophyceae (6%), Coscinodiscophyceae (5%), Trebouxiophyceae (5%), Cryptophyceae (3%), Mediophyceae (3%), Chrysophyceae (3%) e Eustigmatophyceae (1%).

Quanto aos índices de diversidade e riqueza fitoplanctônica, sob um aspecto geral, no período de agosto/2017 (seca) foi observado o menor índice de diversidade de Shannon ($H' = 1,54$) e equabilidade de Pielou ($J = 0,36$), porém quanto a riqueza (S) os períodos que representaram os menores valores foram outubro e dezembro/ 2017 (chuvoso), foi observada uma queda gradual da primeira para a última campanha (Figura 2). Em contrapartida, os períodos de dezembro/2016 e março/2017 representaram os maiores valores de riqueza ($S = 74$ e 75 , respectivamente). Paralelamente, com relação aos pontos amostrais ao longo das cinco campanhas, o ponto 1 (p1) na coleta de dezembro de 2017, foi o local amostral para o qual foram observados os maiores valores de equabilidade e diversidade ($J = 0,73$, $H' = 2,60$), já no ponto 1 (p1 em outubro) e ponto 7 (p7 em agosto) foram os menores valores ($J = 0,25$, $H' = 0,78$ e $J = 0,23$, $H' = 0,77$; respectivamente). Em contrapartida, em outubro/2017, o ponto 2 foi o que representou o maior valor de riqueza ($S = 40$), porém no mesmo período, este índice foi o menor em praticamente todos os demais pontos entre as cinco campanhas (Figura 3).

Figura 2 – Gráfico com os índices de diversidade geral entre as campanhas: índice de diversidade de Shannon (H), Equabilidade de Pielou (J) e riqueza (S)

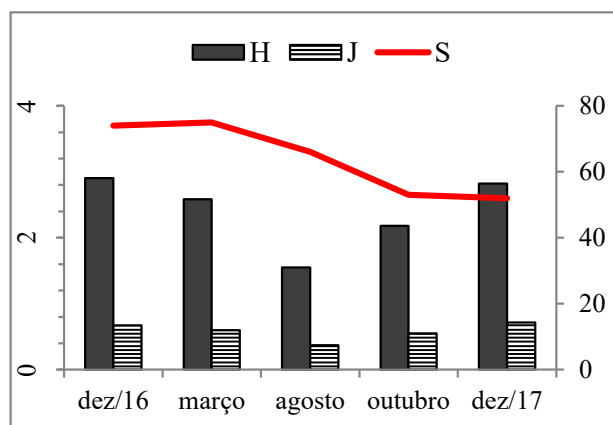
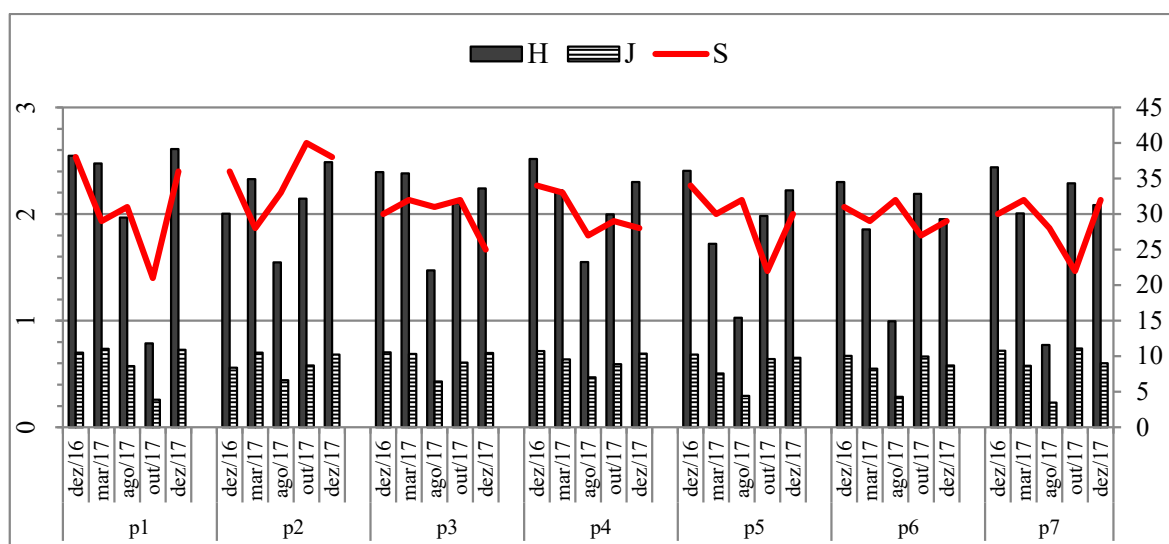
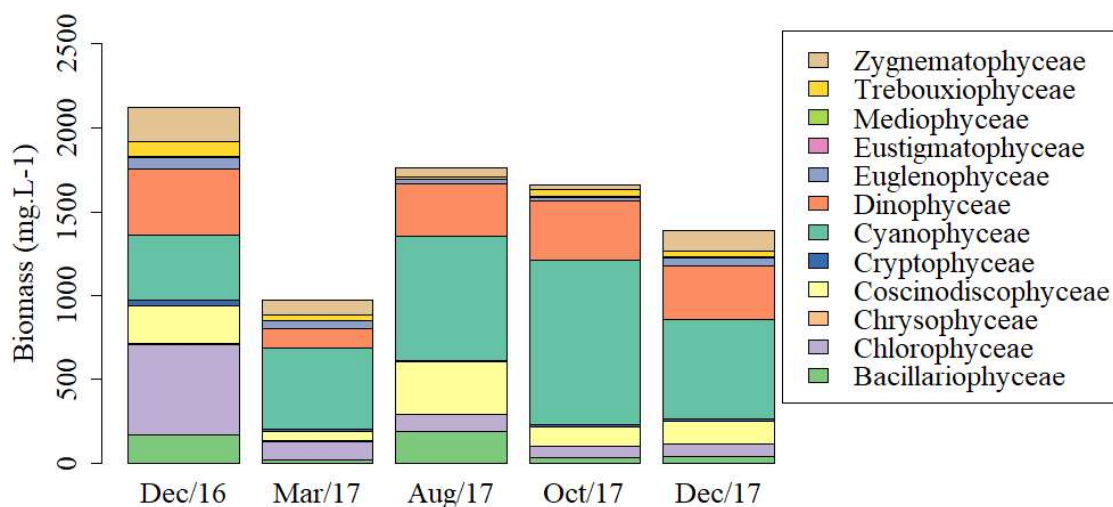


Figura 3 – Gráfico com os índices de diversidade específica entre os pontos amostrais.



Os maiores valores de biomassa total foram registrados na campanha de dezembro/2016 e os menores em março/2017. Quanto à biomassa por classe, Cyanophyceae e Dinophyceae foram as que se destacaram e representaram, respectivamente, 33% e 11% do valor acumulado entre as campanhas. Sob este aspecto geral, a biomassa das cianobactérias ainda foi muito superior aos demais grupos, variou de 386,1 mg.L⁻¹ a 3840,1 mg.L⁻¹, a média foi de 1331,68 mg.L⁻¹ ($\pm 1452,6$); o menor valor foi observado em dezembro/2016 e o maior em outubro/2017 (Figura 4). Ainda que a classe Dinophyceae tenha sido representativa, os valores variaram de 116,3 mg.L⁻¹ (em março) a 392,6 mg.L⁻¹ (em dezembro de 2016), a média foi de 298,7 mg.L⁻¹ ($\pm 107,3$), valores relativamente inferiores se comparados à biomassa das cianobactérias (Figura 4).

Figura 4 - Barplot com valores brutos de biomassa (mg L^{-1}) por classe em cada coleta.

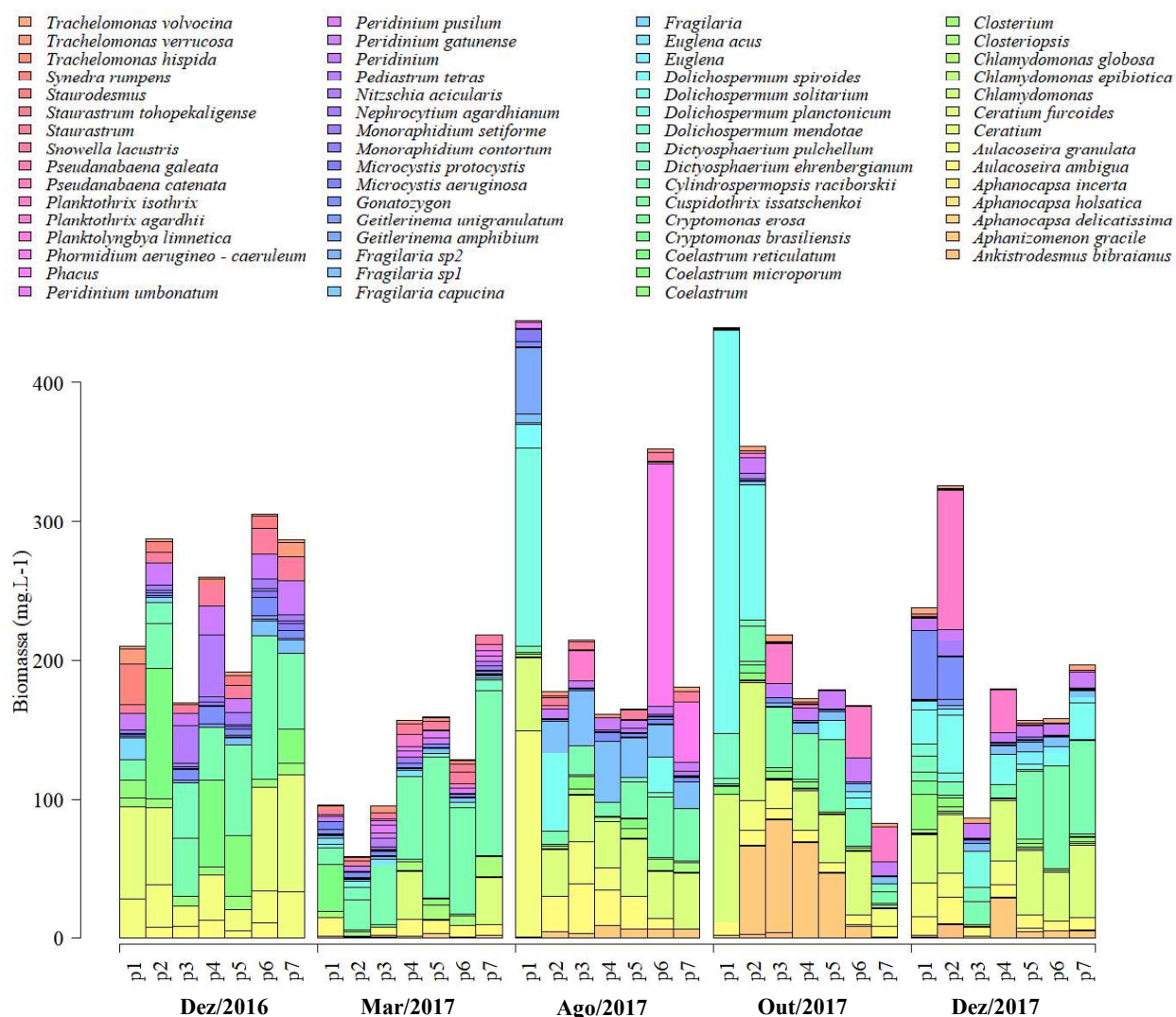


Fonte: Machado et al. (2021)

Com relação à biomassa das espécies entre os pontos amostrais, nas campanhas de dezembro/2016 a março/2017 (Figura 5) foi observada uma tendência no aumento destes valores por espécies, no sentido montante para jusante ($p1 \rightarrow p7$). Este comportamento, provavelmente está associado à heterogeneidade espacial do reservatório, pois, segundo Melo et al (2019), trata-se de um ambiente compartimentalizado em três regiões principais, havendo uma similaridade nas características ambientais entre o pontos $p1$ e $p2$ (montante) ; $p3$, $p4$ e $p5$ (intermediária); $p6$ e $p7$ (jusante). Neste sentido, os valores de biomassa para os pontos amostrais, parecem estar associados a esta compartimentalização, esta resposta da biomassa foi mais evidente nos compartimentos formados por $p1$ - $p2$ e por $p6$ - $p7$. Tais compartimentos têm características diferentes entre si e cada um é caracterizado pelo fato de os valores de biomassa entre as espécies identificadas seguirem um padrão, relativamente, similar entre os os pontos que representam cada compartimento.

Nos meses de outubro e dezembro/2017, porém, ocorreu um comportamento inverso, os maiores valores de biomassa foram registrados à montante ($P1$ e $P2$), quando também foi possível observar uma drástica mudança na composição fitoplânctônica e consequentemente na biomassa, havendo alternância entre a dominância de *Raphidiopsis raciborskii* por *Dolichospermum* spp e *Aphanizomenon gracile* (Figura 5).

Figura 5 - Barplot de biomassa das espécies descritoras. Colunas foram agrupadas de acordo com a ordem em que as campanhas foram realizadas, respectivamente: dezembro/2016, março/2017, agosto/2017, outubro/2017, dezembro/2017.

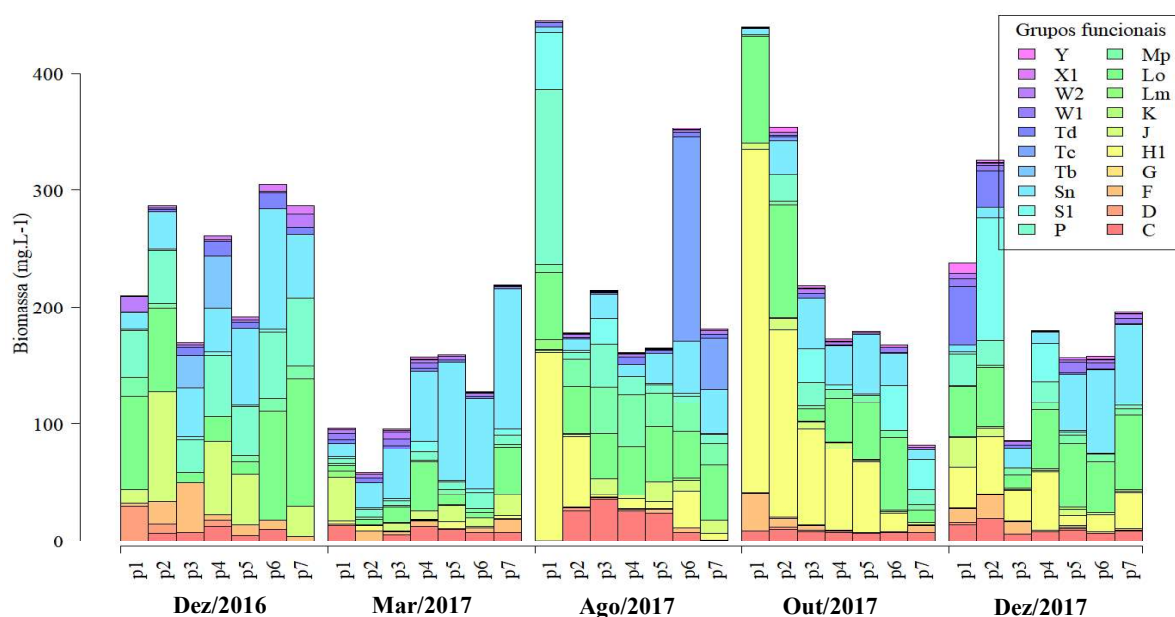


Ao longo dos pontos amostrais e entre as cinco campanhas, as espécies que tiveram abundância relativa acima de 5%, foram classificadas em 20 grupos funcionais fitoplanctônicos representados pelos seguintes códons, em ordem decrescente: Sn, H1, Lo, P, J, S1, C, Mp, F, Tc, Td, W2, Tb, D, W1, Y, X1, Lm, G, K (Figura 6). O códon **Sn** foi responsável por 42% da biomassa total, **H1** e **Lo** contribuíram igualmente com 14%, cada. Na sequência, os códons **P** e **J** representaram, respectivamente, 7% e 4% de toda biomassa, enquanto aqueles representados pelos códons **S1**, **C** e **Mp** representaram igualmente 3%, cada. Os códons **F**, **Tc** e **Td** representaram 2%. Por fim, os grupos **W2**, **Tb**, **D**, **W1**, **Y**, **X1**, **Lm**, **G**, **K** representaram $\leq 1\%$ da biomassa total (Figura 6).

A espécie que mais influenciou nos valores totais de biomassa foi *R. raciborskii* (máx. $951,9 \text{ mg.L}^{-1}$, média $127 \text{ mg.L}^{-1} \pm 220,11$) (Tabela 1), pertencente ao códon **Sn**, o qual representa o grupo das cianobactérias filamentosas, caracterizado pela elevada capacidade

adaptativa às variações ambientais, podendo habitar ambientes eutróficos, estratificados ou misturados, ou ainda, atuando como organismos competidores em ambientes túrbidos (Anexo 1) (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Também tiveram valores elevados de biomassa as espécies *D. solitarium* (máx. 621,5 mg.L⁻¹, média 65,9 mg.L⁻¹ ± 157,47), *D. planctonicum* (máx. 143,2 mg.L⁻¹, média 36,5 mg.L⁻¹ ± 60,3) e *A. gracile* (máx. 80,8 mg.L⁻¹, média 14,7 mg.L⁻¹ ± 24,05) representadas pelo códon **H1** (Figura 6), cujas características de habitat consistem em ambientes de baixa profundidade, eutrofizados e com baixas concentrações de nitrogênio. Também foi abundante o dinoflagelado *Ceratium furcoides* (máx. 92,3 mg.L⁻¹, média 48,3 mg.L⁻¹ ± 18,8), representado pelo códon **Lo** (Figura 6), cujo habitat é caracterizado pela segregação de nutrientes (Anexo 1) (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Os valores específicos de biomassa para cada espécie e GF estão apresentados na Tabela 1.

Figura 6 - Barplot de biomassa dos GF's. As colunas foram agrupadas de acordo com a ordem em que as campanhas foram realizadas, respectivamente: dezembro/2016, março/2017, agosto/2017, outubro/2017, dezembro/2017.



Os grupos representados pelos códons **P** e **J**, os quais tiveram contribuição média a baixa nos valores totais de biomassa possuem características de habitat similares e ambos representam espécies de clorofíceas. O códon **P** é característico de ambientes eutróficos rasos e habitam, normalmente, o epilímnio de lagos estratificados, sendo representado pelos gêneros *Staurastrum* sp (máx. 18,3 mg.L⁻¹, média 5 mg.L⁻¹ ± 5,1) e *Closterium* sp (máx. 9,5 mg.L⁻¹, média 5,2 mg.L⁻¹ ± 2,1) (Tabela 1). Paralelamente, as características do códon **J** também envolvem ambientes com baixa profundidade rico em nutrientes, porém, seu habitat

está relacionado às condições de mistura (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Os táxons mais representativos em biomassa pertencentes ao códon **J** foram *Coelastrum reticulatum* (máx. 93,8 mg.L⁻¹, média 63,2 mg.L⁻¹ ± 30,5) e *C. microporum* (máx. 43,3 mg.L⁻¹, média 10,8 mg.L⁻¹ ± 13,2) (Tabela 1).

Os códons **S1**, **C** e **Mp** representaram baixa contribuição nos valores totais de biomassa (Figura 6), entretanto, os taxons que compõem estes grupos não tiveram ocorrência constante, diferentemente daqueles que representaram a maior parte da biomassa entre todas as campanhas (**Sn**, **H1** e **Lo**). Nas campanhas e pontos amostrais nos quais foram identificados, quando presentes, tiveram valores elevados de biomassa (Tabela 1). Assim, o códon **S1**, o qual inclui apenas cianobactérias adaptadas a baixa luminosidade (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), esteve representado por *Planktothrix isothrix* (máx. 100,3 mg.L⁻¹, média 25,8 mg.L⁻¹ ± 29,3) e *Geitlerinema amphibium* (máx. 47,7 mg.L⁻¹, média 16,1 mg.L⁻¹ ± 27,3), sendo as espécies mais representativas em biomassa, pertencentes a este grupo. O códon **C**, cujo habitat é definido por ambientes eutróficos em condições de mistura (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), teve como espécie mais representativa em biomassa as diatomáceas *Aulacoseira granulata* (máx. 148,9 mg.L⁻¹, média 30,4 mg.L⁻¹ ± 32,3) e *A. ambigua* (máx. 35,5 mg.L⁻¹, média 11,7 mg.L⁻¹ ± 7,2). Apenas o códon **Mp**, que é característico de ambientes rasos em condições de mistura, teve ocorrência em praticamente todas as amostragens (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), esteve representado pelas diatomáceas do gênero *Fragilaria* sp (máx. 43,8 mg.L⁻¹, média 9,4 mg.L⁻¹ ± 10,9).

Os grupos representados pelos códons **F**, **Tc** e **Td** tiveram valores relativamente menores se comparados aos dos grupos anteriormente citados (Figura 6), porém, sua contribuição esteve acima de 1% do percentual total da biomassa registrada entre todas as campanhas. O códon **F**, cujo habitat é definido por lagos meso-eutróficos, claros e profundamente misturados, esteve representado principalmente por *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (máx. 40 mg.L⁻¹, média 10,9 mg.L⁻¹ ± 11,8) e *D. pulchellum* (máx. 32,4 mg.L⁻¹, média 9,9 mg.L⁻¹ ± 12,6) (Tabela 1). Os grupos representados pelos códons **Tc** e **Td** possuem como semelhança o tipo de habitat caracterizado por águas estacionárias, porém, diferem quanto a trofia, de modo que primeiro está relacionado a ambientes eutróficos e o segundo a ambientes mesotróficos. Além disso, o códon **Tc** é representado por cianobactérias e no presente estudo foram identificados indivíduos da espécie *Phormidium aerugineo-caeruleum* (máx. 174,4 mg.L⁻¹, média 73,6 mg.L⁻¹ ± 89,6) (Tabela 1). O códon **Td**, por outro lado, é representado por desmídias epífitas e metafíticas, algas verdes filamentosas e diatomáceas de sedimentos (BORICS et al., 2007; REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). No presente estudo o códon **Td** representou o gênero *Gonatozygon* sp, cuja ocorrência

foi identificada ao longo de todas as campanhas e pontos amostrais, de modo que na campanha de dezembro/2017 foram observados os maiores valores de biomassa (máx. 49,6 mg.L⁻¹, média 5,2 mg.L⁻¹ ± 9,5) (Tabela 1).

Tabela 1 – Biomassa (mg L⁻¹) por espécie e respectivo grupo funcional (GF) entre os pontos amostrais e campanhas.

Classe	GF	Dezembro de 2016							Março de 2017							Agosto de 2017							Outubro de 2017							Dezembro de 2017								
Espécie		p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7		
Bacillariophyceae																																						
Fragilaria sp1	Mp	15,9	3,5	-	-	4,4	10,7	10,0	1,9	1,2	1,4	1,3	4,4	3,3	2,2	7,2	23,3	39,9	43,8	28,9	23,8	18,7	0,9	2,8	2,4	7,3	6,2	5,8	4,7	0,6	2,3	5,9	6,6	6,9	6,8	4,8		
Fragilaria sp2	Mp	-	-	-	-	0,6	1,1	1,2	0,3	0,3	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitzschia acicularis	Tb	-	-	27,4	44,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chlorophyceae																																						
Ankistrodesmus bibratians	F	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	3,9	-	-	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	-	
Chlamydomonas ephibiotica	G	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,4	-	0,5	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	1,0	0,6	0,8	0,5	0,6	0,3	0,7	0,8	0,7	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	
Chlamydomonas globosa	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Closteropsis sp	J	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	6,9	10,0	7,5	14,6	2,0	2,3	4,2	2,8	6,9	8,9	7,8	0,2	0,5	0,7	1,1	1,4	1,7	1,7	0,4	1,3	0,8	1,2	1,6	1,1	1,1		
Coelastrum sp	J	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	5,2	5,2	4,3	-	-	-	-	25,2	6,1	-	-	-	3,5	-	0,4
Coelastrum microporum	J	-	-	-	-	43,3	-	25,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Coelastrum reticulatum	J	-	93,8	-	63,1	-	-	-	32,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Monoraphidium contortum	X1	0,0	0,4	0,5	0,4	1,5	4,0	5,0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,4	0,1	0,5	0,5	0,6	0,7	0,6	0,4	-	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	-	0,2	0,7	0,5	1,7	0,6	0,8		
Monoraphidium setiforme	X1	0,7	1,6	1,5	2,5	1,0	2,0	2,2	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pediastrum tetras	J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	3,9	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	0,4	-	-	
Cocconeidophyceae																																						
Aulacoseira ambigua	C	-	7,1	7,7	13,1	5,1	10,2	-	13,8	-	5,8	12,8	10,2	7,7	7,7	-	25,6	35,5	25,6	23,9	7,7	-	9,0	10,5	8,1	7,9	7,2	7,6	7,7	14,1	19,4	6,3	8,3	9,9	7,1	9,0		
Aulacoseira granulata	C	27,8	30,7	15,4	32,0	15,4	23,1	33,1	-	-	-	-	-	-	-	148,9	-	30,7	15,4	-	-	-	-	22,2	19,9	-	-	-	13,2	23,8	16,9	-	17,9	-	-	-	-	
Cryptophyceae																																						
Cryptomonas brasiliensis	Y	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,2	1,5	1,6	1,1	0,9	0,7	1,1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cryptomonas erosa	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	0,8	0,8	0,8	1,1	0,8	5,2	2,5	1,9	1,5	1,7	1,6	9,2	2,2	-	-	-	2,5	2,0		
Cyanophyceae																																						
Aphanizomenon gracile	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,8	2,8	0,8	1,5	-	4,3	2,9	8,7	5,9	6,3	5,9	2,0	63,4	80,8	68,5	45,8	8,1	0,4	0,7	-	0,1	28,3	4,2	5,0	4,7		
Aphanocapsa delicatissima	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Aphanocapsa holsatica	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Aphanocapsa incerta	K	-	-	-	-	-	-	-	0,0	0,5	-	0,2	0,2	-	0,3	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	-	-	0,7	0,8	1,0	0,9	0,9	0,7	0,9	1,2	1,1	2,4	-	1,0		
Cuspidolrix issatschenkoi	Sn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cylindrocapsa raciborskii	Sn	14,3	32,4	41,8	38,1	66,2	103,9	54,1	11,8	21,9	42,4	59,5	100,7	76,8	119,8	84,0	264,7	363,6	218,7	557,8	951,9	814,0	3,4	25,7	43,7	32,9	50,8	27,6	7,9	6,4	9,0	16,8	9,1	48,4	72,0	67,5		
Dolichospermum mendotae	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	143,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	-		
Dolichospermum planktonicum	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	-	0,8	-	56,0	-	-	-	24,9	-	621,5	135,9	0,1	-	14,5	5,7	-	24,6	42,1	-	21,4	4,0	9,4	25,9		
Dolichospermum solitarium	H1	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	17,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dolichospermum spiroides	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	47,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Geitlerinema amphibium	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Geitlerinema unigranulatum	S1	1,3	1,3	2,4	2,9	1,2	2,3	-	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	1,0	0,4	-	1,1	4,2	-	1,1	1,2	-	0,7			
Microcystis aeruginosa	Lm	-	-	-	-	-	-	-	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcystis protoeystis	Lm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	-	-	
Phormidium aerugineo-caeruleum	Tc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	174,4	43,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Planktolyngbya limnetica	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Planktolrix agardhii	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Planktolrix isolrix	S1	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	8,7	-	-	-	-	-	21,3	-	-	1,7	-	-	-	-	28,2	2,5	-	37,6	25,1	-	100,3	-	31,3	-	-	-	
Pseudanabaena catenata	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	0,8	0,4	0,6	0,4	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Pseudanabaena galeata	S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	0,2	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,7	0,7	0,5	0,8	-	0,4	0,7	0,1	0,3	0,4	0,4	1,1	-
Snowella lacustris	Lo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

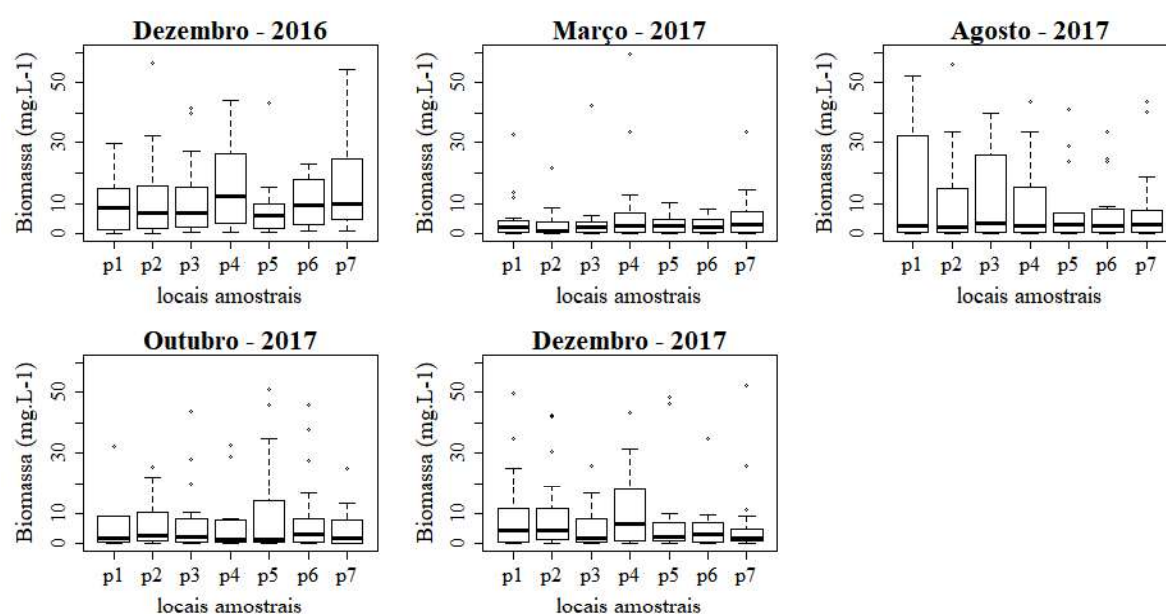
Continua

Conclusão

Classe	GF	Dezembro de 2016							Março de 2017							Agosto de 2017							Outubro de 2017							Dezembro de 2017							
Espécie		p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	
Dinophyceae																																					
<i>Ceratium furcoides</i>	Lo	67,2	56,3	-	-	-	75,0	84,4	-	-	-	33,6	-	-	33,6	52,3	33,6	33,6	33,6	41,1	33,6	40,3	92,3	84,9	-	28,9	34,7	45,7	-	34,7	42,5	-	43,4	46,3	34,7	52,1	
<i>Peridinium</i> sp	Lo	12,3	16,0	8,6	20,6	10,1	17,5	24,5	4,1	4,0	-	-	-	-	-	-	6,8	5,0	8,2	6,0	6,2	6,3	-	-	11,9	10,4	8,4	14,0	16,6	10,5	8,2	8,0	10,7	6,9	7,9	8,2	11,2
<i>Peridinium gautense</i>	Lo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peridinium pusillum</i>	Lo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7	4,6	5,3	4,1	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peridinium umbonatum</i>	Lo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	3,3	-	-	3,3	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Euglenophyceae																																					
<i>Euglena acus</i>	W1	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-	5,5	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phacus</i> sp	W1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Trachelomonas hispida</i>	W2	-	-	-	-	-	-	-	3,3	2,8	2,5	2,5	-	2,5	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trachelomonas verrucosa</i>	W2	10,8	-	-	-	-	-	10,1	-	-	3,0	-	2,5	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trachelomonas volvocina</i>	W2	1,8	1,6	1,5	1,2	2,2	1,1	2,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,3	-	0,4	-	0,4	-	0,6	-	3,0	-	2,8	4,1	2,8	-	-	-	2,3	4,5	2,1	3,3	-	2,1	3,0	3,5
Trebouxiophyceae																																					
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	F	-	15,0	40,0	-	-	-	-	-	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	5,8	11,5	-	10,2	-	1,3	-	0,9
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	7,5	-	-	-	3,1	2,8	-	32,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nephrocytium agardhianum</i>	F	2,2	4,1	2,2	4,5	9,0	7,5	4,5	-	-	2,2	4,5	-	-	3,6	-	0,4	-	1,2	-	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zygnematiophyceae																																					
<i>Closterium</i> sp	P	6,3	6,3	6,6	5,1	9,5	5,8	7,8	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	3,2
<i>Gonatozygon</i> sp	Td	1,3	1,8	7,2	12,4	5,0	13,4	5,4	3,3	4,2	3,4	2,6	2,1	2,0	2,0	3,8	1,2	1,3	6,5	2,4	3,3	3,1	0,9	1,3	3,5	0,8	1,1	0,8	0,6	49,6	30,8	2,5	0,9	0,9	0,7	0,6	0,6
<i>Staurastrum</i> sp	P	5,7	7,8	6,4	15,4	10,1	18,3	17,2	3,6	3,3	4,1	7,1	6,6	8,1	7,9	-	5,7	5,7	-	6,9	6,2	7,8	-	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2

Além da alternância entre a ocorrência dos GF's, a biomassa fitoplanctônica sinalizou, em termos gerais, uma variação discrepante entre os locais amostrais e as campanhas. Contudo, ainda que seus valores médios tenham variado, isso não ocorreu de forma estatisticamente significativa ($p>0,05$). Embora valores discrepantes de biomassa tenham sido observados, principalmente na campanha de agosto/2017, os mesmos se comportaram como outliers, sem que houvesse interferência efetiva nas médias (Figura 7).

Figura 7 – Boxplots com os valores totais de biomassa (mg L^{-1}) entre as campanhas e estações amostrais.



Nesse contexto, os valores médios de biomassa não refletiram os efeitos do estado trófico do reservatório de Itupararanga, o qual variou de supereutrófico a oligotrófico no sentido montante para jusante (P1→P7) (MELO et al 2019). Segundo os autores, nos pontos localizados à montante (P1 e P2) o índice de estado trófico variou de eutrófico a supereutrófico, enquanto que na região jusante (P5, P6, P7) ocorreu certa melhora, variando entre mesotrófico e oligotrófico. Em contrapartida, a distribuição da biomassa fitoplanctônica não seguiu esta variação, de modo que os pontos localizados à montante foram os que apresentaram elevada diversidade e valores de biomassa relativamente equilibrados entre os principais GF's (Figura 5 e Figura 6). A predominância do códon **Sn** (representado pela cianobactéria *R. raciborskii*) que mais influenciou nos valores da biomassa entre todas as coletas, com exceção do mês de outubro/2017, foi inversamente proporcional ao gradiente de trofia relatado pelos

autores. Tal constatação indica que a ocorrência desta espécie independe do estado trófico do reservatório, visto que os picos nos valores de biomassa deste grupo, coincidem com a região para a qual foi registrada menor trofia (P7, próximo à barragem) (Figura 6).

Por meio da correlação de Pearson, testada para as variáveis ambientais a partir dos dados apresentados por Melo et al (2019), juntamente com os valores de biomassa dos GF's identificados no presente estudo, foi observada correlação significativa ($p < 0,05$) para as seguintes variáveis: nitrogênio total (TN), fósforo total (TP), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), ortofosfato (PO_4^{3-}), razão nitrogênio : fósforo (N/P), clorofila-a (Chl-a), zona eufótica (Euf.Zon), temperatura (T), profundidade (Depth), pH, condutividade elétrica (EC), turbidez (TURB) e potencial redox (Eh). Tais variáveis tiveram correlação com ao menos um dos grupos funcionais identificados (Tabela 2). A variável oxigênio dissolvido (DO) não esteve correlacionada à nenhum GF, sendo assim, foi descartada dos testes posteriores por apresentar baixa ou nenhuma influência sob a comunidade fitoplanctônica. Por outro lado, as variáveis que tiveram correlação significativa com o maior número de GF's foram: temperatura (T), correlacionada à 9 códons (**F, G, K, Lm, Tc, Td, W₂, X₁, Y**) e zona eufótica (Euf.Zon), correlacionada à 6 códons (**H₁, J, Sn, Td, W₂, X₁**). Os grupos funcionais mais representativos em biomassa (**Sn e H₁**) estiveram correlacionados às variáveis: TN, PO_4^{3-} , Chl-a, Euf.Zon, EC, razão N/P, Depth, pH, TURB, Eh. O códon **Lo**, entretanto, não teve correlação com nenhuma das variáveis testadas.

Tabela 2 – Tabela de correlação de Pearson. Valores destacados em negrito tiveram correlação significativa ($p \leq 0,05$).

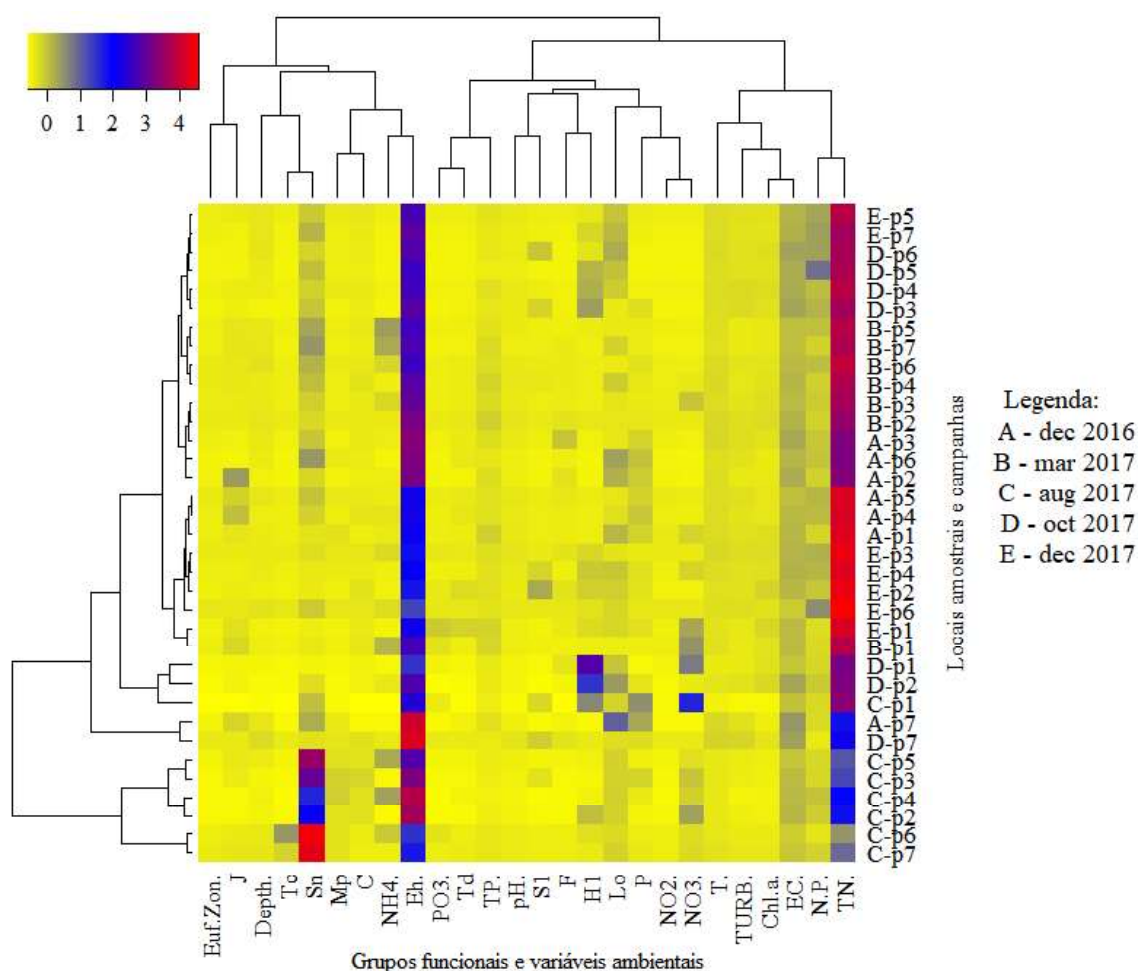
Continua

GF	TN	NO_2	NO_3^-	NH_4^+	TP	PO_4^{3-}	N/P	Chl-a	Euf.Zon	Depth	T	pH	DO	EC	TURB	Eh
B	0,86	0,45	0,42	0,69	0,61	0,64	0,77	0,78	0,28	0,43	0,20	0,63	0,87	0,59	0,58	0,88
C	0,83	0,58	0,41	0,37	0,61	0,63	0,48	0,63	0,44	0,43	0,51	0,61	0,04	0,54	0,84	0,48
D	0,51	0,05	0,75	0,88	0,13	0,47	0,78	0,57	0,74	0,02	0,07	0,15	0,59	0,14	0,60	0,67
F	0,41	0,28	0,30	0,85	0,08	0,53	0,19	0,21	0,57	0,04	0,00	0,91	0,94	0,01	0,19	0,73
G	0,12	0,19	0,20	0,89	0,18	0,22	0,57	0,99	0,21	0,31	0,00	0,33	0,13	0,25	0,19	0,92
H0	0,30	0,37	0,14	0,43	0,12	0,00	0,68	0,03	0,61	0,13	0,80	0,22	0,74	0,04	0,79	0,69
H1	0,39	0,68	0,11	0,11	0,80	0,03	0,03	0,01	0,00	0,03	0,14	0,00	0,39	0,00	0,02	0,01
J	0,80	0,07	0,70	0,31	0,05	0,93	0,62	0,39	0,01	0,53	0,12	0,53	0,25	0,81	0,62	0,69
K	0,60	0,09	0,01	0,02	0,55	0,34	0,20	0,43	0,89	0,91	0,00	0,30	0,96	0,42	0,00	0,02
Lm	0,89	0,01	0,01	0,26	0,24	0,00	0,66	0,57	0,77	0,71	0,04	0,74	0,92	0,27	0,10	0,32
Lo	0,57	0,24	0,73	0,16	0,52	0,38	0,52	0,62	0,33	0,92	0,34	0,31	0,69	0,44	0,30	0,13
Mp	0,03	0,37	0,84	0,77	0,61	0,18	0,72	0,01	0,44	0,10	0,33	0,52	0,13	0,12	0,58	0,77

GF	TN	NO ₂	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	TP	PO ₄ ³⁻	N/P	Chl-a	Euf Zon	Depth	T	pH	DO	EC	TURB	Eh
P	0,48	0,04	0,94	0,66	0,24	0,73	0,18	0,09	0,09	0,40	0,27	0,81	0,99	0,78	0,71	0,61
S1	0,79	0,82	0,17	0,03	0,94	0,69	0,21	0,29	0,40	0,54	0,14	0,18	0,85	0,87	0,28	0,11
Sn	0,01	0,32	0,41	0,45	0,94	0,04	0,76	0,00	0,01	0,07	0,47	0,61	0,37	0,00	0,07	0,43
Tb	0,81	0,97	0,24	0,66	0,82	0,50	0,82	0,57	0,23	0,39	0,16	0,71	0,44	0,85	0,84	0,64
Tc	0,01	0,81	0,18	0,36	0,75	0,15	0,44	0,30	0,35	0,24	0,01	0,78	0,93	0,29	0,18	0,70
Td	0,67	0,23	0,26	0,65	0,06	0,70	0,95	0,69	0,04	0,37	0,02	0,74	0,29	0,44	0,57	0,83
W1	0,20	0,79	0,81	0,40	0,34	0,22	0,44	0,06	0,66	0,55	0,14	0,07	0,34	0,31	0,44	0,84
W2	0,67	0,11	0,19	0,87	0,15	0,27	0,62	0,50	0,03	0,38	0,00	0,74	0,74	0,55	0,46	0,66
X1	0,74	0,44	0,04	0,62	0,51	0,10	1,00	0,08	0,01	0,72	0,02	0,69	0,36	0,68	0,43	0,94
Y	0,68	0,08	0,24	0,43	0,20	0,37	0,73	0,67	0,11	0,55	0,02	0,93	0,32	0,39	0,14	0,73

Na análise cluster, por meio do dendrograma e o *heatmap* dos agrupamentos entre as variáveis ambientais e os grupos funcionais, foi possível observar a formação de três grandes grupos basendo-se na maior distância entre os mesmos (Figura 8). O primeiro agrupamento foi caracterizado pela similaridade entre as variáveis ambientais: Euf.Zon, Depth, NH₄⁺, Eh com os GF's: **J, Tc, Sn, Mp, C**. O segundo agrupamento foi composto pelas variáveis ambientais PO₄³⁻, TP, pH, NO₂, NO₃ juntamente com os GF's: **Td, S1, F, H1, Lo, P**. O terceiro e último agrupamento não envolveu GF, sendo constituído apenas por variáveis ambientais (T, TURB, Chl-a, EC, N/P, TN). Entretanto, ainda que a dissimilariade deste último agrupamento tenha sido o suficiente para distingui-lo dos demais, o nível hierárquico ao qual pertence denota relativa similaridade entre este e o segundo agrupamento (Figura 8).

Figura 8 – *Heatmap* e dendrogramas dos clusters entre os grupos funcionais que contribuíram com mais de 1% da biomassa total entre todas as campanhas.

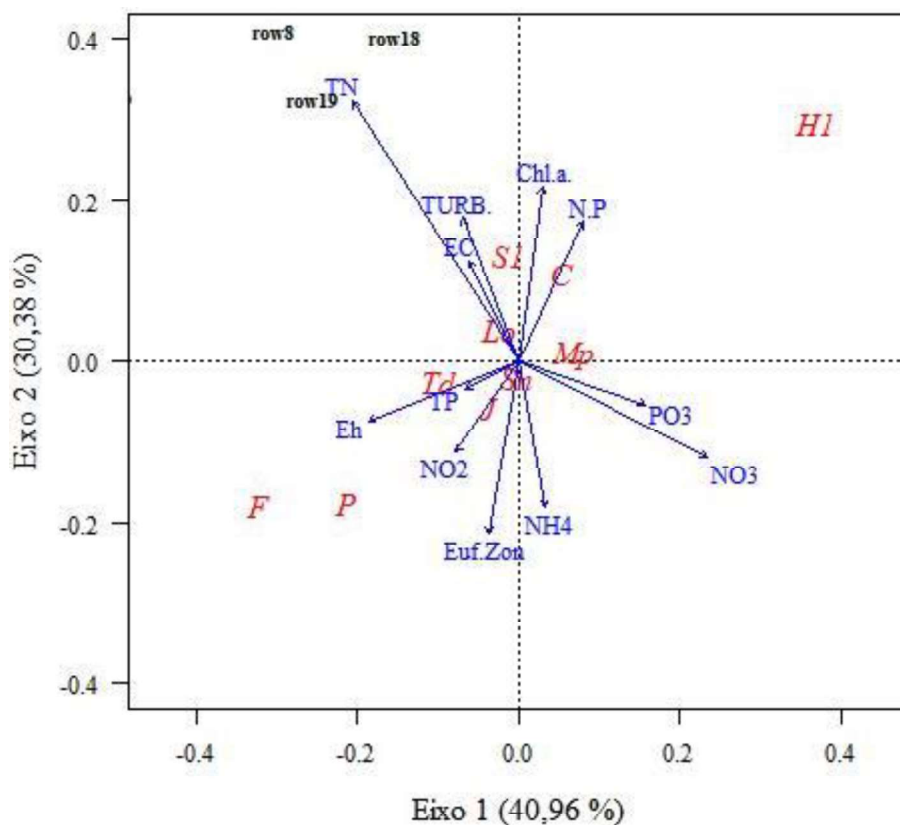


A CCA teve alto poder explanatório, de modo que os dois primeiros eixos explicaram 71,34% da variação dos dados (40,96% pelo eixo 1 e 31,38% pelo eixo 2) (Figura 9). Por meio da CCA, também foi possível observar correlação entre variáveis Euf.Zon e NH_4 e o códon **Sn** (Figura 9), confirmando a tendência observada, anteriormente, no primeiro agrupamento na análise cluster (Figura 8). O arranjo da CCA também possibilitou observar que os outros dois principais grupos funcionais (**H₁** e **Lo**) estiveram correlacionados àquelas variáveis que, anteriormente, não foram aglomeradas no mesmo agrupamento por conta da fraca similaridade, mas que pertenciam ao mesmo nível hierárquico. Portanto, na CCA o códon **H₁** esteve correlacionado à razão N/P e o códon **Lo** correlacionado à TN, EC e TURB.

Os grupos que tiveram contribuição moderada nos valores biomassa (**F**, **P**, **J**, **Td**) estiveram correlacionados às variáveis Eh, TP, NO_2 , opostamente localizados ao códon **H₁**. Já o códon **S₁** teve correlação positiva com a Chl-a e sua posição no arranjo

da CCA foi pontualmente oposta à variável Euf.Zon. O códon **Mp** ficou opostamente posicionado às variáveis Eh e TP, enquanto que o códon **C** teve correlação com razão N/P.

Figura 9 – Plot da CCA entre as variáveis ambientais e grupos funcionais mais representativos em biomassa (> 1%).

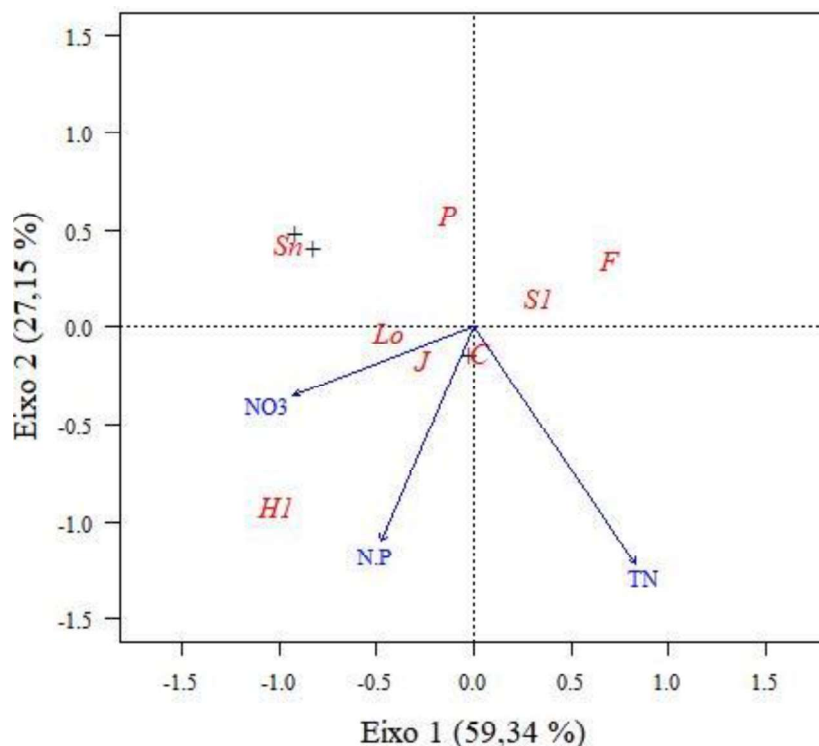


Legenda: nitrogênio total (TN), fósforo total (TP), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), ortofosfato (PO_4^{3-}), razão nitrogênio : fósforo (N/P), clorofila-a (Chl-a), zona eufótica (Euf.Zon), profundidade (Depth), pH, condutividade elétrica (EC), turbidez (TURB) e potencial redox (Eh).

Neste sentido, a CCA validou tendências observadas nas análises *a priori* e, em termos gerais, possibilitou identificar as repostas dos grupos funcionais às principais variáveis ambientais. Com base no resultado da ANOVA aplicada para os scores das variáveis ambientais gerados na CCA, foi possível constatar que as variáveis que tiveram influência significativa ($p < 0,05$), na análise, foram TN, NO_3^- e N/P. Corroborando com Cunha & Calijuri (2011b) já que os outros também relataram a influência significativa de NO_3^- na abundância dos grupos fitoplanctônicos, na estação seca, principalmente. Neste contexto a RDA (Figura 10) foi ainda mais robusta que a

CCA, explicando 86,5 % do efeito destas variáveis na ocorrência dos GF's (59,34 % pelo eixo 1 e 27,15 % pelo eixo 2).

Figura 10 - Plot da RDA entre as variáveis ambientais com influência significativa na variação dos dados e os grupos funcionais mais representativos em biomassa (> 1%).



Legenda: nitrogênio total (TN), nitrato (NO_3^-), razão nitrogênio: fósforo (N/P).

No arranjo da RDA, a ordenação do códon **Sn** (juntamente com **Tc** e **Mp**) esteve alocada no quadrante oposto à direção do gradiente da variável TN, confirmando as características de tolerância a baixa disponibilidade de nitrogênio que a *R. raciborskii* possui (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Este resultado justifica sua elevada biomassa e a presença de heterocistos, os quais foram observados, principalmente, no período de agosto/2017, quando os teores deste nutriente foram menores (MELO et al., 2019).

4 DISCUSSÃO

A composição fitoplanctônica esteve relativamente semelhante àquela relatada por Cunha e Calijuri (2011b) nos principais tributários do reservatório de Itupararanga, considerando, tanto a diversidade de códons identificados pelos autores (23), quanto a constatação dos agrupamentos mais frequentes, dentre eles o códon **Sn** em agosto. Tais grupos são típicos, em sua maioria, de ambientes quentes, rasos, meso-

eutróficos e com coluna de água misturada (REYNOLDS et al. 2002). Cunha & Calijuri (2011b) comentam que a elevada diversidade de agupamentos identificada nos tributários do reservatório de Itupararanga é relativamente maior se comparada a outros ambientes aquáticos (por exemplo, ALVES-DE-SOUZA et al. 2006 descreveram 8 grupos na Lagoa Comprida-RJ; MOURA et al. 2007 relataram 18 grupos no reservatório Mundaú-PE; FONSECA & BICUDO 2008 identificaram 13 grupos no Lago das Garças-SP, SANTOS et al. 2018 encontraram 15 grupos em estudo realizado nos reservatórios dos Sistema Cantareira). No presente estudo, a ausência de variações significativas na coluna d'água pode ter sido um dos fatores relacionados à ocorrência constante dos agrupamentos mais representativos dentre todas as campanhas (**Sn**, **H1** e **Lo**), já que o reservatório constitui um ambiente lacustre, mantendo condições mais estáveis da coluna d'água, se comparada a de seus tributários.

Esteves (2011) define que fontes de poluição pontuais são um fator importante na distribuição horizontal do fitoplâncton, pois na zona de influência dos efluentes desenvolvem-se comunidades capazes de suportar grandes oscilações das principais variáveis ambientais, tais como temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez e nutrientes. Assim, a elevada diversidade identificada pelo presente estudo, na região montante (P1 e P2), pode ter ocorrido em detrimento do intenso aporte de esgoto doméstico relatado para estes locais (MELO et al 2019, BEGHELLI et al. 2016). Tais características alteram diretamente a estabilidade da coluna d'água, modificando assim a ocorrência das espécies de acordo com suas tolerâncias e sensibilidades (HUSZAR & CARACO 1998, REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009, NISHIMURA et al. 2015).

No caso do códon **Sn**, especificamente, sua resposta à variações ambientais confirma que a ocorrência deste grupo é favorecida quando a disponibilidade de nutrientes é restritiva, pois o fato de estar correlacionada à zona eufótica e ao amônio indica tolerância aos efeitos da diminuição do gradiente trófico. Além disso, ainda que sua capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico seja uma vantagem, trata-se de um processo energeticamente dispendioso, e muitas cianobactérias diazotróficas suprimem a fixação de N₂ quando formas alternativas de nitrogênio, como amônio e nitrato, estão disponíveis (HUISMAN et al. 2018). Rodrigues et al. (2019), descrevem resultados semelhantes, relatando a ocorrência desta espécie em reservatórios oligo-mesotróficos, entretanto, os autores comentam que todos os reservatórios estudados são fortemente

expostos aos impactos negativos relacionados ao uso e ocupação do solo em seu entorno, bem como, o aporte de efluentes domésticos sem tratamento.

Casali et al. (2017) identificaram a dominância de *R. raciborskii* na região da barragem na estação seca, além disso, a sensibilidade deste grupo às variações climáticas foi observada pelos autores, de modo que na estação chuvosa, foi relatada a dominância de *Monoraphidium contortum*. Cunha e Calijuri (2011b) analisaram a comunidade fitoplanctônica dos principais afluentes do reservatório Itupararanga e relataram que a participação do grupo **Sn** foi relevante apenas em agosto de 2009 (máximos de 36,2% na estação Ressaca), com porcentagens não significativas em outubro de 2009 e fevereiro de 2010. A localização deste afluente abrange a região intermediária do reservatório (P4 e P5), indicando que as condições ambientais deste tributário também influenciam na composição fitoplanctônica do reservatório, principalmente no sentido da barragem. Os autores também comentam sobre a mudança da composição fitoplanctônica no verão, confirmando a variação sazonal da comunidade fitoplanctônica no reservatório, com a alternância entre espécies adaptadas às condições de mistura por aquelas adaptadas à estratificação. Outros estudos também identificaram a dominância deste códon e em outros reservatórios brasileiros (FIGUEREDO & GIANI 2009, MOSCHINI-CARLOS et al. 2009, MACHADO et al. 2016, SANTOS et al 2018, VICENTIN et al 2018, RODRIGUES et al. 2019).

Os outros códons os quais compartilharam posições próximas ao grupo **Sn** no arnajo da RDA, representados pelos gêneros *P. aerugineo - caeruleum* (**Tc**) e *Fragilaria* sp (**Mp**) possivelmente por possuírem tipo de habitat similar entre si, como ambientes eutróficos em condições de mistura (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). A ocorrência destes grupos esteve correlacionada ao grupo **Sn**, de modo que o grupo **Tc** foi observado apenas nos pontos P6 e P7, não sendo observado em todas as campanhas. O fato deste grupo ocorrer somente na região da barragem pode ser explicado pelo tipo habitat que o favorece, como águas estacionárias ou rios de fluxo lento (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Neste sentido, como a região da barragem constitui um ambiente lacustre (THORTON et al. 1990), a manutenção deste habitat favoreceu a ocorrência pontual e expressiva deste códon na estação seca (agosto/2017).

O grupo **Mp**, por sua vez, ainda que tenha representado valores discretos em biomassa, sua distribuição ao longo dos pontos amostrais seguiu o mesmo gradiente que o códon **Sn**, sugerindo que este grupo também seja tolerante às baixas concentrações de

nutrientes, inclusive de fósforo, no sentido da barragem. O arranjo da CCA corrobora esta observação, já que nele, o códon **Mp** ficou opostamente posicionado ao gradiente da variável TP. Wengrat et al. (2016) ao descreverem a ocorrência de espécies do gênero *Fragilaria* em reservatórios da região metropolitana de São Paulo, em ambientes eutróficos com elevados teores de TN (méd. 1191,25 $\mu\text{g L}^{-1}$) e teores moderados TP (méd. 47,3 $\mu\text{g L}^{-1}$), corroborando com as condições ambientais em que o códon **Mp** foi correlacionado no presente estudo. A respeito do padrão de ocorrência deste agrupamento ser similar ao do códon **Sn**, Visser et al. (2016) comentam que em alguns casos, existe alternância entre a ocorrência de diatomáceas e alguns gêneros de cianobactérias.

No caso do códon **H₁**, tanto na RDA quanto na CCA, esteve correlacionado à razão N/P, sinalizando sua relação com o limitação por fósforo, já que Melo et al (2019) constataram que este é o nutriente limitante resultante desta ponderação. Esta relação corrobora com o fato de a ocorrência do códon **H₁** se dar principalmente na região montante do reservatório (P1 e P2), locais classificados como eutrófico ou supereutrófico. Assim, confirmando suas características funcionais em termos de sensibilidade à baixos teores de fósforo (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), já que a variação da biomassa deste agrupamento foi proporcional ao gradiente de TP.

Melo et al (2019), bem como estudos anteriores (CUNHA & CALIJURI 2011a, BEGHELLI et al. 2016) relataram que a alta trofia na região montante decorre, principalmente, do aporte de esgoto não tratado oriundo de municípios os quais fazem parte da bacia hidrográfica do reservatório. Como resultado, tais condições possibilitam a ocorrência de um número maior de espécies nesta região, devido às condições favoráveis criadas em função da elevada disponibilidade de nutrientes. Desta forma, o processo de eutrofização e a deterioração da qualidade da água em todo o reservatório são, permanentemente, sustentados por estas fontes de poluição (BEGHELLI et al. 2016). Foi observado um gradiente decrescente na trofia, no sentido montante para jusante (MELO et al. 2019). Neste sentido, por meio do presente estudo, observou-se que o grupo funcional **H₁** tem boa resposta em relação à variação da trofia, já que sua ocorrência corroborou com o gradiente decrescente do estado trófico do reservatório (de supereutrófico na região montante a meso-oligotrófico na região próxima à barragem).

O códon **H₁** foi representado pelas cianobactérias *Dolichospermum* spp e *A. gracile*, tais espécies são frequentemente relacionadas à ambientes altamente

eutrofizados, com elevadas cargas de nutrientes e capazes de suportar grandes oscilações das variáveis ambientais (MOSCHINI-CARLOS et al. 2009, NISHIMURA et al. 2014, MACHADO et al. 2016, VICENTIN et al. 2018, RODRIGUES et al. 2019). Esta capacidade se deve às vantagens adaptativas que estes organismos possuem, como presença de acinetos, aerótopos e heterocistos os quais, respectivamente, permitem que haja mobilidade destes organismos na coluna d'água em ambientes estratificados; fixação de N_2 e produção células germinativas na presença de condições ambientais restritivas (PAERL E PAUL, 2012, HUISMAN et al. 2018).

Concomitantemente, a CCA também evidenciou uma leve correlação do códon **Lo** (representado por *C. furcoides*, principalmente) entre e as variáveis TN, TURB e EC, as quais estão diretamente relacionadas às características de ambientes eutrofizados. Já na RDA a correlação com a variável NO_3 foi mais evidente e a posição do grupo na análise foi intermediária a dos grupos **H₁** e **Sn**, sugerindo que as características entre estes e o grupo **Lo**, no reservatório, sejam relativamente similares. Esta resposta é plausível, considerando que este grupo possui tolerância à estratificação da coluna d'água e à consequente segregação de nutrientes (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). Segundo estes autores, esta característica é possível por conta da capacidade dos dinoflagelados, em realizar movimentos entre os diferentes estratos. Tal adaptação permitiu sua ocorrência independentemente dos períodos: hora em condições de baixa disponibilidade de fósforo, na estação seca (agosto/2017), fixando o nitrato disponível em condições de mistura; hora em condições de estratificação, na estação chuvosa (outubro/2017), ajustando-se à segregação de nutrientes. A estratificação ocorrida em outubro/2017 parecer ter um efeito favorável à ocorrência deste códon, pois, neste período a biomassa deste grupo seguiu relativamente a mesma tendência do códon **H₁**, distribuindo-se como um gradiente decrescente no sentido da barragem.

Por outro lado, Rodrigues et al (2019) observaram a dominância de *C. furcoides* associada à menores níveis de trofia nos reservatórios Igaratá e no Atibainha, que integra o Sistema Cantareira. Neste caso os autores comentam que mudanças no nível do reservatório durante a seca atípica de 2013-2015 também podem ter afetado a estrutura do fitoplâncton nesse ambiente (RODRIGUES et al. 2019).

O códon **S₁**, representado pelas cianobactérias *P. isothrix* e *G. amphibium*, teve correlação positiva com a Chl-a e sua posição no arranjo da CCA foi pontualmente oposta à variável Euf.Zon, corroborando com sua adaptação em ambientes com alta

turbidez (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009). O códon **F** representado pelas clorófitas coloniais do gênero *Dictyosphaerium* sp, esteve correlacionado principalmente ao potencial oxirredutor (Eh) na CCA. Segundo Reynolds et al. (2002) e Padisák et al. (2009), este GF é sensível ao déficit de carbono, nesse sentido, o fato de ter sido correlacionado ao potencial oxirredutor, pode estar relacionado a esta sensibilidade, já que em ambientes estratificados a disponibilidade de carbono diminui, ficando retido na termóclina, devido ao ambiente reduzido (SANTOSO et al. 2017). Entretanto na RDA, os códons **S₁** e **F** estiveram opostos aos grupos cujas respostas à variação das condições ambientais foram bem definidas (**S_n** e **H₁**). O fato de não estarem correlacionados às variáveis ambientais que foram significativas para a regulação da comunidade fitoplanctônica, sinaliza que sua ocorrência independe das mesmas. Entretanto, ambos os GFs (**S₁** e **F**) são tolerantes à baixa disponibilidade de nutrientes e elevada turbidez (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), o que pode representar um problema em ambientes eutrofizados, possibilitando a formação de florações quando houver condições restritivas para outros organismos sensíveis. No caso do grupo **S₁** essas consequências podem ser agravadas pelo fato deste códon constituir um grupo de cianobactérias potencialmente tóxicas, assim com **S_n** e **H₁** (PAERL & PAUL 2012; O'FARRELL et al. 2015).

Em todas as campanhas houve a coocorrência dos grupos **S_n** e **H₁**, a alternância observada entre a dominância destes códons esteve relacionada à heterogeneidade sazonal em detrimento das condições de estratificação da coluna d'água. Os efeitos da heterogeneidade sazonal refletiram tanto nos valores de biomassa entre os grupos, quanto na composição fitoplanctônica, isoladamente. Figueredo e Giani (2009) comentam que a ausência de correlações entre a biomassa de cianobactérias dominantes e a disponibilidade de fósforo pode sugerir a influência de outras variáveis ambientais, ou ainda, haver sinergismo entre variáveis que favorecem o domínio constante de *R. raciborskii*. A dominância desta destas cianobactérias ocorre de maneira generalizada em diversos reservatórios brasileiros, em diferentes condições ambientais (FIORE et al. 2005, FIGUEREDO & GIANI 2009, MOSCHINI-CARLOS et al. 2009, CUNHA & CALIJURI 2011b, MACHADO et al. 2016, CASALI et al. 2017, SANTOS et al. 2018, RODRIGUES et al. 2019).

No presente estudo a dominância de *R. raciborskii* parece estar mais relacionada às características físicas do ambiente do que químicas, em virtude da correlação inicial com variáveis como zona eufótica e profundidade. Neste sentido, é

provável que os maiores valores de biomassa do códon **Sn**, foram uma resposta ao efeito sinérgico destas variáveis e as características ambientais. Figueredo e Giani (2009) em estudo realizado na Lagoa Santa, relataram que a ocorrência de *R. raciborskii* não teve correlação com a sazonalidade, pois, mesmo com a precipitação significativa, não foi observada estratificação da coluna da água. Assim, o fato de haver condições de mistura permanentes, independente da precipitação, favoreceram a dominância desta espécie, demonstrando que a regulação da mesma está mais condicionada às condições da coluna d'água do que ao regime de precipitação em si. Neste sentido, no presente estudo, além das adaptações referentes à baixa disponibilidade de nutrientes anteriormente citadas, pode-se dizer que a abundância do códon **Sn** também foi impulsionada pela ausência de estratificação.

A ocorrência e dominância de cianobactérias geralmente são associadas à maior estabilidade da coluna água (CALIJURI et al. 2002; KOMARKOV a et al. 2003). No caso da *R. raciborskii* (**Sn**), porém, alguns autores consideram que esta espécie está bem adaptada à ambas condições da coluna de água, podendo ser estáveis (HARRIS & BAXTER 1996) ou instáveis (DOKULIL & TEUBNER 2000; BURFORDET al. 2006; FIGUEREDO & GIANI, 2009). No presente estudo, um dos principais fatores que pode ter promovido a alternância entre a dominância os códons **Sn** e **H₁** é o fato de o grupo **Sn** ser sensível ao aumento da vazão (*flushing*) e à estratificação que ocorrem nos períodos de maior precipitação (REYNOLDS et al. 2002), como o que ocorreu em outubro/2017 (MELO et al. 2019).

A aplicação dos grupos funcionais neste estudo constituiu uma ferramenta valiosa para a compreensão dos processos biogeoquímicos e ecológicos do reservatório de Itupararanga. Esta abordagem também possibilitou identificar os principais efeitos das variáveis ambientais na comunidade fitoplanctônica, validando e evidenciando características, vulnerabilidades e possíveis impactos aos quais o reservatório está exposto. Apesar da aplicação da metodologia de GF's fornecer subsídios em estudos ecológicos, Padisák et al. (2009) comentam a respeito de fragilidades a cerca desta abordagem. Os autores comentam que a classificação a partir deste critério exige conhecimento da autoecologia do fitoplâncton, visto que espécies pertencentes ao mesmo gênero podem ser alocadas em códons distintos, já que morfologias semelhantes podem ter diferentes adaptações ecológicas. Ainda assim, o devido uso desta abordagem tem fornecido dados importantes sobre os ecossistemas aquáticos brasileiros, demonstrando que o gerenciamento dos recursos hídricos pode ser

beneficiado a partir da avaliação por agrupamentos funcionais (GEMELGO et al. 2009; CUNHA & CALIJURI 2011b; NISHIMURA et al 2014; SANTOS et al. 2018).

4 CONCLUSÕES

O grupo funcional representado pelo códon **Sn**, do qual faz parte a cianobactéria *R. raciborskii*, foi o mais representativo em termos de biomassa dentre todas as cinco campanhas, no reservatório de Itupararanga. Sua ocorrência demonstrou-se bem estabelecida ao longo do reservatório, sendo que sua característica de elevada adaptabilidade ecofisiológica às mais diversas condições, tornou propícia sua ocorrência mesmo em situações restritivas, como a diminuição no gradiente dos teores de nitrogênio disponível no sentido da barragem.

Os grupos **H₁** e **Lo** tiveram representatividade moderada em relação ao códon **Sn**, mas estiveram correlacionados principalmente às características de eutrofização, diferentemente do grupo **Sn**, cuja ocorrência no reservatório Itupararanga independe da elevada disponibilidade de nutrientes.

A abundância dos principais grupos funcionais respondeu à heterogeneidade sazonal e espacial no reservatório. É provável que a ocorrência de estratificação da coluna d'água relatada para outubro/2017, tenha favorecido alternância na ocorrência dos códons **Sn** e **H₁-Lo**, o que reduziu a disponibilidade de nutrientes, principalmente fósforo que é o fator limitante da produtividade primária no reservatório. Os efeitos da heterogeneidade espacial repercutiram na formação de diferentes gradientes de biomassa para cada grupo. Assim, no sentido P1 → P7, o gradiente de biomassa foi crescente para o códon **Sn**, enquanto que para **H₁**, no mesmo sentido, ocorreu de modo decrescente.

As variáveis que mais influenciaram na composição fitoplanktônica no reservatório foram nitrogênio total, nitrito e a razão N/P resultando em fósforo como nutriente limitante. O grupo **H₁** teve boa resposta ao gradiente de fósforo e da trofia, cuja sensibilidade ao déficit deste nutriente foi observada no sentido P1 → P7.

O fato de os valores médios da biomassa bruta não variarem seguindo o mesmo gradiente trófico o qual o reservatório possui, sugere que a apenas uma abordagem qualitativa do índice de estado trófico pode conduzir a uma interpretação incompleta quanto às reais condições ecológicas do ecossistema. Ainda que seja utilizada a média ponderada entre clorofila-a e fósforo para classificar o estado trófico do reservatório, a análise da composição da comunidade fitoplanktônica e a abordagem dos grupos

funcionais foi essencial para identificar potenciais fatores que colocam em risco a qualidade da água. Esta constatação é justificada pelo fato de haver dominância de uma espécie potencialmente tóxica em regiões do reservatório onde a trofia aparentemente era menor.

Tais constatações evidenciam a eficácia do uso dos grupos funcionais como descritores ambientais, sendo uma importante ferramenta em estudos em ecossistemas aquáticos de água doce, por fornecerem uma abordagem complementar e holística a cerca dos ciclos biogeoquímicos que estes ambientes constituem.

CAPÍTULO 2 - PERMANENT OCCURRENCE OF *Raphidiopsis raciborskii* AND CYANOTOXINS IN A SUBTROPICAL RESERVOIR POLLUTED BY DOMESTIC EFFLUENTS (ITUPARARANGA RESERVOIR, SÃO PAULO, BRAZIL)

Leila dos Santos Machado^{1*}, Fabiane Dörr², Felipe Augusto Dörr², Daniele Frascareli¹, Darllene S. Melo¹, Erik S.J. Gontijo¹, Kurt Friese³, Ernani Pinto², André Henrique Rosa¹, Marcelo M Pompêo⁴, & Viviane Moschini-Carlos¹

¹University of São Paulo State (UNESP), ICT, Sorocaba Campus, Sorocaba, Brazil

²University of Sao Paulo, Laboratory of Toxin and Algae Natural Products, São Paulo, Brazil

³UFZ-Helmholtz Centre for Environmental Research, Lake Research Department, Brueckstr 3a, 39114 Magdeburg, Germany

⁴ University of São Paulo, Department of Ecology, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Toxic cyanobacteria blooms are a frequent problem in subtropical reservoirs and freshwater systems. The purpose of this study was to investigate the occurrence of potentially toxic cyanobacteria and the environmental conditions associated with the presence of cyanotoxins in a Brazilian subtropical reservoir. Five collections were carried out at seven sampling locations in the reservoir, during the rainy and dry seasons, between the years 2016 and 2017. There was permanent occurrence of *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique & Salerno, ranging between dominant and abundant, with an average biomass of $38.8 \pm 29.9 \text{ mg L}^{-1}$. Also abundant were *D. solitarium*, *D. planctonicum*, *P. isothrix*, and *A. gracile*. Saxitoxin (STX) was detected in all the collected samples ($0.11 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Microcystin (MC) was also detected, but at lower concentrations ($0.01 \pm 0.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Low availability of NO_3^- and phosphorus limitation had significant effects on the *R. raciborskii* biomass and the levels of STX and MC. It was observed that *R. raciborskii* was sensitive to thermal stratification, at the same time that STX levels were

higher. This suggested that STX was produced under conditions that restricted the growth of *R. raciborskii*. These are important findings, because they add information about the permanent occurrence of STX and *R. raciborskii* in an aquatic ecosystem limited by phosphorus, vulnerable to climatic variations, and polluted by domestic effluents.

Keywords: Eutrophication, saxitoxin, microcystin, biomass, blooms, aquatic ecosystem

1 INTRODUCTION

Tropical and subtropical regions are those most affected by the occurrence of potentially toxic cyanobacteria blooms (WHO 2017). Freshwater ecosystems in these regions are environments conducive to the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins, because in addition to the favorable climate, they frequently contain high levels of nutrients (Mowe et al. 2015).

Several studies point to evidence in other regions of the world that harmful cyanobacterial blooms have increased on a global scale over the past few decades, and that they are likely to expand further in the coming decades, due to continued eutrophication and global warming (Paerl & Paul 2012; Antunes et al. 2015; Huisman et al. 2018; Pham et al. 2020). Given forecasts of increased eutrophication, warming, and salinization, cyanobacterial blooms will become more intense in tropical reservoir regions (Amorim et al., 2020).

Brazil was the first country to create specific legislation containing guidelines aimed at controlling cyanotoxins and cyanobacteria in drinking water (Bittencourt-Oliveira et al. 2014). According to this legislation, a cyanotoxin analysis must be performed weekly when the cyanobacterial density exceeds 20,000 cells mL⁻¹, observing the maximum acceptable values of 3 µg L⁻¹ for saxitoxin (STX) and 1 µg L⁻¹ for microcystins (MC) (Brazil, 2021). This occurred after the reported intoxication of 131 chronic kidney disease patients at a hemodialysis clinic in the city of Caruarú (Pernambuco State, Brazil), due to contamination of the water by microcystins (Carmichael et al. 2001). Studies have reported the occurrence of blooms of potentially toxic species in different regions of Brazil, mainly associated with the presence of *R. raciborskii* and *Microcystis* spp. (Figueredo & Giani 2009; Moschini-Carlos et al. 2009; Cunha & Calijuri 2011b; Bittencourt-Oliveira et al. 2014; Fonseca et al. 2014;

Nishimura et al. 2014; Machado et al. 2016; Casali et al. 2017; Santos et al. 2018; Vicentin et al. 2018; Rodrigues et al. 2019). The identified cyanotoxins included saxitoxins, microcystins, and cylindrospermopsin (Molica et al. 2002; Moschini-Carlos et al. 2009; Bittencourt-Oliveira et al. 2014; Casali et al. 2017; Pedrosa et al. 2020).

Toxic cyanobacteria blooms in eutrophic reservoirs represent a major public health problem. Pedrosa et al. (2020) reported that saxitoxin had a synergistic effect in Zika virus (ZIKV) infections in Northeast Brazil, even at concentrations considered safe ($<3.00 \mu\text{g L}^{-1}$). The authors reported that STX doubled the amount of ZIKV induced neural cell death in progenitor areas of the human brain organoid, while chronic ingestion of STX-contaminated water before and during pregnancy caused brain abnormalities in the offspring of ZIKV-infected mice. Facciponte et al. (2018) investigated the exposure route of aerosolized STX, showing contamination of the human respiratory tract. Christensen and Khan (2020) reported several other routes of exposure to this toxin, leading to lethal and sublethal effects, together with bioaccumulation, due to different types of direct and indirect contact.

The occurrence of microcystins has been associated with high concentrations of nitrogen, with blooms generally occurring during the rainy season and with high temperatures (Mowe et al. 2015). Worldwide, the taxa frequently identified in blooms with the presence of MC are *Microcystis aeruginosa*, *M. protocystis*, *M. panniformis*, *Plankthrix agardhii*, *P. isothrix*, and *Dolichospermum* (Molica et al. 2002; Moschini-Carlos et al. 2009; Sant'Anna et al. 2011; Paerl & Paul, 2012; Merel et al. 2013; Bittencourt-Oliveira et al. 2014; Funari et al. 2017; Huisman et al. 2018; Pham et al. 2020). Blooms dominated by these species are more frequent in the summer, when the warm climate favors an increase of biomass and the occurrence of cyanotoxins tends to be higher (Trung et al. 2018). The production of MC can be stimulated in the presence of competing species in the growth medium, such as chlorophytes (*Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová and *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat (Bittencourt-Oliveira et al. 2015). In addition to allelopathic interactions, herbicides and nutrient variation in aquatic ecosystems alter the physical and chemical characteristics of water, which could favor the production of cyanotoxins (Brêda-Alves et al. 2020).

The occurrence of STX, produced by toxic strains of *R. raciborskii*, is related to high temperatures, being common in periods of drought and low nitrogen availability (Mowe et al. 2015). The ability to fix atmospheric nitrogen is one of the main

adaptations of *R. raciborskii*, enabling its growth in environments limited by phosphorus (Kenesi et al. 2009; Piccini et al. 2011). This allows the maintenance of these species in different environments, despite not necessarily being correlated to environmental variables (Figueredo & Giani 2009). In addition, some studies mention the allelopathic effect of *R. raciborskii*, inhibiting the development of species of the genus *Microcystis*, favoring monospecific blooms (Mello et al. 2012; Mowe et al. 2015; Brêda-Alves et al. 2020). Furthermore, *R. raciborskii* is not tolerant to stratification of the water column and flushing (Reynolds et al., 2002; Padisák et al., 2009). However, the many ecophysiological adaptations reflect the high genetic variability of this species, accounting for its wide occurrence in different regions of the world (Piccini et al. 2011; Antunes et al. 2015; Vanderley et al. 2021).

The problem of eutrophication is global, with widespread occurrence of potentially toxic species, highlighting the need to understand the most important environmental factors influencing this phenomenon (Moschini-Carlos et al. 2009, 2010; Yamamoto et al. 2011; Paerl & Paul, 2012; Merel et al. 2013; Beghelli et al. 2016; Machado et al. 2016; Huisman et al. 2018; Pompêo et al. 2021). Such studies are crucial to support strategies for the management of these environments, aiming at achieving good ecological status and guiding public health actions (Cardoso-Silva et al. 2015; Pompêo et al. 2021). Therefore, in order to better understand the dynamics of cyanobacteria in an eutrophic subtropical reservoir, the aims of this study were to i) describe the phytoplanktonic community, ii) investigate the occurrence of cyanotoxins (microcystin and saxitoxin), iii) elucidate the relationship between cyanotoxins and the cyanobacteria biomass, and iv) identify the environmental conditions that significantly influence the presence of cyanotoxins.

2 MATERIALS AND METHODS

1.1 Study site

The Itupararanga reservoir is located in the southeastern region of São Paulo State, Brazil (Fig. 1). The main channel of the reservoir is 26 km long and the average depth is 7.8 m, reaching 21 m. The climate in the region is typically subtropical and the average temperature varies between 18 and 22 °C (Melo et al., 2019).

Approximately 63% of the water of this reservoir is used for public supply in several cities located in its vicinity, serving around 800,000 people (Pedrazzi et al. 2013; Rosa et al. 2015). Recent studies have reported significant degradation of the

reservoir water quality, due to inflows of domestic effluents in the fluvial region (Cunha & Calijuri 2011a; Taniwaki et al. 2013; Beghelli et al. 2016; Melo et al. 2019). During the period of sample collection, the reservoir was characterized as super-eutrophic (Melo et al. 2019), based on the trophic status index model adapted by Cunha et al. (2013) for tropical and subtropical reservoirs.

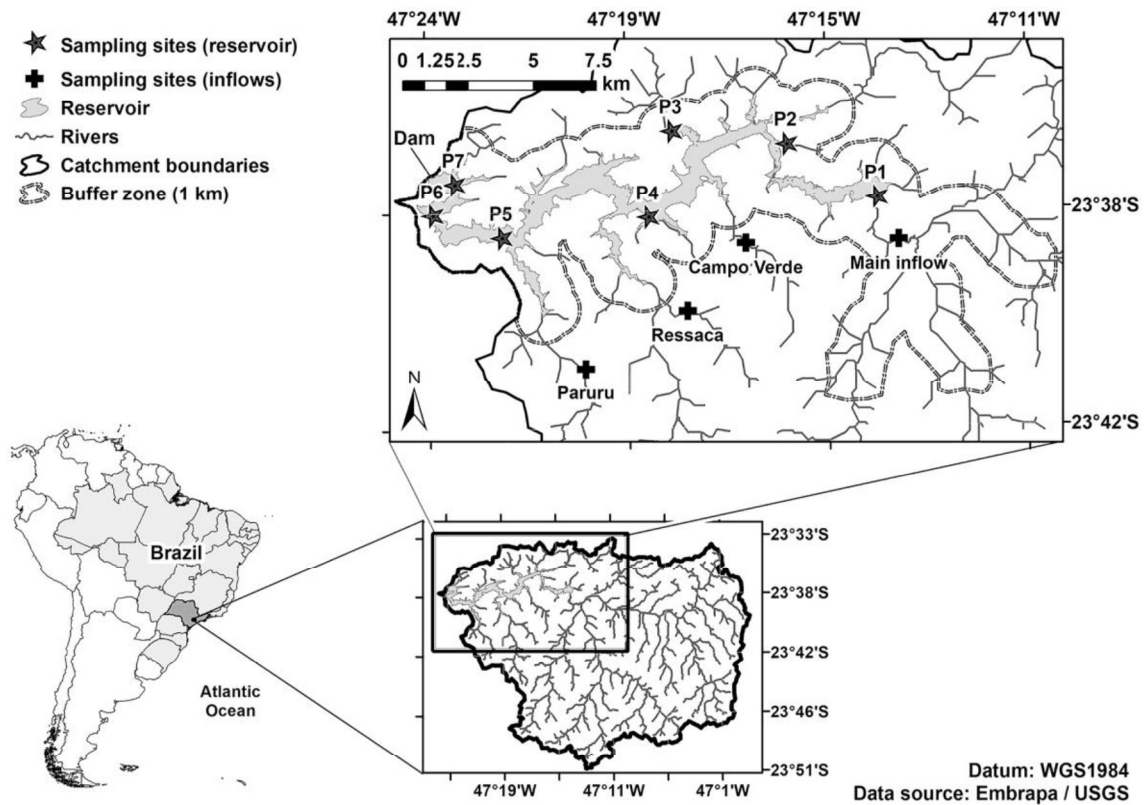


Fig. 1 Map of the Itupararanga reservoir and locations of the sampling points. Original source: Melo et al. (2019).

1.2 Sample collection methods

Samples were collected at seven points (P1-P7) along the longitudinal axis of the reservoir (Fig. 1). The choice of locations considered the characteristics of use and occupation of the margins, as described by Rosa et al. (2015). Five collections were performed during the rainy and dry seasons, in the years 2016 and 2017 (December 2016, March 2017, August 2017, October 2017, and December 2017). The rainy season was from October to March and the dry season was from April to September (Melo et al. 2019).

Data reported previously for the Itupararanga reservoir (Melo et al. 2019) were used as a reference for the limnological characterization of the water, considering the

following parameters: total nitrogen (TN), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), total phosphorus (TP), orthophosphate (PO_4^{3-}), chlorophyll-a (Chl-a), euphotic zone (EZ), depth, temperature (T), pH, electrical conductivity (EC), turbidity (TURB), and redox potential (Eh).

1.3 Analytical methods

For quantitative analysis of phytoplankton, integrated samples of the water column were collected with a plastic hose (1 m length) and were fixed with 1% acetic lugol. The identification of cyanobacteria was based on the studies of Komárek & Anagnostidis (1999, 2005), Sant'Anna et al. (2004, 2006, 2012), and Nogueira et al. (2011). Counting was performed as described by Utermöhl (1958), using an inverted Zeiss AxioVert microscope. The biovolume was determined as described by Hillebrand et al. (1999) and Sun & Liu (2003). Phytoplankton biomass was estimated according to Wetzel and Likens (2000), where $1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$. Species were considered abundant when their biomass represented more than 5% of the total biomass.

Samples were collected for analysis of free STX and MC present in the reservoir water. In the laboratory, the samples were filtered using glass fiber filters (Whatman GFC) with pore size of $1.2 \text{ }\mu\text{m}$. The STX content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the Saxitoxin Plate Kit (Beacon Analytical Systems, USA), according to the manufacturer's recommendations.

The analysis of microcystins was performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). For this, a 400 mL volume of each sample was submitted to solid phase extraction (SPE) using 500 mg Sep-Pak C18 6cc Vac cartridges (Waters, USA), according to the methodology described by Kim et al. (2009). The cartridges were previously conditioned with 10 mL of HPLC grade methanol, followed by 10 mL of Milli-Q water. After eluting the samples, the cartridges were cleaned with 10 mL of Milli-Q water and 10 mL of 20% methanol. Finally, the analytes of interest were eluted with 10 mL of 80% methanol and the eluate was dried at $35 \text{ }^\circ\text{C}$, under nitrogen. The dry material was resuspended in 1 mL of 70% methanol and filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ PVDF membrane (Millipore, USA). The analysis employed a 1260 Infinity chromatograph (Agilent Technologies, USA), which was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies, USA) equipped with electrospray ionization (ESI) and operated in positive mode at 3500 V (in the Supplementary Information (SI), Tables 1-2 and Figs. 1-2 support this analysis).

1.4 Statistical analysis

The inclusion and exclusion criteria for the environmental variables used in the statistical analysis were based on the results obtained using the Pearson linear correlation test. The entire matrix of the set of physical, chemical, and biological water data was used, including cyanobacteria identified with abundance >5%. The classification of the magnitude of the coefficients was based on Cohen (1988). Next, each step described had the objective of identifying the most influential environmental variables in the statistical models. Thus, adjusted models were designed to better explain the influence of environmental variables on the production of cyanotoxins. Canonical correspondence analysis (CCA) was used to identify the environmental variables and species correlated to STX and MC. For this, the data set was treated by log10 transformation. In order to identify the environmental variables that had a significant effect in the CCA model, the scores were subjected to analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$). A simple linear regression analysis was then performed, according to the patterns observed in the fitted CCA model, in order to determine the effects of the most significant environmental variables on the occurrence of cyanotoxins. For MC, which does not have a normal distribution, the Spearman correlation test was used. All the analyses were performed using the R[®] 3.4.0 Vegan 2.5-2 software package (Oksanen et al. 2018).

3 RESULTS

The Cyanophyceae were major contributors to the biomass of the phytoplankton community in the Itupararanga reservoir. Among all groups, cyanobacteria represented 40.3% of the total biomass, with higher levels at the end of the dry period (August 2017) and the beginning of the rainy period (October 2017) (Fig. 2). Among the abundant species identified, *R. raciborskii* was dominant in December 2016 and March 2017, with its occurrence remaining constant in the other collections (Fig. 3, Table 1). *R. raciborskii* showed permanent occurrence in the reservoir, with no significant seasonal variations of its biomass (mean 38.8 ± 29.9 mg L⁻¹). The apparently seasonal species included *Phormidium aerugineo-caeruleum* (Gomont) Anagnostidis & Komárek (mean 73.5 ± 89.6 mg L⁻¹), which only occurred at points P6 and P7, in August 2017. Other abundant species were *Dolichospermum solitarium* (Klebahn) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek (mean 41.3 ± 73.5 mg L⁻¹), *Dolichospermum planctonicum* (Brunnthal) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek (mean 36.5 ± 60.3 mg

L⁻¹), *Planktothrix isothrix* (Skuja) Komárek & Komárková (mean 25.8 ± 29.3 mg L⁻¹), and *Aphanizomenon gracile* Lemmermann (mean 14.7 ± 24 mg L⁻¹) (Fig. 3, Table 1).

Between the dry period (August 2017) and the beginning of the rainy period (October 2017), the cyanobacteria composition altered, with abundance of the species *D. solitarium*, *P. isothrix*, and *A. gracile*, in addition to *R. raciborskii* (Fig. 3).

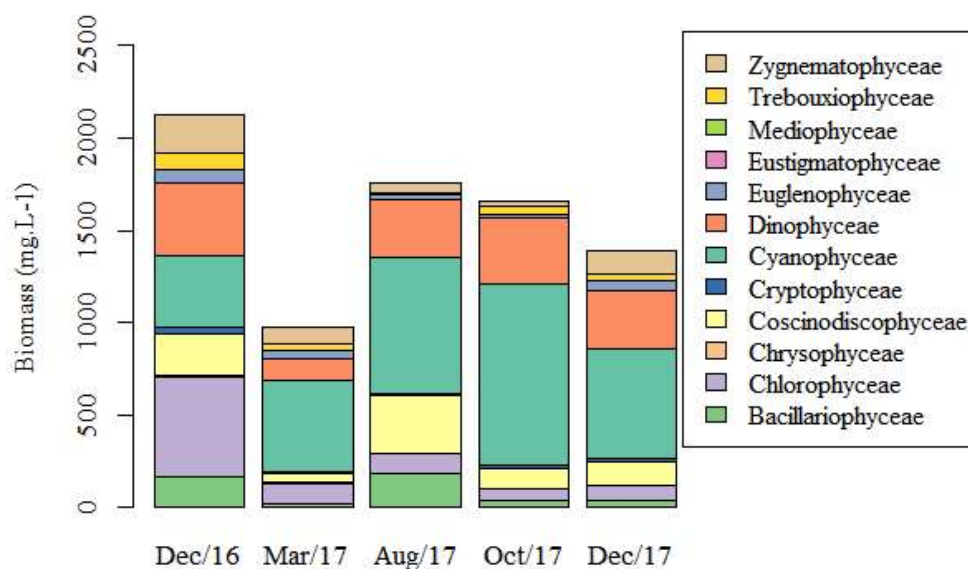


Fig. 2 Total biomasses of the phytoplankton classes in the Itupararanga reservoir during the periods December 2016, March 2017, August 2017, October 2017, and December 2017.

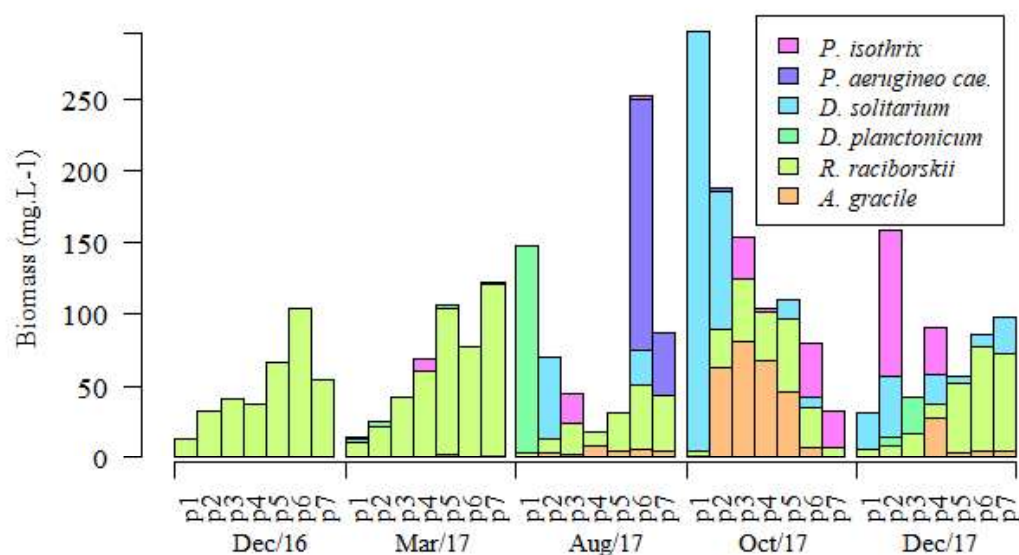


Fig. 3 Biomasses of abundant cyanobacteria (>5%) during the periods December 2016, March 2017, August 2017, October 2017, and December 2017.

The average cyanobacteria biomass varied among the sampling periods, indicating a seasonal response of these organisms (Fig. 4a). Spatial heterogeneity of the reservoir was also evident, since the average cyanobacteria biomass varied among the sampling points (Fig. 4a).

Free STX was detected, with an average concentration of $0.11 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ over the five collections. Among the MC variants evaluated, only MC-LR was detected at low concentrations ($0.01 \pm 0.0 \mu\text{g L}^{-1}$) (Table 1).

Although both cyanotoxins were detected at low concentrations, the patterns of occurrence were different (Fig. 4b, Table 1). There was permanent presence of STX and MC-LR, with the compounds occurring in all five collections between December 2016 and December 2017. The lowest levels of STX were observed in August 2017, when the biomass values were also lower (Fig. 4b).

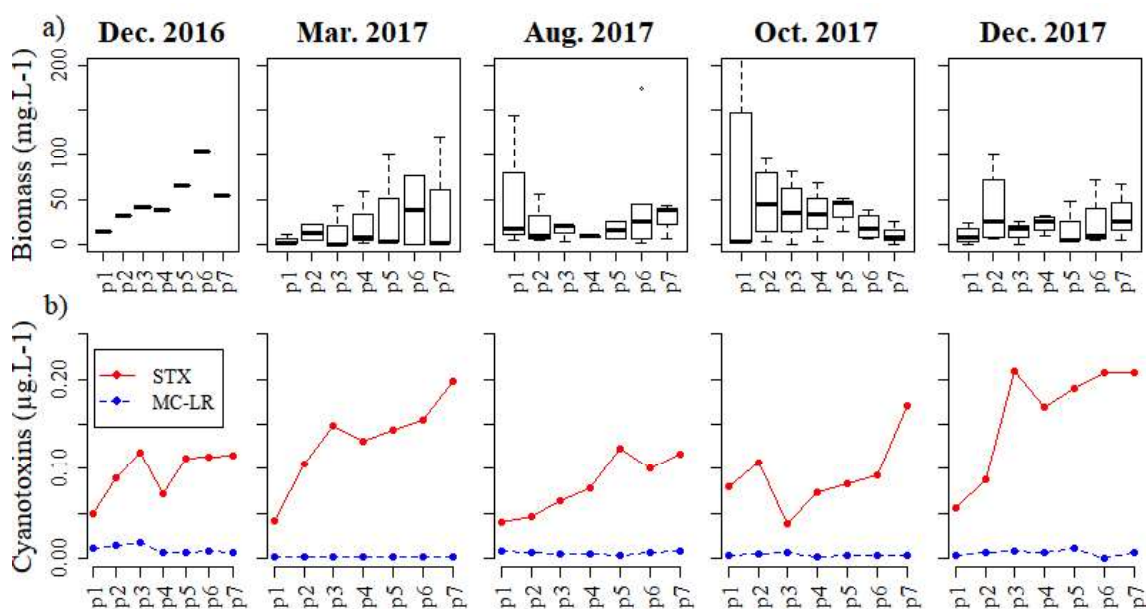


Fig. 4 a) Box plots of cyanobacteria biomasses (mg L^{-1}) in the different collections, and b) contents ($\mu\text{g L}^{-1}$) of saxitoxin (STX) and microcystin (MC-LR).

The environmental variables that showed significant effects in the CCA were TN, NO_2^- , NO_3^- , and PO_4^{3-} (Table 1). The model provided high explanatory power, with the first two axes explaining 79.5% of the data variation (42.06% by axis 1 and 37.44% by axis 2) (Fig. 5).

Variables	avg.	min.	max.	SD
TN ($\mu\text{g L}^{-1}$)	484.66	166.0	1210.00	215.16
NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.44	0.40	10.80	2.36
NO ₃ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	81.09	7.90	295.80	83.22
PO ₄ ³⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	22.50	3.80	60.40	18.66
STX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.11	0.04	0.21	0.05
MC-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.01	0.00	0.02	0.00
<i>Aphanizomenon gracile</i> (mg L ⁻¹)	14.70	0.13	80.81	24.06
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (mg L ⁻¹)	38.80	3.43	119.76	29.99
<i>Dolichospermum planctonicum</i> (mg L ⁻¹)	36.54	3.00	143.22	60.37
<i>Dolichospermum solitarium</i> (mg L ⁻¹)	41.32	0.31	290.57	73.56
<i>Phormidium aerugineo-caeruleum</i> (mg L ⁻¹)	73.57	2.75	174.36	89.64
<i>Planktothrix isothrix</i> (mg L ⁻¹)	25.81	1.35	100.30	29.37

Table 1 Average (avg), minimum (min), maximum (max), and standard deviation (SD) values for the variables analyzed using CCA: total nitrogen (TN), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), and orthophosphate (PO₄³⁻) (data reported by Melo et al. (2019) for the period from December 2016 to December 2017), and saxitoxin (STX), microcystin (MC-LR), and abundant cyanobacteria biomasses (data obtained in the present study).

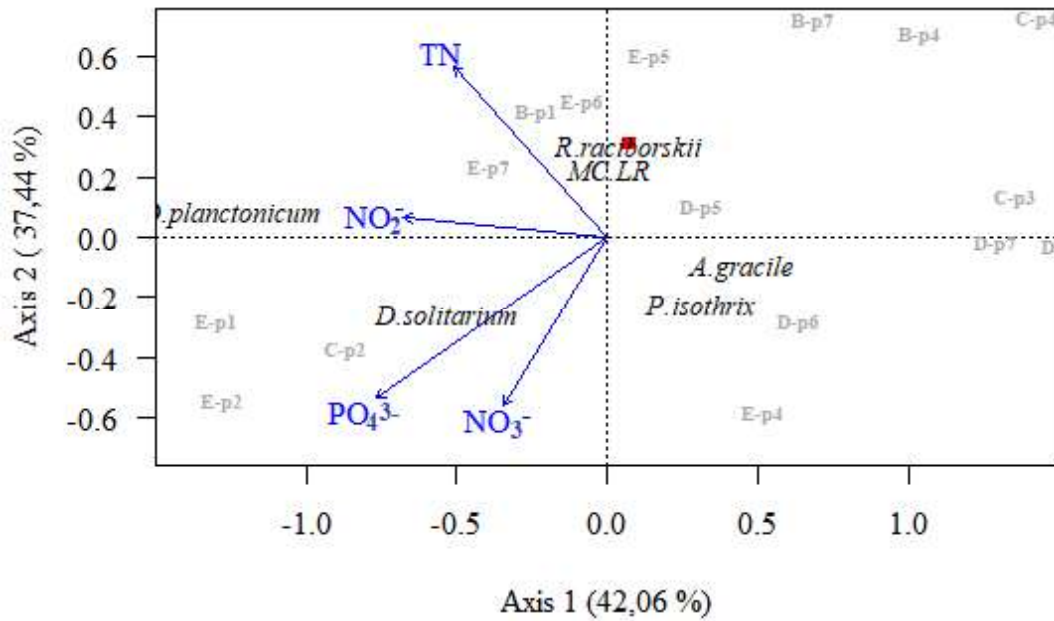


Fig. 5 CCA biplot with the following variables: total nitrogen (TN), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), orthophosphate (PO₄³⁻), microcystin (MC-LR), saxitoxin (STX, represented by the symbol “■” in red), and abundant cyanobacteria biomasses.

Only *R. raciborskii* was positively correlated with STX and MC-LR, ordered in the quadrant opposite the NO₃⁻ gradient. Among the species analyzed, no other organism showed a positive correlation with the occurrence of cyanotoxins. Linear

regression analysis applied to the *R. raciborskii* biomass and STX values ($R^2 = 0.21$; $p < 0.05$) confirmed that the presence of STX in the reservoir depended on the biomass of this species (Fig. 6a). In addition, there was a statistically significant inverse linear relation between NO_3^- and *R. raciborskii* biomass ($R^2 = 0.41$; $p < 0.05$) (Fig. 6b). A negative correlation between STX and NO_3^- was observed in the Pearson correlation analysis ($r = -0.46$) (Table 2) and the CCA (Fig. 5), confirming that NO_3^- directly affected the occurrence of *R. raciborskii* and, consequently, the presence of STX in the reservoir (Tables 2 and 3).

	TN	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	TP	PO ₄ ³⁻	Chl- <i>a</i>	Zeuf	Depth	T	pH	EC	TURB	Eh
<i>A. gracile</i>	-0.22	-0.43	0.02	-0.07	-0.27	-0.25	0.15	-0.23	0.02	-0.33	0.42	-0.12	0.18	-0.48
<i>R. raciborskii</i>	0.00	-0.40	-0.64	0.23	0.01	-0.55	-0.29	0.37	0.47	0.29	-0.28	-0.58	-0.09	0.01
<i>D. planctonicum</i>	0.23	0.22	0.07	-0.04	0.16	0.42	0.05	-0.17	-0.25	-0.01	0.27	0.27	-0.05	-0.04
<i>D. solitarium</i>	0.15	0.21	0.39	-0.21	0.07	0.48	0.50	-0.24	-0.18	-0.20	0.32	0.53	0.27	-0.27
<i>P. aeruginosa-cae.</i>	-0.42	-0.05	0.23	0.16	-0.05	0.24	-0.18	0.16	0.21	-0.44	-0.05	-0.19	-0.23	-0.07
<i>P. isothrix</i>	-0.09	-0.44	-0.14	-0.27	-0.24	0.01	0.10	-0.05	-0.07	-0.01	0.26	-0.06	0.14	-0.35
STX	0.20	-0.42	-0.46	0.20	-0.27	-0.34	-0.10	0.18	0.49	0.37	-0.35	-0.24	0.08	0.09
MC-LR	-0.19	0.05	-0.10	-0.14	0.02	-0.05	-0.16	0.03	-0.11	0.17	0.26	0.11	0.11	-0.18

Table 2 Pearson correlations between the physical, chemical, and biological variables: total nitrogen (TN), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), ammonium (NH₄⁺), total phosphorus (TP), orthophosphate (PO₄³⁻), chlorophyll-*a* (Chl-*a*), euphotic zone (Zeuf), depth (Depth), temperature (T), pH, electrical conductivity (EC), turbidity (TURB), redox potential (Eh), abundant cyanobacteria biomass (*A. gracile*, *R. raciborskii*, *D. planctonicum*, *D. solitarium*, *P. aeruginosa-caeruleum*, *P. isothrix*), saxitoxin (STX), and microcystin (MC-LR).

	Df	ChiSquare	F	Pr(>F)
TN	1	0.12	4.54	0.00
NO ₂ ⁻	1	0.09	3.32	0.01
NO ₃ ⁻	1	0.10	3.51	0.01
Euf.Zon	1	0.06	2.11	0.05
PO ₄ ³⁻	1	0.10	3.75	0.01
Chl- <i>a</i>	1	0.05	1.66	0.17
Depth	1	0.06	2.09	0.05
T	1	0.05	1.89	0.10
pH	1	0.02	0.61	0.68
EC	1	0.01	0.52	0.74
Eh	1	0.00	0.14	0.98
Residual	23	0.62834		

Table 3 Results of ANOVA between the CCA scores, using the variables preselected by Pearson correlation. Values in bold type indicate variables that had a significant influence on the model.

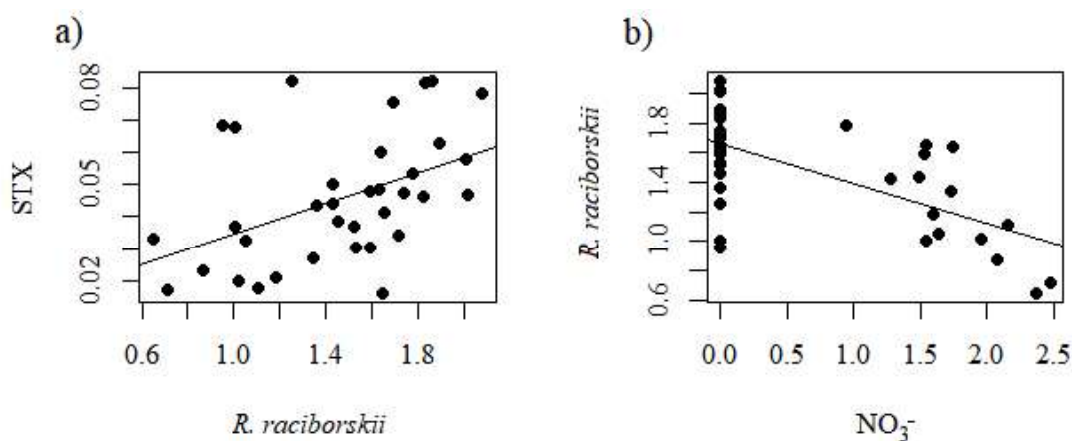


Fig. 6 Simple linear regression between (a) *R. raciborskii* and STX ($R^2 = 0.21$; $p < 0.05$), and (b) NO₃⁻ and *R. raciborskii* ($R^2 = 0.41$; $p < 0.05$).

In the case of MC-LR, despite transforming the values using log10, the normality test (W) indicated that the normality criterion was not met. Hence, Spearman's non-parametric analysis showed that the MC-LR had no significant correlation with *R. raciborskii* (-0.11) and the environmental variables (Table 4).

	TN	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	<i>R. raciborskii</i>	STX
MC-LR	-0.17	0.03	-0.06	0.10	-0.11	-0.10

Table 4 Results of Spearman's correlation analysis between the environmental variables used in the adjusted model of CCA, *R. raciborskii* and STX.

4 DISCUSSION

The observed predominance of cyanobacteria in the Itupararanga reservoir was in agreement with previous findings (Cunha & Calijuri 2011b; Casali et al. 2017; Vargas et al. (2020); Moraes et al., 2021), where the presence of *R. raciborskii* was identified in the reservoir, its main tributaries, and areas close to the dam. However, Casali et al. (2017) identified an opposite pattern in the dominance of *R. raciborskii* with respect to the climate, with high biomass values in the dry period ($>1.0 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$) and lower values in the rainy season ($\sim 5.0 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$). Other studies have also reported the abundance of *R. raciborskii* in Brazilian reservoirs in the dry and rainy seasons, in addition to species of the genera *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* (Figueredo & Giani 2009; Moschini-Carlos et al. 2009; Sant'Anna et al. 2011; Bittencourt-Oliveira et al. 2014; Fonseca et al. 2014; Nishimura et al. 2014; Machado et al. 2016; Santos et al. 2018; Vicentin et al. 2018; Rodrigues et al. 2019). In addition to the dominance of *R. raciborskii* reported in many regions of Brazil, evidence of the predominance of this cyanobacteria in different regions of the world has been common in recent decades (Paerl & Paul 2012; Sukenik et al. (2012); Antunes et al. 2015; Huisman et al. 2018; Rzymiski et al. 2018).

The variation of the average cyanobacteria biomass among the samples revealed the influence of climatic conditions on these organisms. According to Melo et al. (2019), thermal stratification from point P4 to P7 was observed in October 2017, together with a substantial difference in levels of dissolved oxygen (DO) between the surface (7 mg L^{-1}) and the bottom (3 mg L^{-1}). In the same period, a decrease of the cyanobacteria biomass was observed at the sampling points where there was thermal stratification. According to Visser et al. (2016), thermal stratification tends to favor floating cyanobacteria, due to the weak mixing, allowing better access to light. In the present study, although the cyanobacteria biomass decreased at points where thermal stratification occurred, *R. raciborskii* and other species that also have aerotopes (*D. solitarium*, *P. isothrix*, and *A. gracile*) were abundant. Furthermore, changes related to the availability of light, due to reduced water transparency, can have a significant influence on regulation of the dominance of cyanobacteria genera throughout the year (Vanderley et al. 2021).

The levels of STX and MC-LR identified were within the limits recommended by Brazilian legislation (Brazil, 2021) and the World Health Organization, of $3 \mu\text{g L}^{-1}$ for STX and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for MC (Chorus & Bartram 1999; Chorus & Welker 2021). Casali et al. (2017) investigated the presence of STX as a function of the density of *R. raciborskii* in the Itupararanga reservoir, obtaining values between 0.04 and $0.20 \mu\text{g L}^{-1}$, which were close to

those observed here, as well as strong correlation ($r = 0.73$, $p < 0.001$) between the biomass and STX values. In the present study, although significant linear correlation was observed between *R. raciborskii* biomass and STX, the effect was classified as moderate ($R^2 = 0.21$; $p < 0.05$). This finding confirms the complexity of interpretation of the mechanisms involved in the biosynthesis of STX by *R. raciborskii*, since growth profiles and STX production/inhibition can also be specific responses to some ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Na^+) (Burford et al. 2016). However, the ionic composition of the water was not evaluated in the present study.

The moderate linear relationship between the STX and biomass values could have been related to restrictive environmental conditions, which inhibited increase of the cyanobacteria volume and stimulated the production of cyanotoxins (Yamamoto et al. 2011; Lopes et al. 2012; Sarkar et al. 2020; Moraes et al., 2021). For example, the phosphorus deficiency in the environment could have influenced the production of STX. Melo et al. (2019) observed a continuous decrease in the trophic status index towards the dam, influenced by phosphorus deficiency, classifying this region as meso-oligotrophic. Vargas et al. (2020) tested different strains of *R. raciborskii* from the Itupararanga reservoir, finding that the production of STX by this species increased in an oligotrophic environment. These previous results corroborated the present findings, since higher levels of STX were observed in the region close to the Itupararanga reservoir dam (points P6 and P7). Furthermore, Burford et al. (2016) reported that the main factors affecting the production of STX are temperature, light/dark cycles, light intensity and quality, conductivity, and water hardness.

Shi et al. (2017) reported that high air temperature and high levels of phosphorus can favor blooms, indicating that regions with hot climates are favorable for their occurrence. Although some phylogenetic studies relate the origin of *R. raciborskii* to tropical regions, its current distribution also includes temperate regions, due to climate change (Piccini et al. 2011; Paerl & Paul 2012; O'Neil et al. 2012; Antunes et al. 2015; Rzymiski et al. 2018; Huisman et al. 2018; Pham et al. 2020; Vanderley et al. 2021). Melo et al. (2019) identified high concentrations of TN ($484.66 \pm 215.16 \mu\text{g L}^{-1}$) in the Itupararanga reservoir during the same period as this study, reporting that the primary productivity of the reservoir was limited by phosphorus. The limitation by phosphorus in this reservoir has been reported in the last five years, prior to which there was co-limitation by phosphorus and nitrogen (Cunha & Calijuri 2011a, 2011b; Taniwaki et al. 2013; Beghelli et al. 2016; Casali et al. 2017; Melo et al. 2019).

The inverse correlation between NO_3^- and the occurrence of *R. raciborskii* and STX may have been related to the energy expenditure required for these organisms to fix inorganic forms of nitrogen. In the case of diazotrophic cyanobacteria, such as *R. raciborskii*, this occurs in environments limited by phosphorus (Kenesi et al. 2009). According to Brentano et al. (2016), STX biosynthesis is regulated by stress situations related to the depletion of inorganic nitrogen in the environment, restricting biomass increase. The release of STX then has the function of contributing to homeostasis of the organism, regulating cell permeability (Brentano et al. 2016; Brêda-Alves et al. 2020; Sarkar et al. 2020; Moraes et al., 2021).

In the case of MC-LR, which was only detected at low concentrations, the maximum levels occurred in December 2016 and December 2017, considered rainy periods (Melo et al., 2019). At the same time, during these periods there was no abundance of species belonging to the genus *Microcystis*, but there was abundance of *P. isothrix*, *Dolichospermum* spp., and *P. aerugineo-caeruleum*. It is likely that the presence of MC in these periods was related to the occurrence of these organisms, since they are also potential producers of microcystins (Huisman et al. 2018).

In a study undertaken at the Billings complex reservoir and the Guarapiranga system in the metropolitan region of São Paulo, Moschini-Carlos et al. (2009) found moderate MC-LR concentrations of $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$ in the rainy season and $0.57 \mu\text{g L}^{-1}$ in the dry season, with *P. agardhii* and *Microcystis* spp. being dominant. Bittencourt-Oliveira et al. (2014) found this toxin in 100% of the reservoirs studied in the Northeast region of Brazil, with high levels of MC ascribed to high biomasses of cyanobacteria such as *P. agardhii*, *P. isothrix*, and *Microcystis* spp..

In the present study, the occurrence of MC did not correlate with any of the environmental variables, as observed by Moraes et al. (2021). Furthermore, MC was detected at exceptionally low concentrations, compared to STX. In part, this difference may be related to the different analysis methods used. However, its presence at low concentrations in an environment dominated by *R. raciborskii*, with STX, may be an indication that competition for nutrients influences cyanotoxin biosynthesis (Mello et al. 2012). Furthermore, water transparency and temperature can be decisive in the alternation of dominance between *R. raciborskii* and *Microcystis*, consequently influencing the levels of STX and MC (Vanderley et al. 2021).

5 CONCLUSIONS

The high contribution of Cyanophyceae in the Itupararanga reservoir was mainly due to the abundance of *R. raciborskii*. This species was the only one that had constant occurrence, being found in all the samples. The presence of STX was moderately influenced by *R. raciborskii* biomass, according to the classification parameters adopted. In this reservoir, a set of specific environmental conditions determined the variations of *R. raciborskii* biomass and STX. The facilitating environmental conditions included low availability of NO_3^- and phosphorus limitation. The trophic state could have been an additional factor, since the STX levels followed an increasing trend in the region close to the dam, characterized as meso-oligotrophic. However, *R. raciborskii* was sensitive to thermal stratification, at the same time that STX levels increased. Hence, it appeared that STX was produced under conditions restrictive for the growth of *R. raciborskii*. These are important findings, since they provide information about the permanent occurrence of STX and *R. raciborskii* in an aquatic ecosystem with decrease of the trophic status index (upstream $\rightarrow$ downstream). Potentially toxic cyanobacteria had permanent abundance in the reservoir, with the alternation among them, due to changes in environmental conditions, implying the constant occurrence of cyanotoxins.

CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE CRÔNICA DA SAXITOXINA (STX) EM LARVAS DE *Chironomus sancticarolli* - (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

1 INTRODUÇÃO

A problemática relativa à ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas, em ambientes lacustres e reservatórios de abastecimento, afeta diversas regiões do mundo em decorrência de processo de eutrofização artificial e é agravada pelas mudanças climáticas (O'NEIL et al. 2012, PAERL & PAUL 2012, ANTUNES et al. 2015, MOWE et al. 2015, HUISMAN et al. 2018). No Brasil os relatos da dominância de cianobactérias da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju em ambientes eutrofizados é frequente (FIGUEREDO & GIANI 2009, MOSCHINI-CARLOS et al. 2009, CUNHA & CALIJURI 2011, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2014, FONSECA et al. 2014, NISHIMURA et al. 2014, MACHADO et al. 2016, CASALI et al. 2017; SANTOS et al. 2018, VICENTIN et al. 2018, RODRIGUES et al. 2019, MACHADO et al. 2021). Paralelamente, a presença de saxitoxina e cylindrospermopsina está associada à ocorrência de cepas tóxicas de *R. raciborskii*, sendo frequentemente encontradas nestes ambientes (MOLICA et al. 2002, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2014, CASALI et al. 2017, PEDROSA et al. 2020).

Neste sentido, os organismos aquáticos estão diretamente expostos à toxicidade destes metabólitos seja na coluna d'água ou no sedimento, afetando diversas espécies da cadeia trófica destes ecossistemas (TOPOWOSKA et al. 2014, ESTERHUIZEN-LONDT e PFLUGMACHER 2016, PAWLIK-SKOWROŃSKA et al. 2019). Desta forma, o grupo dos insetos bentônicos representado pelo quironomídeos tem um papel importante como indicadores ambientais, devido à sua ocorrência mesmo em ambientes poluídos, além de terem um papel importante na cadeia alimentar (TOPOWOSKA et al. 2014). Apesar da maior parte do seu ciclo de vida ocorrer no sedimento em ecossistemas lacustres, os quironomídeos também podem estar expostos aos efeitos das florações de cianobactérias potencialmente tóxicas e cianotoxinas dissolvidas, as quais podem ligar-se ao sedimento acumulando-se nas camadas superficiais (KINNEAR et al. 2010, TOPOWOSKA et al. 2014). Além disso, Ali et al. (2002) relataram que as cianobactérias filamentosas são uma fonte essencial de alimento para larvas de insetos bentônicos, em seu estudo, a abundância de larvas de *Chironomus* spp foi proporcional ao aumento da abundância de

cianobactérias. Esta dinâmica pode ser potencializada em ambientes eutróficos (TOPOWOSKA et al. 2014; XUE et al. 2016).

No reservatório de Itupararanga, uma piora significativa da qualidade da água tem sido relatada sendo classificado como supereutrófico, a causa principal está relacionada ao aporte de efluentes domésticos (CUNHA & CALIJURI 2011a, TANIWAKI et al., 2013, BEGHELLI et al. 2016, MELO et al. 2019). Paralelamente, uma elevada representatividade da cianobactéria *R. raciborskii* tem sido observada no reservatório, bem como, a presença de saxitoxina (CUNHA & CALIJURI 2011, CASALI et al. 2017, MACHADO et al., 2021).

A saxitoxina é um alcalóide neurotóxico que leva ao bloqueio dos canais de sódio, bloqueando a geração de potenciais de ação nos neurônios, podendo causar parestesia, dormência, paralisia e insuficiência respiratória (PEARSON et al 2010, DITTMANN et al. 2012, O'NEILL et al. 2017, PEDROSA et al. 2020). O'Neill et al. (2017) relatam que a exposição prolongada a baixos teores de saxitoxina pode induzir o crescimento inadequado de neurites, tornando-a em um potencial problema de saúde pública. Além disso, recentemente Pedrosa et al. (2020) relataram que a saxitoxina pode ter atuado com efeito sinérgico à infecção pelo ZIKA Vírus no Brasil. Assim, observa-se a relevância do estudo dos efeitos deste metabólito em organismos aquáticos, com intuito de estimar os danos nos organismos e ao ecossistema, consequentemente, fornecendo subsídios para possíveis ações de revisão dos parâmetros relativos ao monitoramento de saxitoxina em reservatórios de abastecimento público. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito crônico da saxitoxina (intracelular e isolada) em larvas de *Chironomus sancticarolli* expostas à concentrações ambientais desta cianotoxina quantificadas no reservatório de Itupararanga. A hipótese do estudo foi: ainda que as concentrações de saxitoxina estejam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação, a exposição crônica à baixos teores de saxitoxina é capaz de causar danos aos organismos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Os organismos teste foram expostos à duas categorias de contaminantes contendo saxitoxina (STX): saxitoxina intracelular (obtida por meio do extrato celular de *R. raciborskii*) e solução de saxitoxina isolada (obtida por meio de padrão analítico de

saxitoxina). A utilização da solução com o padrão analítico foi adotada, com o intuito de validar possíveis efeitos da saxitoxina nos organismos, cruzando os resultados obtidos entre os tratamentos a base de saxitoxina isolada e a base de saxitoxina intracelular. Desta forma, minimizou-se a possibilidade de interferência de outros metabólitos secundários, que podem estar presentes nos extratos celulares de *R. raciborskii*, na resposta dos organismos teste.

2.2 Biomassa de *Raphidiopsis raciborskii*

A cepa utilizada neste estudo foi obtida na coleção de culturas de microalgas de água doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar). Para obtenção da biomassa, a cepa de *R. raciborskii* (CCMA-UFSCar BB048) foi cultivada em frascos Boeco de 2L com borbulhamento de ar e intensidade luminosa de 150-175 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação PAR, oriunda de lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. As culturas foram retiradas ao final da fase de crescimento exponencial que variou entre 7 e 8 dias de cultivo.

O preparo do extrato celular (STX-Ex) consistiu em três etapas: extração, filtração e quantificação. Primeiramente, para extração da saxitoxina intracelular, a biomassa concentrada foi submetida ao rompimento celular realizado pelo processo de gelo/degelo por 3 vezes. Após esta etapa, o extrato concentrado foi homogeneizado e 1 mL foi retirado e transferido para balões volumétricos (50, 100 e 200 mL) e avolumados com água MiliQ para preparo das soluções nas proporções 1:50, 1:100, 1:200 (Figura 11). Após homogeneizadas, cada uma das soluções foi filtrada utilizando filtro de fibra de vidro com malha de $0,47 \mu\text{m}$ de diâmetro (Whatman GFC) acoplado em sistema à vácuo. Na sequência, as concentrações de saxitoxina foram quantificadas por meio do Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Para tal procedimento, foram utilizados “Kits” Beacon Saxitoxina – Placa, seguindo recomendações do fabricante. A faixa de detecção do teste é de 0,02 a 0,3 partes por bilhão (ppb), foram utilizados os controles positivos e negativos do próprio kit. As análises foram feitas em triplicatas. Após a quantificação, as soluções foram mantidas sob refrigeração (-4°C) até o momento do bioensaio. Todas as etapas do preparo do extrato, soluções e quantificação de saxitoxina foram realizadas um dia antes do início dos bioensaios.

Figura 11 – Preparo das soluções de saxitoxina a partir do extrato celular de *R. raciborskii*.



Fonte: acervo pessoal

A solução contendo saxitoxina isolada (STX-PA), foi obtida por meio da diluição do padrão analítico (Abraxis) em água MiliQ, na sequência, a concentração desta solução também foi quantificada por meio do método ELISA, conforme descrito para o extrato celular. A solução foi mantida sob refrigeração até o momento do bioensaio. A concentração de STX-Ex e STX-PA utilizada no bioensaio foi de $0,55 \mu\text{g L}^{-1}$, que dentre os testes preliminares realizados, foi a concentração mais próxima das condições ambientais encontradas no reservatório de Itupararanga, que se foi possível reproduzir em laboratório. Além disso, segundo a legislação vigente esta concentração está em conformidade com os teores aceitáveis de STX (até $3 \mu\text{g L}^{-1}$) preconizados pela legislação brasileira (BRASIL 2004) e Organização Mundial da Saúde (CHORUS & BARTRAM, 1999).

2.3 Organismos teste

Larvas de *Chironomus sancticarolli* foram obtidas de uma cultura mantida no Laboratório de Limnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Sorocaba – SP. Esta cultura e os bioensaios foram acondicionados em estufa incubadora, seguindo o protocolo de Maier et al. (1990) e da OECD (2004a; 2004b) com modificações na temperatura, fotoperíodo e umidade relativa ($25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 h e $80 \pm 10\%$, respectivamente).

2.4 Condições do sedimento e da água para os bioensaios

A preparação do sedimento artificial seguiu o protocolo da OECD (2004a; 2004b; 2010), sendo a areia calcinada conforme descrito por Araújo et al. (2006). Foi utilizada água mineral sem cloro (composição química: cálcio $15,04 \text{ mg L}^{-1}$, fluoreto $0,070 \text{ mg L}^{-1}$, bicarbonato $80,30 \text{ mg L}^{-1}$, magnésio $1,826 \text{ mg L}^{-1}$, potássio $1,476 \text{ mg L}^{-1}$, sódio

5,468 mg L⁻¹, bicarbonato 80,300 mg L⁻¹, sulfato 2,780 mg L⁻¹, fosfato 0,800 mg L⁻¹ e cloreto 0,060 mg L⁻¹) (OECD, 2004a; OECD, 2004b; OECD, 2010; López-Doval et al., 2012) e sua dureza foi determinada por titulação com EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético). No início e fim de cada bioensaio, realizou-se medidas de pH, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura da água (Tabela 1) (OECD, 2004a; OECD, 2004b; Dornfeld et al., 2006).

2.5 Bioensaio crônico

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro de 250 mL contendo: 40 g (peso úmido) de sedimento artificial, 160 mL de água mineral sem cloro, 5 mg de ração Tetra Min® (macerada) adicionada no início e após cada 48 horas (OECD 2004a; OECD 2004b; OECD 2010) e aeração constante (Richardi et al., 2015; Vicentini et al. 2017) (Figura 12). Utilizou-se 4 réplicas por tratamento, cada uma com 20 larvas (n=80) (OECD 2004a; OECD 2004b), para o bioensaio de toxicidade crônica foram utilizadas larvas do 1º ínstar. No grupo controle foi utilizada apenas água mineral. A STX (extrato e padrão analítico) foi inoculada a cada 48 horas, para que os teores permanecessem constantes. O bioensaio crônico teve duração de 10 dias.

Figura 12 –Bioensaio do teste crônico (10 d) no primeiro dia.



Fonte: acervo pessoal

Ao final do teste, foram consideradas larvas vivas as que apresentavam mobilidade normal ou baixa mobilidade. Foi retirada uma alíquota no primeiro e no último dia no teste, para quantificação da concentração inicial e final da saxitoxina por meio do método ELISA.

2.6 Biomarcadores

Além da taxa de mortalidade calculada para o bioensaio, também foi avaliado o efeito da saxitoxina no crescimento, cujo biomarcador foi a medida do comprimento do corpo (distância entre a extremidade da cápsula cefálica à extremidade dos túbulos anais). Foram separadas 30 larvas de cada tratamento para análise deste biomarcador. Para isso, as larvas ainda vivas foram colocadas em placas de Petri com água destilada, levadas ao freezer por dois minutos, com o intuito de reduzir a mobilidade e possibilitar que as larvas fossem esticadas sobre o papel milimetrado e então, fotografadas (Figura 13). Após esta etapa, as larvas foram distribuídas em tubos do tipo Eppendorf e armazenadas em álcool 70 %.

Figura 13 - Larvas sobre papel milimetrado após terem permanecido no freezer por dois minutos ao término do teste crônico, à direita execução do procedimento de captura e transferência das larvas vivas no final do teste crônico para contagem e tomada de medidas de comprimento.



Fonte: acervo pessoal

2.7 Análises estatísticas

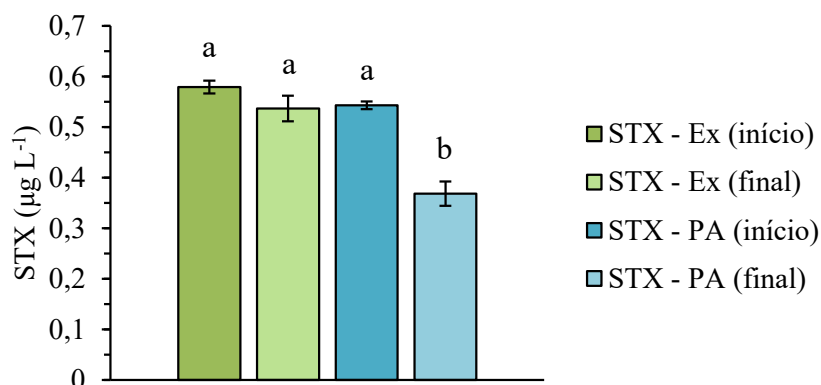
Com o objetivo de avaliar o efeito da exposição crônica de saxitoxina na mortalidade e no comprimento das larvas de *Chironomus sancticarolli*, foram realizados os testes, *a priori*, de homogeneidade (Bartlett test) e normalidade (Shapiro-Wilk test) para os dados de mortalidade e medidas de comprimento. Na sequência, foi efetuada uma ANOVA ($p < 0,05$) utilizando os dados coletados para cada biomarcador, *a posteriori*, foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para verificar quais os tratamentos tiveram efeito estatisticamente significativo. A estabilidade da saxitoxina (STX-Ex e STX-PA) ao longo do bioensaio também foi avaliada por meio dos testes estatísticos supramencionados.

Todas as análises foram elaboradas por meio do pacote nativo do Software livre RStudio® 3.4.0.

3 RESULTADOS

A estabilidade da concentração de STX do extrato celular (STX - Ex) e isolada (STX - PA) foi avaliada no primeiro e no último dia do teste, no sistema de exposição sedimento-água em laboratório com controle dos parâmetros físico-químicos, reproduzindo as condições ambientais. Foi observada variação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da concentração de STX no bioensaio apenas no tratamento STX-PA (final), indicando uma elevada taxa de degradação do padrão analítico. Já a concentração de STX na água durante o experimento, no tratamento STX - Ex não variou significativamente entre o início e final do experimento, bem como do tratamento STX - PA inicial (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação da estabilidade da saxitoxina (STX) a base do extrato celular (STX - Ex) e isolada (STX - PA) no início e no final do teste crônico. Valores médios e desvio padrão. Resultados da análise estatística: letras “a” e “b” representam a variação significativa dos tratamentos, com base nos resultados do teste Tukey.



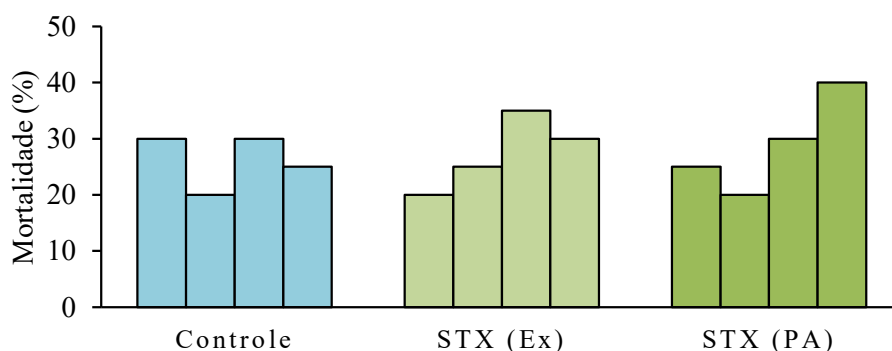
A variação dos parâmetros físico-químicos estiveram de acordo com as condições estabelecidas pela OCDE (2004a, 2004b) (Tabela 3), garantindo que em condições de laboratório, os efeitos observados nas larvas de *Chironomus sancticaroli* não foram associados a estas variáveis.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da água no teste crônico: pH (potencial hidrogeniônico); Cond. (condutividade); OD (Oxigênio dissolvido).

Tratamento	pH		Cond. 20 ms		OD mg/L	
	início	final	início	final	início	final
Controle	6,73 ± 0,19	8,13 ± 0,10	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,03	6,26 ± 0,04	6,53 ± 0,37
STX-Ex	6,70 ± 0,14	8,08 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,26 ± 0,04	6,05 ± 0,19	6,45 ± 0,27
STX-PA	6,68 ± 0,05	7,83 ± 0,05	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,01	5,95 ± 0,36	6,30 ± 0,18

A taxa média de mortalidade para o controle foi satisfatória (26,25%, n= 21) e não excedeu o valor máximo (30%) preconizado pela OECD (2004 a, b). O índice de mortalidade das larvas expostas à STX do extrato celular (Ex) foi 27,5% (n= 22), já para a saxitoxina isolada (PA) o índice de mortalidade foi maior (28,75%, n= 23) (Figura 15). Por meio do teste ANOVA não foi observada variação estatisticamente significativa ($p < 0,8743$) da mortalidade entre os tratamentos e o controle.

Figura 15 – Percentual de mortalidade das larvas de *Chironomus sancticarolli* no controle, expostas à saxitoxina (STX) no extrato celular (Ex) e isolada (PA).

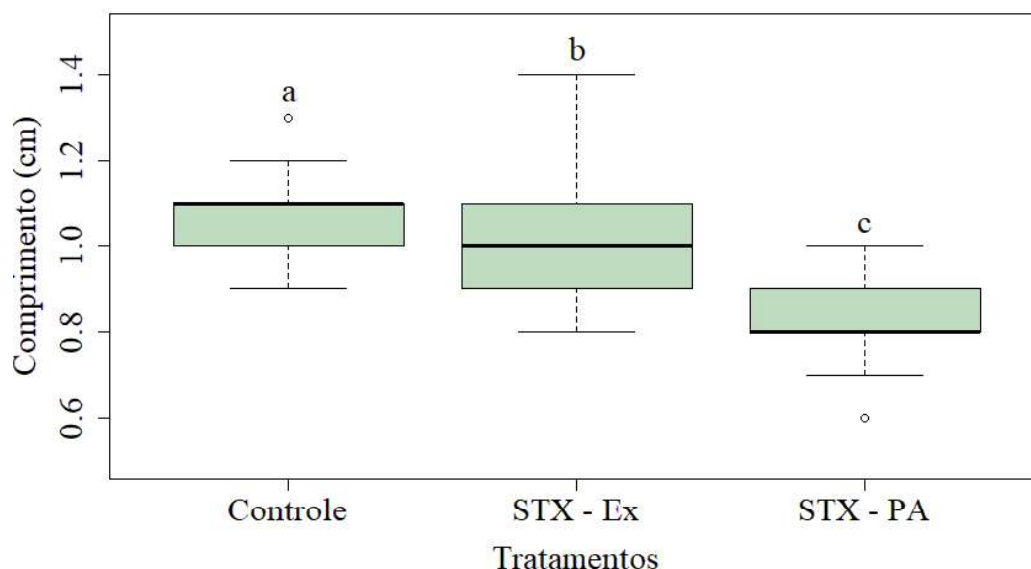


O comprimento médio das larvas de *Chironomus sancticarolli* foi de 1 cm no tratamento STX-Ex e de 0,84 cm no tratamento STX – PA, enquanto que no controle o tamanho médio foi de 1,07 cm (Tabela 4). A análise ANOVA indicou que os tratamentos com STX (Ex e PA) afetaram significativamente ($p < 0,001$) o desenvolvimento das larvas no bioensaio (Figura 16).

Tabela 4 - Percentual do tamanho das larvas (medida da cápsula cefálica à extremidade dos túbulos anais). Valores mínimo (Mín.), máximo (Máx.), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Tratamentos	Instar	Mín.	Máx.	Média	DP	CV
Controle	IV	0,90	1,30	1,07	0,11	10,06
STX - Extrato	IV	0,80	1,40	1,00	0,13	12,55
STX - Padrão analítico	IV	0,60	1,00	0,84	0,10	12,41

Figura 16 - Tamanho das larvas (medida da cápsula cefálica à extremidade dos túbulos anais). Estatística descritiva e resultados da ANOVA e Tukey: letras “a”, “b” e “c” representam a variação significativa dos tratamentos, com base nos resultados do teste Tukey.



4 DISCUSSÃO

As saxitoxinas solubilizadas na água podem ser rapidamente fotodegradadas e/ou acumular-se nos organismos aquáticos (Chorus and Bartram 1999; Chorus and Welker 2021). A degradação das cianotoxinas pode ser acelerada pela atividade microbiana e radicais oxidativos que são influenciados pela fotodegradação e irradiação solar (Chorus and Bartram 1999; Kibuye et al., 2021; Chorus and Welker 2021). Em condições controladas como no presente estudo, era esperado que as concentrações de STX se mantivessem constantes com a reinoculação a cada 48h, porém, tal comportamento foi observado apenas para a saxitoxina do extrato celular (ETX-Ex). A diminuição dos teores da saxitoxina isolada (STX-PA) observada no final do experimento, pode estar relacionada à uma maior suscetibilidade à fotodegradação da STX nesse formato. Além disso, a STX possui elevada afinidade com as proteínas celulares, ligando-se rapidamente aos tecidos das larvas, levando à redução nos teores da saxitoxina dissolvida (Miles et al., 2016; Piel et al., 2019). Assim, o declínio nas concentrações de toxinas pode ser atribuído à ligação da saxitoxina à proteínas celulares, sob condições de luminosidade e estresse oxidativo (Miles et al., 2016; Zilliges et al., 2011).

A elevada taxa de acumulação da saxitoxina isolada (STX-PA) pode ter levado à maior letalidade observada no bioensaio, para este tratamento se comparados ao tratamento com a saxitoxina do extrato celular (STX-Ex). Dessa forma, é provável que os

organismos tenham uma tolerância maior à saxitoxina proveniente do extrato celular, já que o efeito letal foi relativamente menor, se comparado ao tratamento com STX-PA. Paralelamente, os teores de STX-Ex mantiveram-se relativamente estáveis no início e final do experimento, indicando que a acumulação nos tecidos das larvas provavelmente ocorreu de maneira lenta. Toporowska et al. (2014) e Xue et al. (2016) observaram efeito semelhante ao avaliarem os efeitos da microcistina (MC-LR) em larvas de quironomídeos, o qual é atribuído à elevada capacidade de acumulação que estes organismos possuem. Entretanto, Toporowska et al. (2014) comentam que apesar de a MC-LR proveniente do extrato celular não ter efeito letal significativo, foram observadas altas teores de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo nas larvas, em comparação com os tratamentos com a toxina isolada. Sugerindo que altas concentrações de cianotoxina podem ter elevado efeito letal em decorrência do alto estresse oxidativo ao qual as larvas estariam expostas. Neste sentido, um dos fatores que potencializam a letalidade é a extrema acumulação de saxitoxina nos tecidos dos organismos teste (Toporowska et al. 2014; Xue et al. 2016).

Em condições ambientais, a acumulação de cianotoxinas nos tecidos das larvas de *Chironomus* spp representa uma alta probabilidade de haver transferência de toxicidade ao longo da cadeia trófica, afetando negativamente o ecossistema, configurando um potencial problema de saúde pública (Toporowska et al. 2014; Xue et al. 2016; Ferrão-Filho e Silva, 2020). Xue et al. (2016) relataram que a ingestão de cianobactérias foi responsável pela maior parte da microcistina que se acumulou em uma espécie de quironomídeo comum em lagos eutrofizados na China. Topowoska et al. (2014) analisaram a acumulação de microcistina e anatoxina em larvas de *Chironomus* spp de um lago eutrofizado na Polônia, segundo os autores, estes invertebrados podem ser um vetor importante de cianotoxinas para organismos pertencentes à níveis mais altos na cadeia alimentar. Kolmakov & Gladyshev (2003) ao realizarem experimentos com peixes expostos à extratos de cianobactérias produtoras de microcistinas e anatoxinas (*Dolichospermum flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*), observaram que ocorreu digestão completa e total assimilação das cianotoxinas. Além disso, as cianobactérias filamentosas são uma fonte essencial de alimento para larvas de insetos bentônicos (Ali et al., 2002).

A diferença significativa no comprimento das larvas, observada entre os tratamentos, revelou que a exposição crônica destes organismos à concentração de $0,55 \mu\text{g L}^{-1}$ de STX afetou o desenvolvimento dos mesmos. Sabe-se que as STXs inibem a condução nervosa bloqueando os canais de sódio (Na^+) e cálcio (Ca_2^+), afetando também a

permeabilidade ao potássio (Ferrão-Filho e Silva, 2020; Chorus and Welker 2021). Dessa forma, a STX afeta principalmente a mobilidade das larvas limitando sua capacidade de alimentação, já que este processo depende da locomoção pelo sedimento (Albuquerque et al. 2021), o que acaba comprometendo todo seu desenvolvimento. Ferrão-Filho e Silva (2020) observaram efeito semelhante ao avaliaram o efeito da STX em *Daphnia* usando concentrações ambientais de células vivas de cianobactérias em um sistema de fluxo contínuo. Os autores concluíram que as cianobactérias neurotóxicas podem impor severas restrições à fisiologia dos dafniídeos, o que pode ter consequências para o consumo de oxigênio, comportamento de natação e alimentação e para a aptidão geral desses organismos. Bownik e Pawlik-Skowrońska (2019) testaram o efeito da anatoxina-a pura (ANTX-a) no comportamento e respostas fisiológicas (frequência cardíaca, consumo de oxigênio, atividade dos membros e movimento abdominal da garra) em *Daphnia magna* e descobriram que a velocidade de natação foi inibida logo após 10 s da exposição de ANTX.

Apesar dos efeitos relatados anteriormente neste capítulo, há relativamente pouca informação sobre o efeito de cianotoxinas em larvas de insetos bentônicos, como *Chironomus* spp., em ambientes eutrofizados (Armatge et al., 1995; Frouz et al., 2003; Chen & Xi, 2008; Toporowska et al. 2014; Xue et al. 2016). Como a maior parte do ciclo de vida dos quironomídeos ocorre no sedimento, estes organismos também estão expostos aos efeitos das florações de cianobactérias potencialmente tóxicas, incluindo cianotoxinas dissolvidas ou ligadas às camadas superficiais do sedimento (KINNEAR et al. 2010, TOPOWOSKA et al. 2014). O teor de STX identificado previamente no reservatório de Itupararanga e analisado no presente estudo ($0,55 \mu\text{g L}^{-1}$) é considerado seguro pela legislação brasileira (até $3 \mu\text{g L}^{-1}$) e Organização Mundial da Saúde (CHORUS & BARTRAM, 1999; BRASIL 2004). Entretanto, nosso estudo mostrou que a exposição prolongada à baixos teores de STX pode causar danos aos organismos aquáticos, consequentemente podendo afetar outros níveis da cadeia trófica.

5 CONCLUSÃO

As saxitoxina (intracelular e isolada) afetou o desenvolvimento de larvas de *Chironomus sancticarolli* expostas à uma concentração próxima às concentrações ambientais do reservatório de Itupararanga, em condições laboratoriais controladas. A

exposição crônica à baixos teores de saxitoxina influenciou no tamanho das larvas, mas não causou efeito letal significativo. A hipótese inicial do estudo foi confirmada, ainda que as concentrações de saxitoxina testadas estejam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação, a exposição crônica à baixos teores de saxitoxina foi capaz de causar danos aos organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, A.; BERRENDERO, E.; KASTOVSKY, J.; ECHENIQUE, R.; SALERNO, G.L. (2018) The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia*, v. 57, n. 2, p. 130-146 <https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- ALBUQUERQUE FP, et al. 2021. Use of nontarget organism *Chironomus sancticaroli* to study the toxic effects of nanoatrazine. *Ecotoxicology*. May;30(4):733-750. doi: 10.1007/s10646-021-02400-x.
- ALI A., FROUZ J. & LOBINSKE R.J. Spatio-temporal effects of selected physico-chemical variables of water, algae and sediment chemistry on the larval community of nuisance Chironomidae (Diptera) in a natural and a man-made lake in central Florida. *Hydrobiologia* 470: 181–193. 2002
- ALVES-DE-SOUZA, C.; MENEZES, M. & HUSZAR, V.L.M. Phytoplankton composition and functional groups in a tropical humic coastal lagoon, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 20(3): 701-708. 2006.
- AMORIM, C.A.; DANTAS,E.W.; MOURA, A.N. (2020) Modeling cyanobacterial blooms in tropical reservoirs: The role of physicochemical variables and trophic interactions, *Science of The Total Environment*, Volume 744, 140659, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140659>.
- ANTUNES, J. T., LEÃO, P. N. & VASCONCELOS, V. M. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front. Microbiol.* 6, 473 . 2015.
- ARAUJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; ALMEIDA, C. A.; ROCHA, O. Testes com invertebrados para avaliar a toxicidade de contaminantes associados ao sedimento de ecossistemas de água doce. In: Mozeto, A. A., Umbuzeiro, G. A., Jardim, W. F. (Org.). Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce. São Carlos: Ed. Cubo Multimídia, p. 111–133, 2006.
- ARMITAGE P.D., CRANSTON P.S. & PINDER L.C.V. 1995: The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges. Chapman and Hall, London, 572 pp.
- BEGHELLI, F. G. S., FRASCARELI, D., POMPÊO, M. L. M., & MOSCHINI-CARLOS, V. Trophic state evolution over 15 years in a tropical reservoir with low nitrogen concentrations and cyanobacteria predominance. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(3), 95. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2795-1>. 2016
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A. N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 2014.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., CHIA, M.A., DE OLIVEIRA, H.S.B. et al. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing

cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. J Appl Phycol 27, 275–284. 2015

BOGAERTS, A., DE HAAN, M., VAN DE VIJVER, B. & COCQUYT, C. . A complete catalogue of algal taxa described by Pierre Compère. Plant Ecology and Evolution 147(3): 311-324. 2014.

BORICS, G., VARBÍRO, G., GRIGORSZKY, I., KRASZNAI, E., SZABO, S. & KISS, K. T.. A new evaluation technique of phytoplankton for the assessment of the ecological status of rivers. Large Rivers, 17. Archiv für Hydrobiologie Supplement 161: 465–486. 2007.

BOWNIK, A., PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., 2019. Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. Sci. Total Environ. 695, 133913.

BRASIL 2004. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo. Brasília (DF).

BRASIL (2021). Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017. Diário Oficial da União. Publicado em: 07/05/2021 | Edição: 85 | Seção: 1 | Página: 127. 2021

BRÊDA-ALVES, F., DE OLIVEIRA FERNANDES, V., CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. et al. The combined effect of clethodim (herbicide) and nitrogen variation on allelopathic interactions between *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*. Environ Sci Pollut Res 28, 11528–11539 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11367-x>

BRENTANO, D. M.; GIEHL, E.L.H.; PETRUCIO, M.M.. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). Harmful Algae. 56 22-28. 2016

BURFORD, M.A.; BEARDALL, J.; WILLIS, A.; ORR, P.T.; MAGALHAES, V.F.; RANGEL, L. M.; AZEVEDO, S. M.F.O.E.; NEILAN, B. A. (2016) Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, Harmful Algae, Volume 54, Pages 44-53, ISSN 1568-9883, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.012>.

BURFORD, M.A., MCNEALE, K.L. and MCKENZIE-SMITH, F.J. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. Freshwater Biology, 51: 2143-2153. 2006

CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A & JATI, S. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, S.P.—Brazil). Journal of Plankton Research 24(7): 617-634. 2002.

CARDOSO-SILVA, S. ; MARIANI, C. F. ; POMPEO, M. L. M. . Análise crítica da resolução CONAMA n 357 à luz da Diretiva Quadro da Água da comunidade europeia: estudo de caso (represa do Guarapiranga - São Paulo, Brasil). In: Marcelo Pompêo;

Viviane Moschini-Carlos; Paula Y. Nishimura; Sheila Cardoso-Silva; Júlio L. Doval. (Org.). Ecologia de reservatórios e interfaces. 1 ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, v. 1, p. 367-375. 2015.

CARMICHAEL, W. W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABs”. Hum. Ecol. Risk Assess. 7, 1393–1407 2001.

CASALI, S. P., SANTOS, A. C. A. D., FALCO, P. B. D., & CALIJURI, M. D. C. Influence of environmental variables on saxitoxin yields by *Cylindrospermopsis raciborskii* in a mesotrophic subtropical reservoir. Journal of Water and Health, 15(4), 509–518. 2017

CHEN J. & XIE P. 2008: Accumulation of hepatotoxic microcystins in freshwater mussels, aquatic insect larvae and Oligochaetes in a large, shallow eutrophic lake (Lake Chaohu) of subtropical China. — Fresen. Environ. Bull. 17: 849–854.

CHRISTENSEN, V. G., KHAN, E.. (2020) Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. Science of The Total Environment. Volume 736. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>

CHORUS, I. & J. BARTRAM.. Toxic cyanobacteria in water-a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, Spon Press, London. 1999

CHORUS, I, WELKER M; eds. 2021. Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH

COHEN, Jacob. , Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ, Erlbaum. 1988

COMPÈRE P. Algues de la région du lac Tchad ViI. Chlorophycophytes (3ème partie, Desmidiées). Cah. O. R. S. T. O. M. , sér. Hydrobiol. 11: 77-177. 1983.

COMPÈRE P.. Algues de la région du lac Tchad. VI : CHLOROPHYCOPHYTES (2e partie: ULOTRICHOPHYCEES, ZYGNEMATACEES). Cahiers ORSTOM.Série Hydrobiologie, 10 (3), 135-164. 1976.

COMPÈRE, P.. Algues de la région du lac Tchad. VII : CHLOROPHYCOPHYTES (3ème partie: DESMIDIEES). Cahiers ORSTOM.Série Hydrobiologie, 11 (2), 77-177. 1977.

COMPÈRE, P.. Algues Du Sahara et de la région du lac Tchad. Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique Hydrobiologie, 37: 109-288, 258 . 1967.

CUNHA, D. G. F., & CALIJURI, M. D. Limiting factors for phytoplankton growth in subtropical reservoirs: The effect of light and nutrient availability in different longitudinal compartments. Lake and Reservoir Management, 27(2), 162–172. 2011a.

CUNHA, D. G. F., & CALIJURI, M. D. C. Variação sazonal dos grupos funcionais fitoplancctônicos em braços de um reservatório tropical de usos múltiplos no estado de São Paulo (Brasil). Acta Botânica Brasílica, 25, 822–831. 2011b.

- CUNHA, D.G.F., CALIJURI, M.C. and LAMPARELLI, M.C. A trophic state index for tropical/subtropical reservoirs (TSI_{tr}). *Ecological Engineering*, 60, 126-134. , 2013
- DITTMANN, E., FEWER, D. P. & NEILAN, B. A.. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* 37 23–43. 2013
- DOKULIL, M.T., TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438, 1–12 , 2000
- DORNFELD, C. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; NOVELLI, A. Comparação de bioensaios laboratoriais e in situ utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, Itajaí, v. 1, n. 2, p. 161–165, 2006.
- ESTERHUIZEN-LONDT M, VON SCHNEHEN M, KÜHN S, PFLUGMACHER S. Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. *Aquat Toxicol.*179:151-7. 2016
- ESTEVES, F. A. Fundamentos da limnologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência,. 625p. 2011
- FACCIPONTE, D. N. et al. (2018) Identifying aerosolized cyanobacteria in the human respiratory tract: A proposed mechanism for cyanotoxin-associated diseases, *Science of The Total Environment*, Volume 645, Pages 1003-1013.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.226>
- FERRÃO-FILHO, A. S. E SILVA, D. A. C. 2020. Saxitoxin-producing *Raphidiopsis raciborskii* (cyanobacteria) inhibits swimming and physiological parameters in *Daphnia similis*. *Science of The Total Environment*. Volume 706.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135751>.
- FIGUEREDO, C.C. & GIANI, A. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia* 39: 264-272. 2009.
- IORE, M.F.; NEILAN, B.A.; COPP, J.N.; RODRIGUES, J.L.M.; Tsai, S.M.; Lee, H. & Trevors, J.T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research* 39: 5017-5026. 2005.
- FONSECA, B.M. & BICUDO, C.E.M. Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brazil). *Hydrobiologia* 600(1): 267-282. . 2008
- FONSECA, B.M.; FERRAGUT, C.; TUCCI, A.; CROSSETTI, L.O.; FERRARI, F.; BICUDO, D. de C.; SANT'ANNA, C.L. e BICUDO, C.E. de. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. *Hoehnea*, 41(1), 9-30. 2014
- FRASCARELI, D., BEGHELLI, F.G.D.S., SILVA, S.C.D., & CARLOS, V.M.. Heterogeneidade espacial e temporal de variáveis limnológicas no reservatório de

Itupararanga associadas com o uso do solo na Baciado Alto Sorocaba-SP. Revista Ambiente & Água, 10, 770–781. 2015

FROUZ J., MATĚNA J. & ALI A. 2003: Survival strategies of chironomids (Diptera: Chironomidae) living in temporary habitats: a review. — Eur. J. Entomol. 100: 459–465.

FUNARI, E.; MANGANELLI, M.; BURATTI, F.M.; TESTAI, E.. (2017) Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities, Science of The Total Environment, Volume 598, Pages 867-880. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.232

GEMELGO, M. C. P., MUCCI, J. L. N. e NAVAS-PEREIRA, D. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in Brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, São Paulo). Braz. J. Biol., São Paulo, 69(4): 1001-1013, nov., 2009.

HARRIS, G.P. and BAXTER, G.. Interannual variability in phytoplankton biomass and species composition in a subtropical reservoir. Freshwater Biology, 35: 545-560. 1996

HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.-D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U. e ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal of Phycology, 35: 403-424. 1999

HUISMAN, Jef; CODD, G. A.; PAERL, H. W.; IBELINGS, B. W.; VERSPAGEN, J. M. H.; VISSER, P. M. P.. Cyanobacterial blooms - Nature Reviews Microbiology - volume 16, pages 471–483. 2018.

HUSZAR, V. L. M.; CARACO, N. The relationship between phyto- plankton composition and physical-chemical variables: a comparison of taxonomic and morphological - functional approaches in six temperate lakes. Freshwater Biol., v. 40, p. 1-18, 1998.

JONES, G.J. AND NEGRI, A.P. . Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. Wat. Res., 31, 525-533. 1997

KENESI, G., SHAFIK, H.M., KOVÁCS, A.W., HERODEK, S., PRÉŠING, M. Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. Hydrobiologia. Volume 623, Issue 1, Pages 191-202. 2009

KIBUYE et al., 2020. A critical review on operation and performance of source water control strategies for cyanobacterial blooms: Part I-chemical control methods. Harmful Algae. Volume 109. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102099>.

KIM, J. et al. Stability, accuracy and efficiency of sequential methods for coupled flow and geomechanics. In: SPE reservoir simulation symposium. Society of Petroleum Engineers, 2009.

KINNEAR, S. Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. Marine Drugs, v. 8, p. 542-564, 2010.

KOLMAKOV V. & GLADYSHEV M. 2003. Growth and potential photosynthesis of cyanobacteria are stimulated by viable gut passage in crucian carp. — *Aquat. Ecol.* 37: 237–242.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota: 2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales. Vol. 19 pp. 1-759. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. 2005.

KOMÁRKOVÁ, J., KOMÁREK, O. & HEJZLAR, J. Evaluation of the long term monitoring of phytoplankton assemblages in a canyon-shape reservoir using multivariate statistical methods. *Hydrobiologia* 504, 143–157. 2003

LOPES VR, RAMOS V, MARTINS A, SOUSA M, WELKER M, ANTUNES A, VASCONCELOS VM. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar Environ Res.* 2012 Feb;73:7-16.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; KUKKONEN, J. V. K.; RODRIGO, P.; MUÑOZ, I. Effects of indomethacin and propranolol on *Chironomus riparius* and *Physella* (*Costatella*) *acuta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 78, p. 110–115, 2012.

MACHADO, L.S., SANTOS, L.G., LOPEZ-DOVAL, J.C., POMPEO, M.L.M. and MOSCHINICARLOS, V. Fatores ambientais relacionados à ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório de Guarapiranga. *Revista Ambiente & Água*, 11(4), 810-818. 2016

MAIER, K. J.; KOSALWAT, P.; KNIGHT, A.W. Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the effect of temperature on its life history. *Environmental Entomology*, v. 19, p. 1681–1688, 1990.

MELLO, M. M., SOARES, M. C. S., ROLAND, F., LÜRLING, M. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Journal of Plankton Research*, Volume 34, Issue 11, Pages 987–994, 2012

MELO, D. S., GONTIJO, E. S. J., FRASCARELI, D., SIMONETTI, V. C., MACHADO, L. S., BARTH, J. A. C., et al. Self-organizing maps for evaluation of biogeochemical processes and temporal variations in water quality of subtropical reservoirs. *Water Resources Research*, 55, 10268– 10281. 2019

MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* 59, 303–327. 2013.

MILES, C.O. et al. 2016. Conjugation of microcystins with thiols is reversible: basecatalyzed deconjugation for chemical analysis. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 860–870. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00028>.

MOLICA, R.J.R.; ONODERA, H.; GARCÍA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S. M.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.M.F.O. & LAGOS, N.. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: 606-611. 2002

MOSCHINI-CARLOS, V.; DE FREITAS, L. G.; POMPÊO, M.. Limnological evaluation of water in the Rio Grande and Taquacetuba branches of the Billings Complex (São Paulo, Brazil) and management implications. *Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 47-59, dec. 2010.

MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M.L.M.; NISHIMURA, P.Y. ARMENGOL, J. Phytoplankton as trophic descriptors of a series of Mediterranean reservoirs (Catalonia, Spain). *Fundamental and Applied Limnology*. 191(1): 37–52, 2017.

MOSCHINI-CARLOS, VIVIANE; BORTOLI, STELLA; PINTO, ERNANI; NISHIMURA, PAULA YURI ; GOMES DE FREITAS, LEANDRO; POMPÊO, MARCELO L. M.; DÖRR, FELIPE. Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnética*, Vol. 28, Núm. 2, p. 273-282. 2009.

MOURA, A.N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; DANTAS, E.W. & ARRUDA NETO, J.D.T.. Phytoplanktonic associations: a tool to understanding dominance events in a tropical Brazilian reservoir. *Acta Botanica Brasilica* 21(3): 641-648. 2007

MORAES, M.A.B.; RODRIGUES, R.A.M.; SCHLÜTER, L.; PODDUTURI, R.; JØRGENSEN, N.O.G.; CALIJURI, M.C. (2021) Influence of Environmental Factors on Occurrence of Cyanobacteria and Abundance of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria in a Subtropical Drinking Water Reservoir in Brazil. *Water*, 13, 1716. <https://doi.org/10.3390/w13121716>

MOWE, M. A., MITROVIC, S. M., LIM, R. P., FUREY, A., AND YEO, D. C.. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology* 74(2), 205–224. 2015

NISHIMURA, P. Y. A comunidade fitoplanctônica nas represas Billings e Guarapiranga (região metropolitana de São Paulo). 2012. Tese (Doutorado em Ecologia: Ecossistemas Terrestres e Aquáticos) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NISHIMURA, P.Y.; MEIRINHO, P.A.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M.L.M. Does the plankton community follow the waterquality heterogeneity in a tropical urban reservoir (Guarapiranga reservoir, São Paulo, Brazil). *Limnetica*, 33(2): 263-280. 2014.

NISHIMURA, P.Y.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M.L.M. O estudo fitoplâncton com base nos grupos funcionais: origens e um vislumbre sobre seu futuro. In: *Ecologia de reservatórios e interfaces*. Instituto de Biociências, USP (Ed.); São Paulo, pg. 120-131. 2015

NOGUEIRA, I.S.; GAMA JÚNIOR, W.A. e D’ALESSANDRO, E.B. Cianobactérias planctônicas de um lago artificial urbano na cidade de Goiânia, GO. *Rev. Bras. Bot.*, , 34(4), 575-592. 2011

O'FARRELL, I.; VINOCUR, A.; PINTO, P. T.. Long-term study of bloom-forming cyanobacteria in a highly fluctuating vegetated flood plain lake: a morpho-functional approach. *Hydrobiologia* - 752:91–102. 2015.

O'NEIL JM, DAVISTW, BURFORD MA,GOBLER CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313–334. 2012

O'NEILL, K. MUSGRAVE, I. F. AND HUMPAGE, H.. Extended Low-Dose Exposure to Saxitoxin Inhibits Neurite Outgrowth in Model Neuronal Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120, 390–397 . 2017

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment, Paris, Test Guideline n. 233, Guidelines for the Testing of Chemicals, 2010, 29p.

OECD/OCDE - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water, Paris, Test Guideline n. 219, Guidelines for the testing of chemicals, 2004a, 21p.

OECD/OCDE - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment, Paris, Test Guideline n. 218, Guidelines for the Testing of Chemicals, 2004b, 17p.

OKSANEN, J. F., BLANCHET, G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., MINCHIN, P. R., R., O'HARA, B., SIMPSON, G. L., SOLYMOS, P., STEVENS, M. H. H., SZOECS, E., WAGNER, H. *Vegan. R Community Ecology Package*, version 2.5-2. 2018.

PADISÁK, J.; CROSSETTI, L.O. e NASELLI-FLORES, L. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. *Hydrobiologia*, 621(1): 1-19. 2009

PAERL, H. W. E V. J. PAUL, Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46:1349–1363. 2012.

PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., TOPOROWSKA, M., MAZUR-MARZEC, H.. Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia pulex*. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 26. pp. 11793-11804, 2019

PEARSON, L., MIHALI, T., MOFFITT, M., KELLMANN, R., NEILAN, B.. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* , 8, 1650-1680; 2010

PEDRAZZI, F. J. D. M., CONCEIÇÃO, F. T. D., SARDINHA, D. D. S., MOSCHINI-CARLOS, V., & POMPEO, M. (2013). Spatial and temporal quality of water in the Itupararanga Reservoir, Alto Sorocaba Basin (SP), Brazil. *Journal of Water Resource and Protection*, 5(1), 64–71. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2013.51008>

- PEDROSA, C.S.G. SOUZA, R.Q., GOMES, T.A., LIMA, C.V.F., LEDUR, P.F., KARMIRIAN, K., et al. The cyanobacterial saxitoxin exacerbates neural cell death and brain malformations induced by Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis* 14(3), 2020
- PHAM, TL., TRAN, T.H.Y., SHIMIZU, K. et al. (2020) Toxic cyanobacteria and microcystin dynamics in a tropical reservoir: assessing the influence of environmental variables. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10826-9>
- PICCINI, C., AUBRIOT, L., FABRE, A., AMARAL, V., GONZÁLEZ-PIANA, M., GIANNI, A., et al. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10, 644–653. 2011
- PIEL et al., 2019. Suppressing cyanobacteria with hydrogen peroxide is more effective at high light intensities. *Toxins (Basel)* 12, 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins12010018>.
- POMPÊO, M.L.M.; KAWAMURA, P.; MOSCHINI-CARLOS, V.; CARDOSO-SILVA, S.; LOBO, F.L.; MEIRINHO, P.A.; MEIRELLES, S.T. Heterogeneidade espacial horizontal da qualidade da água no reservatório Rio Grande, Complexo Billings, São Paulo, Brasil. In: *Ecologia de reservatórios e interfaces*. Instituto de Biociências, USP (Ed.); São Paulo, pg. 82-95. 2015
- POMPÊO, M., MOSCHINI-CARLOS, V., BITENCOURT, M.D. et al. (2021) Water quality assessment using Sentinel-2 imagery with estimates of chlorophyll a, Secchi disk depth, and Cyanobacteria cell number: the Cantareira System reservoirs (São Paulo, Brazil). *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12975-x>
- REYNOLDS, C.S. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- REYNOLDS, C.S., HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, S.M. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24: 417–428. 2002
- RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; REBECHI, D.; FÁVARO, L. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticarloi* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 59, n. 3, p. 240–250, 2015.
- RODRIGUES, Eduardo Henrique Costa et al. Phytoplankton, Trophic State and Ecological Potential in reservoirs in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Ambient. Água, Taubaté*, v. 14, n. 5, e2428, 2019. Epub 10-Out-2019.
- RODRIGUES, Eduardo Henrique Costa et al. Phytoplankton, Trophic State and Ecological Potential in reservoirs in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Ambient. Água, Taubaté*, v. 14, n. 5, e2428, 2019.
- ROSA, A. H., SILVA, Â. A. M. J., MELO, C. D. A., MOSCHINI, V., CARLOS, M., GUANDIQUE, E. G., & FRACETO, L. F.. Diagnóstico ambiental e avaliação de uso e ocupação do solo visando a sustentabilidade da represa de Itupararanga, importante área da

bacia do médio Tietê. Ecologia de reservatórios e interfaces, (pp. 213–231). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 2015

RZYMSKI, P., HORYN, O., BUDZYŃSKA, A. et al. (2018) A report of *Cylindrospermopsis raciborskii* and other cyanobacteria in the water reservoirs of power plants in Ukraine. Environ Sci Pollut Res 25, 15245–15252. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2010-6>

SALMASO, N. e PADISÁK, J. Morpho-Functional Groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). Hydrobiologia, 578(1): 97-112. 2007

SANT'ANNA, C.L., DE CARVALHO, L.R., FIORE, M.F. et al. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain, Isolated from São Paulo—Brazil, Produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Poison Neurotoxins. Neurotox Res 19, 389–402, 2011

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T. de P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M. do C.; CARVALHO, L.R. de, e SOUZA, R.C.R. de. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006. 58 p.

SANTOS, L. G., MACHADO L.D.S., MOSCHINI-CARLOS, V. & POMPÊO, M.. Os grupos funcionais fitoplanctônicos nos reservatórios do Sistema Cantareira, São Paulo, Brasil. Iheringia: Série Botânica. v. 73, n. 2, 2018

SANTOSO, A. B., HAMILTON, D. P., HENDY, C. H., SCHIPPER, L. A. Carbon dioxide emissions and sediment organic carbon burials across a gradient of trophic state in eleven New Zealand lakes. Hydrobiologia, 795:341–354, 2017

SHI, K., ZHANG, Y., ZHOU, Y. et al. (2017) Long-term MODIS observations of cyanobacterial dynamics in Lake Taihu: Responses to nutrient enrichment and meteorological factors. Sci Rep 7, 40326. <https://doi.org/10.1038/srep40326>

SUN, J. e LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton Research, 25(11), 1331-1346., 2003

SUKENIK, A.; HADAS, O.; KAPLAN, A.; QUESADA, A. (2012) Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to Subtropical and Temperate Freshwater Lakes - Physiological, Regional, and Global Driving Forces. Front Microbiol. 9;3:86. doi: 10.3389/fmicb.2012.00086

TANIWAKI, R., ROSA, A., DE LIMA, R., MARUYAMA, C., SECCHIN, L., CALIJURI, M., & MOSCHINI-CARLOS, V.. A influência do uso e ocupação do solo na qualidade e genotoxicidade da água no reservatório de Itupararanga, São Paulo, Brasil. Interciência, 38(3), 164–170. 2013

THORNTON, K.W., KIMMEL, B.L., PAYNE, F.E. Reservoir limnology: ecological perspectives. New York (NY): Wiley-Interscience. 1990.

TRUNG, B., THANH-SON, D., TRUONG-GIANG, V., LÜRLING, M.. Warming Affects Growth Rates and Microcystin Production in Tropical Bloom-Forming Microcystis Strains. *Toxins*, 10, 123. 2018

TOPOROWSKA, M., PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. and KALINOWSKA, R. Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-a on benthic larvae of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae). *Eur. J. Entomol.* 111(1): 83–90, 2014

VANDERLEY, R.F., GER, K.A., BECKER, V. et al. (2021) Abiotic factors driving cyanobacterial biomass and composition under perennial bloom conditions in tropical latitudes. *Hydrobiologia* 848, 943–960. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04504-7>

VARGAS, S.R., DOS SANTOS, P.V., BOTTINO, F. et al. (2020) Effect of nutrient concentration on growth and saxitoxin production of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanophyta) interacting with *Monoraphidium contortum* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol* 32, 421–430. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01972-w>

VICENTIN, A. M., RODRIGUES, E. H. C., MOSCHINI-CARLOS, V., POMPEO, M.L.M.. Is it possible to evaluate the ecological status of a reservoir using the phytoplankton community? *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 30, e 306, 2018

VICENTINI, M.; MORAIS, G. S.; REBECHI-BAGIO, D.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. benzo(a) pyrene exposure causes genotoxic and biochemical changes in the midge larvae of *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). *Neotropical Entomology*, v. 46, p. 658–665, 2017.

VISSER, P. M. , VERSPAGEN, J. M.H. , SANDRINI, G. , STAL, L. J. , MATTHIJS, H. C.P. , DAVIS, T. W. , PAERL, H. W. , HUISMAN, J.. How rising CO2 and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, Volume 54, Pages 145-159, 2016

WENGRAT, S., MORALES, E. A., WETZEL, C.E., ALMEIDA, P., ECTOR, L., BICUDO, D.C.. Taxonomy and ecology of *Fragilaria billingsii* sp. nov. and analysis of type material of *Synedra rumpens* var. *fusa* (Fragilariaceae, Bacillariophyta) from Brazil. *Phytotaxa* 270 (3): 191–202. 2016.

WETZEL, R. G. & LIKENS, G. E. Composition and Biomass of Phytoplankton. In: *Limnological Analyses*. Springer, New York, NY. 2000

WHO. (2017) Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization.

XUE, Q., SU, X. STEINMAN, A. D., CAI, Y, ZHAO, Y. & XIE, L. Accumulation of microcystins in a dominant Chironomid Larvae (*Tanytarsus chinensis*) of a large, shallow and eutrophic Chinese lake, Lake Taihu. *Scientific Reports*, 6:31097. 2018.

YAMAMOTO Y, SHIAH FK, CHEN TL.. Importance of large colony formation in bloom-forming cyanobacteria to dominate in eutrophic ponds. *Ann Limnol Int J Lim* 47:167–173. 2011

YANG Y, CHEN Y, CAI F, LIU X, WANG Y, LI R. Toxicity-associated changes in the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to nitrogen fluctuations. *Environ Pollut.*;237:1041–9. 2018

ZHAO, S.; GUO, Y.; SHENG, Q.; SHYR, Y. Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics* 10(15): 16. 2014.

ZILLIGES et al., 2011. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017615>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Anexo 1 - Grupos funcionais do fitoplâncton continental segundo Reynolds et al. (2002) e Padisák et al. (2009).

GF	Espécie	Habitat
C	<i>Aulacoseira ambigua</i> <i>Aulacoseira granulata</i>	Lagos mistos, eutróficos pequenos- Leves, C Si vazão médios
D	<i>Synedra rumpens</i>	Nutriente de lavagem raso e turvo enriquecido águas, incluindo rios
F	<i>Ankistrodesmus bibraianus</i> <i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> <i>Dictyosphaerium pulchellum</i> <i>Nephrocytium agardhianum</i>	Epilimnio transparente
G	<i>Chlamydomonas epibiotica</i> <i>Chlamydomonas globosa</i>	Curto, deficiência de nutrientes de alto teor de nutrientes colunas de água ricas
H1	<i>Aphanizomenon gracile</i> <i>Dolichospermum mendotae</i> <i>Dolichospermum planctonicum</i> <i>Dolichospermum solitarium</i> <i>Dolichospermum spiroides</i>	Baixa mistura de nitrogênio fixador de dinitrogênio, pouca luz
J	<i>Closteriopsis</i> <i>Coelastrum</i> <i>Coelastrum microporum</i> <i>Coelastrum reticulatum</i> <i>Pediastrum tetras</i>	Lagos rasos e enriquecidos, lagoas e rios
K	<i>Aphanocapsa delicatissima</i> <i>Aphanocapsa holsatica</i> <i>Aphanocapsa incerta</i>	Mistura profunda curta e rica em nutrientes colunas
L0	<i>Snowella lacustris</i> <i>Ceratium furcoides</i> <i>Peridinium</i> <i>Peridinium gatunense</i> <i>Peridinium pusillum</i> <i>Peridinium umbonatum</i>	Epilimnio de verão em segregação prolongada ou profunda lagos mesotróficos
Lm	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis protocystis</i>	Epilimnio de verão muito baixo, misturando, pobre lagos eutróficos
Mp	<i>Fragilaria</i> sp1 <i>Fragilaria</i> sp2	Lagos rasos inorganicamente, turbidos
P	<i>Closterium</i> <i>Staurastrum</i>	Epilimnio eutrófico
S1	<i>Geitlerinema amphibium</i> <i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Camadas mistas turvas

GF	Espécie	Habitat
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	
	<i>Planktothrix agardhii</i>	
	<i>Planktothrix isothrix</i>	
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	
	<i>Pseudanabaena galeata</i>	
Sn	<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	Camadas mistas quentes
Tb	<i>Nitzschia acicularis</i>	Ambientes altamente lóticos
Tc	<i>Phormidium aerugineo - caeruleum</i>	Águas constantemente eutróficas, ou rios com baixo fluxo com macrófitas emergentes
Td	<i>Gonatozygon</i> sp	Águas constantemente mesotróficas ou rios com baixo fluxo com macrófitas submersas
W1	<i>Euglena acus</i> <i>Phacus</i> sp	Pequenos lagos orgânicos
W2	<i>Trachelomonas hispida</i> <i>Trachelomonas verrucosa</i> <i>Trachelomonas volvocina</i>	Lagos mesotróficos rasos
X1	<i>Monoraphidium contortum</i> <i>Monoraphidium setiforme</i>	Camadas mistas rasas na deficiência de nutrientes condições enriquecidas
Y	<i>Cryptomonas brasiliensis</i> <i>Cryptomonas erosa</i>	Geralmente, lagos fagotróficos de baixa luminosidade pequenos e enriquecidos

Supplementary information (SI)

SI Table 5 Gradient used for the analysis of MC-LR and RR by LC-MS / MS.

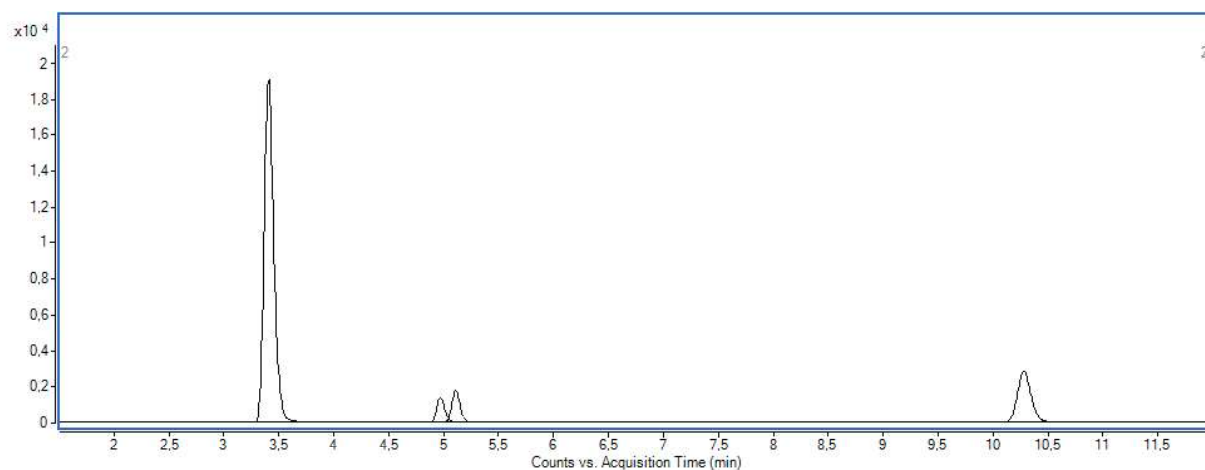
Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	65	35
10	50	50
11	0	100
13	0	100
14	65	35
20	65	35

SI Table 6 Optimized parameters for monitored transitions (m / z 135 and 213) in MRM mode.

Compound	Precursor Ion (m/z)	Ion Product (m/z)	Fragment	Collision Energy (CE) (eV)
MC-LR	995.5	213	120	70
MC-LR*	995.5	135	120	80
MC-RR	519.9	213	100	30
MC-RR*	519.9	135	100	30
MC-LA	910.5	213	120	50

MC-LA*	910.5	135	120	60
MC-YR	1045.5	213	120	70
MC-YR*	1045.5	135	120	80

SI Fig. 01 Standard chromatogram of microcystins. Elution order: RR, YR, RR and LA



SI Fig. 02 Chromatogram sample P5-dec/2016. Only MC-LR at 5.1 min. Low intensity.

