

Ruan de Oliveira Carneiro

**Efeitos do biorreator de perifíton sobre o
fitoplâncton e epipélton com vistas à
biorremediação de reservatórios eutrofizados**

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos.

SÃO PAULO

2021

Ruan de Oliveira Carneiro

**Efeitos do biorreator de perifíton sobre o
fitoplâncton e epipélton com vistas à
biorremediação de reservatórios eutrofizados**

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos.

ORIENTADORA: DRA. CARLA FERRAGUT

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MAPOTECA** do Instituto de Pesquisas Ambientais/SIMA.

Carneiro, Ruan de Oliveira

C289e Efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton com vistas à biorremediação de reservatórios eutrofizados / Ruan de Oliveira Carneiro - - São Paulo, 2021.
70p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2021.
Bibliografia.

1. Biorreator de perifíton. 2. Eutrofização. 3. Biorremediação. I. Título.

CDU: 582.526.325

*Dedico à toda minha família e
amigos, pelo carinho e incentivo de
todos os dias*

*Senhor, concede-me a consciência
dos meus muitos erros.*

*Não me consintas viver iludido a
meu próprio respeito.*

*Que eu tenha suficiente lucidez para
saber quem sou.*

*Que eu consiga, mais que os outros,
detectar as fragilidades que me são
comuns.*

*Dá-me a tua força para que eu
possa superar-me, a tua luz para
não caminhar nas trevas, a tua paz
na luta que me aflige.*

*Que eu seja sempre sincero em
meus propósitos e humilde em
minhas atitudes, verdadeiro em
minhas palavras e fiel aos meus
compromissos.*

*Senhor, não me deixes entregue à
invigilância e ao assédio do mal.*

*Sê meu abrigo e a minha
inspiração...*

Que assim seja!

Carlos A. Baccelli – Irmão José

AGRADECIMENTOS

Para realizar esse trabalho, contei com a ajuda de muitas pessoas, que se fizeram grandes amigas e profissionais, sem as quais não me seria possível dar nem ao menos o primeiro passo dentro do mundo acadêmico. Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a minha formação pessoal e profissional. Sempre terão o meu reconhecimento, estima e gratidão.

À Dra. Carla Ferragut, pela orientação, paciência e conselhos. Por ficar feliz com os meus êxitos e conquistas, e se compadecer das minhas dificuldades, se prontificando a ajudar e corrigir os meus desacertos. Por estar sempre disposta para conversar, discutir um artigo, ensinar. Pela confiança depositada em mim para desenvolver esse trabalho, e também por todos os dias que ficamos até tarde no laboratório para terminar as análises. Obrigado por me orientar e me ensinar desde a iniciação científica, quando eu mal sabia o que era uma alga.

À Dra. Denise de Campos Bicudo, pelas conversas, ensinamentos, por estar sempre alegre e disposta a ajudar no que for preciso. Agradeço muito pela contribuição ao meu trabalho e por sempre acreditar em mim.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, pelo grande acervo de publicações que me auxiliou na taxonomia, e por todos os ensinamentos. Foi um grande prazer conhecer e aprender com os grandes nomes da Botânica e da Limnologia no Brasil.

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, pela infraestrutura disponibilizada, auxílio nas coletas e uso irrestrito do laboratório e equipamentos do Núcleo de Pesquisas em Ecologia.

À Estação Meteorológica do Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, por fornecer os dados climatológicos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida durante o período de desenvolvimento deste trabalho. E também pela prorrogação dos prazos, que auxiliaram muitos alunos que tiveram que adiar seus experimentos e análises durante a pandemia.

A todos os amigos que fiz nesses primeiros passos que dei no mundo acadêmico.

Ao Leonardo Tristão, pela amizade, que se estende desde os primeiros dias de faculdade, quando ainda nem sabíamos que caminho seguir. Pelas conversas, e todo o auxílio durante as análises, coletas e experimento. Obrigado até mesmo pelo futebol e pelas noites em que voltávamos para casa conversando, onde pude reorganizar meus planos e prosseguir motivado em minhas atividades.

À Renata Costa, pelas risadas e pelo seu bom humor que deixavam as nossas coletas um pouco mais alegres. Pela parceria e todo o incentivo durante esses anos incertos de mestrado e pandemia. Obrigado pela ajuda em todas as análises, principalmente na clorofila-*a*, pois só você tem paciência para lidar com aquele medidor de pH.

À Barbara, Alex e Matheus, pela amizade, e principalmente pelas risadas e conversas que deixavam os dias mais felizes e tornavam o clima do laboratório mais leve e alegre.

Ao Yukio, pela amizade e por ajudar na lavagem das vidrarias do laboratório, que não foram poucas.

À Krysna e Simone, amigas de tão longe, mas que foram essenciais nessa caminhada. Agradeço imensamente pela amizade de vocês, as conversas e ensinamentos, principalmente sobre as diatomáceas.

Aos meus pais, Leila e Marcello, por todo o carinho e amor. Por acreditarem em mim desde os tempos de infância, quando eu passava o dia inteiro assistindo Animal Planet e sonhava em viajar o mundo filmando e fazendo documentários sobre os mais diversos animais. A vida me trouxe para a Ecologia de ecossistemas aquáticos, e eu não poderia ser mais feliz.

À minha irmã pequena, Marcella, e o meu irmão gêmeo Renan, pelo carinho e companheirismo diário, que funcionaram sempre como fonte de renovação de energias, após dias estressantes e cansativos. Obrigado pela existência de vocês.

Aos meus tios e padrinhos, que sempre me apoiaram e iam até o Instituto em dias de evento para saber o que era o tal do “perifiton” de que eu tanto falava nas conversas em família.

Aos amigos do Centro Espírita Irmã Ângela, onde eu aprendi a ser útil e ajudar o próximo. Sem os serviços voluntários e todo o conhecimento que adquiri em nossas reuniões de estudo, me seria muito difícil seguir motivado no campo de trabalho a que Deus me conduziu. Patricia, Cristina, Adilson, Sônia, Reinaldo, Daniel, Marcia, Luis, enfim... são muitos nomes e eu estaria sendo injusto com alguém. Agradeço a todos vocês.

Às minhas vózinhas, Onofra Benedita Bento e Maria Célia (Vó Ica e Vó Cecé), que sempre me apoiavam e me perguntavam, “como estão as coisas lá no Botânico meu filho”?

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Ecologia Aquática e Terrestre do Instituto de Botânica, e por todos os pesquisadores, técnicos, enfim, amigos que fiz durante essa pequena jornada.

São muitas as pessoas que direta ou indiretamente participaram disso, e, talvez, tenha cometido alguma injustiça. Mas desde já agradeço a todos de coração.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	ix
GENERAL SUMMARY	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1: Efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton em um reservatório eutrófico: experimento em mesocosmos	
RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Área de estudo	8
2.2 Delineamento experimental	10
2.3 Biorreator de Perifíton	12
2.4 Variáveis abióticas analisadas	12
2.5 Fitoplâncton	13
2.6 Epipélton	14
2.7 Tratamento dos dados	14
3. RESULTADOS	15
3.1 Biorreator de Perifíton	15
3.2 Variáveis físicas e químicas da água	17
3.3. Análise de Componentes Principais (PCA)	17
3.4 Fitoplâncton	20
3.5 Epipélton	23
4. DISCUSSÃO	25
Capítulo 2: O uso do biorreator de perifíton na manutenção da oligotrofização em ambientes restaurados: experimento em mesocosmos	
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Área de estudo	33

2.2. Delineamento experimental	34
2.3 Biorreator de Perifíton	37
2.4 Variáveis abióticas analisadas	38
2.5. Fitoplâncton	38
2.6. Epipélton	39
2.7. Tratamento dos dados	39
3. RESULTADOS	40
3.1. Perifíton (Biorreator)	40
3.2 Variáveis abióticas da água	41
3.3 Fitoplâncton	44
3.4 Epipélton	47
4. DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO GERAL	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Resumo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência e viabilidade da utilização de biorreatores de perifíton para a remoção de fósforo em processos de biorremediação e restauração de ambientes eutrofizados. Para atingir esse objetivo, foram realizados dois experimentos em mesocosmos de fundo aberto *in situ* na região litorânea do Lago das Garças, o que permitiu a obtenção de respostas mais próximas às condições naturais. É um reservatório eutrófico com florações frequentes do fitoplâncton, o qual está localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo. No primeiro experimento, placas de vidro para a colonização do perifíton foram colocadas nos mesocosmos do tratamento com biorreator de perifíton (BP). Para quantificar os efeitos da remoção de P pelo biorreator sobre o fitoplâncton e epipélton, foram realizadas 3 coletas durante o período experimental, com 6, 9 e 12 dias de experimento. As espécies mais abundantes do fitoplâncton durante todo o experimento foram as cianobactérias *Synechocystis aquatilis*, *Raphidiopsis raciborskii* e *Pseudanabaena galeata*. O biovolume e a densidade dessas espécies de cianobactérias foram menores na presença do biorreator de perifíton (tratamento BP) em comparação ao Controle. Conclui-se que a remoção de P da água pelo biorreator de perifíton reduziu a floração do fitoplâncton, evidenciando seu potencial biorremediador do processo de eutrofização. No segundo experimento, para simular o processo de oligotrofização, que antecedeu a instalação das placas de vidro (biorreatores) para a colonização do perifíton, realizou-se a diluição de 50% da água dos mesocosmos em ambos os tratamentos do experimento (Diluído – D; Diluído + Perifíton - DP). A retirada de 50% da água dos mesocosmos foi feita com bomba de sucção de baixa pressão (2000 L/H). Para quantificar os efeitos da remoção de P pelo biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton, foram realizadas 5 coletas durante o período experimental, com 6, 9, 12, 15 e 20 dias de experimento. As espécies

mais abundantes do fitoplâncton durante todo o experimento foram as cianobactérias *Synechocystis aquatilis*, *Raphidiopsis raciborskii* e *Pseudanabaena galeata*. O biovolume e a densidade dessas espécies de cianobactérias foram menores na presença do biorreator de perifíton (tratamento diluído + perifíton - DP) em comparação ao tratamento diluído (D) na maioria dos dias do experimento. A clorofila-*a* do epipélton foi maior na presença do biorreator de perifíton. Conclui-se que, além de manter as condições limnológicas atingidas com a oligotrofização, a remoção de P da água pelo biorreator de perifíton reduziu a floração do fitoplâncton, o que evidencia seu potencial na manutenção de ambientes restaurados. Por fim, os resultados de ambos os experimentos mostram o potencial que o biorreator de perifíton apresenta na utilização em processos de biorremediação e restauração de ambientes eutrofizados.

General Summary

This study aimed to evaluate the efficiency and feasibility of using periphyton bioreactors for phosphorus removal in bioremediation processes and restoration of eutrophic environments. To achieve this goal, two experiments were carried out in open-bottom mesocosms in situ in the coastal region of Lago das Garças, which will result in responses closer to natural conditions. It is an eutrophic reservoir with frequent blooms of phytoplankton, which is located in Fontes do Ipiranga State Park (PEFI), São Paulo. In the first experiment, glass plates for periphyton colonization were placed in the mesocosms of the periphyton bioreactor (BP) treatment. To quantify the effects of P removal by the bioreactor on phytoplankton and epipelon, 3 samplings were carried out during the experimental period, with 6, 9 and 12 days of experiment. The most abundant species of phytoplankton throughout the experiment were the cyanobacteria *Synechocystis aquatilis*, *Raphidiopsis raciborskii* and *Pseudanabaena galeata*. The biovolume and density of these cyanobacterial species were lower in the presence of the periphyton bioreactor (BP treatment) compared to the Control. It is concluded that the removal of P from the water by the periphyton bioreactor reduced phytoplankton flowering, showing its bioremediation potential for the eutrophication process. In the second experiment, to simulate the oligotrophication process, which preceded the installation of the glass plates (bioreactors) for the colonization of the periphyton, a 50% dilution of the water from the mesocosms was carried out in both treatments of the experiment (Diluted - D ; Diluted + Periphyton - DP). The removal of 50% of the water from the mesocosms was done with a low pressure suction pump (2000 L/H). To quantify the effects of P removal by the periphyton bioreactor on phytoplankton and epipelon, 5 samplings were carried out during the experimental period, with 6, 9, 12, 15 and 20 days of experiment. The most abundant species of phytoplankton throughout the experiment

were the cyanobacteria *Synechocystis aquatilis*, *Raphidiopsis raciborskii* and *Pseudanabaena galeata*. The biovolume and density of these cyanobacterial species were lower in the presence of the periphyton bioreactor (diluted treatment + periphyton - DP) compared to the diluted treatment (D) on most days of the experiment. Epipelon chlorophyll-a was higher in the presence of the periphyton bioreactor. It is concluded that, in addition to maintaining the limnological conditions achieved with oligotrophication, the removal of P from the water by the periphyton bioreactor reduced phytoplankton flowering, which highlights its potential for maintaining restored environments. Finally, the results of both experiments show the potential that the periphyton bioreactor has for use in bioremediation processes and restoration of eutrophic environments.

Introdução Geral

As comunidades algais desempenham diversas funções que garantem o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, uma vez que são importantes produtores primários, atuam na ciclagem de nutrientes e na transferência de energia através da rede alimentar (Vadeboncoeur *et al.* 2001). As algas podem ser classificadas de acordo com o hábito que possuem, sendo denominadas de “fitoplâncton” quando se encontram em suspensão na coluna da água, ou “perifíton”, quando associadas à algum substrato. O perifíton é uma “*complexa comunidade de microbiota constituída de algas, bactérias, fungos, animais e detritos, orgânicos ou inorgânicos, aderidos a substratos submersos, orgânicos ou inorgânicos, vivos ou mortos*” (Wetzel 1983). O perifíton pode ser classificado de acordo com o substrato que coloniza, sendo, por exemplo, chamado de epipélon quando aderido ao sedimento (Fernandes & Esteves 2011). O perifíton atua no funcionamento dos ecossistemas aquáticos, contribuindo com grande parte da produtividade primária, constituindo-se em base da cadeia trófica (Vadeboncoeur & Steinman 2002), participando da ciclagem de nutrientes (Dodds 2003; Huszar *et al.* 2006), em especial fósforo e nitrogênio.

Em relação aos impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos, a eutrofização é um dos problemas mais difundidos no planeta, pois causa a proliferação de algas nocivas, deterioração da qualidade da água e mortandade de peixes (Schindler 2012). A sobrecarga de N e P é considerado fator chave para o desencadeamento da eutrofização nos ecossistemas aquáticos, sendo o fósforo o elemento mais associado às florações algais (Schindler 2016). O aporte externo de fósforo (P) que adentra nos ecossistemas aquáticos, através de fontes difusas e pontuais, aumenta a disponibilidade deste nutriente no ecossistema, favorecendo a proliferação de algas e cianobactérias do fitoplâncton, causando florações e intensificando o processo de eutrofização (Wu *et al.* 2011; Godoy

et al. 2019). Muitos estudos demonstraram a capacidade do perifíton em imobilizar e reter o P da coluna da água, o que pode reduzir a disponibilidade deste nutriente no ambiente (Gao *et al.* 2019; Mendes-Santos & Ferragut 2021).

Considerando a capacidade do perifíton de adsorção e absorção de P, estudos mostraram a eficiência da utilização de biorreatores de perifíton no controle da floração de algas e cianobactérias do fitoplâncton em processos de biorremediação de reservatórios eutróficos (Wu *et al.* 2010; Ko *et al.* 2019). Denomina-se de biorreatores os reatores bioquímicos, biológicos ou químicos, nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais) (Mandenius 2016). Nesse sentido, a microbiota do perifíton atua como biorreator para remoção de diversas substâncias do ambiente, como, por exemplo, o fósforo e o carbono (Wu *et al.* 2010; Wu *et al.* 2012; Shangguan *et al.* 2015). Como a comunidade perifítica é naturalmente encontrada nos ecossistemas, o biorreator de perifíton é um método ambientalmente benigno e sustentável, sendo uma opção atraente para a remediação *in situ* de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2012). Muitos estudos abordam a utilização do perifíton como biorreator para a remoção de P em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2010; Lu *et al.* 2014; Mendes-Santos & Ferragut 2021). No entanto, os estudos que avaliam a eficiência da utilização de biorreatores de perifíton na remoção de P em condições ambientais mais próximas das condições naturais são escassos (Cui *et al.* 2017; Ko *et al.* 2019), particularmente aqueles que incluem as respostas do fitoplâncton e do epipélton à presença do biorreator. Assim, até a presente pesquisa, não foi encontrado nenhum estudo que avaliou a influência do potencial do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton conjuntamente. Considerando que o epipélton atua na imobilização do P no sedimento (Dodds 2003), o maior entendimento dos efeitos do biorreator sobre o fitoplâncton e

epipélon conjuntamente pode contribuir para um processo de biorremediação de ambientes eutróficos mais eficiente.

Para melhorar a qualidade da água, a biomanipulação deve ser considerada após a redução do carregamento externo de P, sendo indicado esperar alguns anos até que a influência da ciclagem interna deste nutriente diminua (Søndergaard *et al.* 2003). Assim, a presença do perifíton pode criar condições bioquímicas que favoreçam a permanência do P no sedimento, ou seja, minimizando a liberação do P para coluna de água (Dodds 2003). Mudanças nas condições ambientais, como a anoxia, podem promover a liberação do P do sedimento para a coluna da água, aumentando a disponibilidade deste nutriente para o fitoplâncton, causando novas florações (Carlton & Wetzel 1988; Søndergaard *et al.* 2013). Como exemplo disso no Brasil, podemos citar o caso do Lago Paranoá, em Brasília, onde um estudo recente mostrou o aumento na biomassa de cianobactérias após um longo período de oligotrofização (Batista & Fonseca 2018). Portanto, considerando que a anoxia do sedimento pode induzir a liberação de P para a coluna da água, causando a fertilização interna e retardando o processo de restauração ou intensificando as florações do fitoplâncton, é de extrema importância a avaliação do epipélon em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados.

Embora os estudos sobre biorreatores para remoção de substâncias da água tenham avançado nos últimos anos (Wu *et al.* 2012), pouco se sabe a respeito dos efeitos do biorreator de perifíton sobre a biomassa e estrutura do fitoplâncton, bem o desenvolvimento do epipélon. Assim, o presente estudo tem como foco a biorremediação de ambientes eutróficos. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de contribuir com o maior conhecimento a respeito dos efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélon em processos de biorremediação e restauração de ambientes eutrofizados.

A presente dissertação encontra-se dividida em dois Capítulos:

Capítulo I: Efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélon em um reservatório eutrófico: experimento em mesocosmos

Capítulo II: O uso do biorreator de perifíton na manutenção da oligotrofização em ambientes restaurados: experimento em mesocosmos

Capítulo I: Efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton em um reservatório eutrófico: experimento em mesocosmos

Resumo

O perifíton tem a capacidade de remover diversas substâncias da água, como metais pesados e nutrientes, dentre eles o fósforo (P). O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da remoção de P pelo biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton, com vistas à biorremediação de ambientes eutrofizados. Realizou-se um experimento em mesocosmos de fundo aberto *in situ* na região litorânea do Lago das Garças, reservatório eutrófico e com florações frequentes do fitoplâncton, localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo. O experimento consistiu-se em dois tratamentos em tréplica: C – Controle, tratamento sem biorreator de perifíton; BP – tratamento com biorreator de perifíton. Para quantificar os efeitos da remoção de P pelo biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton, foram realizadas amostragens nos dias 6, 9 e 12 do período experimental. As espécies mais abundantes do fitoplâncton foram as cianobactérias *Synechocystis aquatilis*, *Raphidiopsis raciborskii* e *Pseudanabaena galeata*. A presença do biorreator de perifíton não influenciou qualitativamente o fitoplâncton no período experimental. Em contraste, o biovolume e a densidade foram menores na presença do biorreator de perifíton (tratamento BP) em comparação ao Controle. Conclui-se que a presença do biorreator de perifíton reduziu a floração do fitoplâncton, evidenciando seu potencial biorremediador do processo de eutrofização.

Palavras-chave: ambientes eutrofizados, biofilme, remoção de fósforo, biorremediação

1. Introdução

Em relação aos impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos, a eutrofização é um dos problemas mais difundidos no planeta, pois causa a proliferação de algas nocivas, deterioração da qualidade da água e mortalidade de peixes (Schindler 2012). O aporte externo de fósforo (P) que adentra nos ecossistemas aquáticos, através de fontes difusas e pontuais, aumenta a disponibilidade deste nutriente no ecossistema, favorecendo a proliferação de algas e cianobactérias do fitoplâncton, causando florações e intensificando o processo de eutrofização (Wu *et al.* 2011; Godoy *et al.* 2019). Muitos estudos demonstraram a capacidade do perifíton em imobilizar e reter o P da coluna da água, o que pode reduzir a disponibilidade deste nutriente no ambiente (Gao *et al.* 2019; Mendes-Santos & Ferragut 2021). Considerando a capacidade do perifíton de adsorção e absorção de P, estudos evidenciam a eficiência e viabilidade da utilização do perifíton em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados (Jobgen *et al.* 2004; Wu *et al.* 2014; Pei *et al.* 2015), principalmente no controle da floração de cianobactérias (Wu *et al.* 2010; Ko *et al.* 2019). Além disso, o perifíton pode ser usado como bioindicador de mudanças na qualidade da água, como a disponibilidade de P, em processos de restauração de lagos (Gaiser 2009). O perifíton também tem sido utilizado como ferramenta para remoção de P e outras substâncias nos tratamentos de águas residuais enriquecidas (Basílico *et al.* 2016). Assim, com base na literatura, o perifíton pode ser uma importante ferramenta para a remoção de fósforo de ecossistemas enriquecidos.

Considerando o uso do perifíton em substrato artificial para remoção de P, estudos mostraram a eficiência da utilização de biorreatores de perifíton no controle da floração de algas e cianobactérias do fitoplâncton em processos de biorremediação de reservatórios eutróficos (Wu *et al.* 2010; Ko *et al.* 2019). Como o perifíton é naturalmente encontrado nos ecossistemas, o biorreator de perifíton é um método ambientalmente

benigno e sustentável, sendo uma opção atraente para a remediação *in situ* de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2012). Muitos estudos abordam a utilização do perifíton como biorreator para a remoção de P em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2010; Lu *et al.* 2014; Morashashi *et al.* 2019; Mendes-Santos & Ferragut 2021). No entanto, são escassos os estudos que avaliam a eficiência da utilização de biorreatores de perifíton na remoção de fósforo em condições ambientais mais próximas das condições naturais, (Cui *et al.* 2017; Ko *et al.* 2019), e até a presente pesquisa, nenhum estudo avaliou a influência do potencial do biorreator de perifíton sobre o epipélton. Apesar de avanços no conhecimento da aplicação de biorreatores de perifíton em processos de biorremediação (Sládečková *et al.* 1983; Wu *et al.* 2013), ainda há lacunas nessa área do conhecimento, como, por exemplo, os efeitos do biorreator sobre a biomassa e a estrutura do fitoplâncton, sendo este último atributo da comunidade, pouco abordado em estudos de biorremediação.

Considerando que o biorreator do perifíton pode minimizar a floração do fitoplâncton e aumentar a zona eufótica (Wu *et al.* 2010; Ko *et al.* 2019), o crescimento do epipélton fototrófico no ambiente bentônico pode ser favorecido (Amaral *et al.* 2020). Estudos têm mostrado que o perifíton desenvolvido no sedimento superficial, o epipélton, pode contribuir para a manutenção da oligotrofização (Jobsen *et al.* 2004; Liboriussen & Jeppesen 2006; Amaral *et al.* 2020). Em ecossistemas lacustres rasos, onde a luz atinge o fundo do sistema, o epipélton atua na bioestabilização e na imobilização de fósforo no sedimento (Vadeboncoeur & Steinman 2002; Dodds 2003). A eutrofização acarreta a proliferação do fitoplâncton, o que reduz a profundidade da zona eufótica da água (Wetzel 2001), diminuindo a capacidade fotossintética do epipélton (Liboriussen & Jeppesen 2006; Vadeboncoeur *et al.* 2014). Assim, em lagos eutróficos pode ocorrer intensa liberação de P do sedimento devido à condição anóxica do hipolímnio (Correll 1999),

desencadeando a autofertilização (Søndergaard *et al.* 2003; Bicudo *et al.* 2007; Søndergaard *et al.* 2013). A fotossíntese realizada pelas algas do epipélon é um dos processos que pode produzir uma supersaturação de oxigênio no sedimento, elevando os níveis de pH. Nestas condições pode ocorrer a complexação e precipitação de fosfato com metais presentes no sedimento, como íons de Ca^+ e Fe^+ , formando complexos fosfatados, o que retém o P no sedimento, enquanto essas condições bioquímicas se mantiverem (Dodds 2003). Desta forma, a retenção de fósforo no sedimento, impede sua liberação para a coluna de água, tornando-o indisponível para o fitoplâncton (Dodds 2003, Liboriussen & Jeppesen 2006). Essa redução da disponibilidade de P pode contribuir grandemente para a diminuição da biomassa fitoplanctônica e, conseqüentemente, para o controle das florações.

Com vistas ao controle da floração, o presente estudo avaliou experimentalmente os efeitos do perifíton em substrato artificial, que funciona como biorreator para remoção de P, sobre a biomassa e estrutura do fitoplâncton e a biomassa do epipélon em um lago eutrófico e raso. A hipótese é que, se o perifíton tem a capacidade de estocar e remover o fósforo da água (Dodds 2003; Jobgen *et al.* 2004), então, a remoção de P pode mudar a estrutura do fitoplâncton, reduzindo a biomassa. O sedimento superficial também foi investigado, visando entender se as mudanças do fitoplâncton na presença do biorreator de perifíton poderiam influenciar o epipélon. Dessa forma, o presente estudo contribui para o maior entendimento do potencial do perifíton como uma ferramenta para o controle da floração de algas e cianobactérias em processos de restauração de lagos e reservatórios rasos eutrofizados.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo

O experimento foi realizado na zona litorânea do Lago das Garças ($23^{\circ} 64' 75,0''S$ e $46^{\circ} 62' 22,7''W$) que é um reservatório localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), situado no Município de São Paulo, sudeste do Brasil ($23^{\circ}38'20,03'' S$; $46^{\circ}37'19,20''W$). O reservatório é um sistema com área de 88.156 m^2 , volume de 188.785 m^3 , profundidade média de 2,1 metros e profundidade máxima de 4,7 metros (Bicudo *et al.* 2002).

Com a instalação de uma estação de tratamento secundário das águas residuais do Zoológico (2007), bem como a inativação do efluente proveniente do Departamento de Agricultura do Estado de São Paulo (2014), a qualidade da água aumentou, mas o reservatório ainda é classificado como super-eutrófico (Bicudo *et al.* 2020). Este reservatório foi escolhido para realização do experimento por se tratar de um reservatório eutrófico com florações frequentes do fitoplâncton e apresentar dados limnológicos de estudos de longa duração (Bicudo *et al.* 2007; Crossetti *et al.* 2018; Bicudo *et al.* 2020).

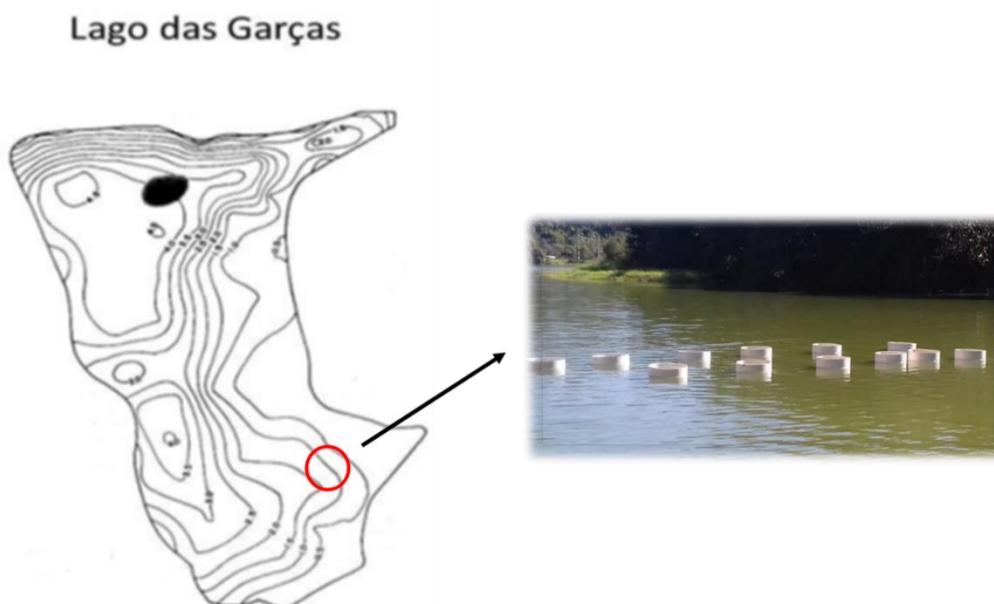


Figura 1. Mapa batimétrico do Lago das Garças com localização das unidades experimentais na zona litorânea. Fonte: Bicudo *et al.* (2002).

O clima regional é classificado como tropical de altitude, que predomina nos planaltos e montanhas do sudeste do Brasil (Conti & Furlan 2003). Durante o período experimental (23 de julho – 05 de agosto de 2019), a precipitação total acumulada foi de 2,2 mm e a temperatura média 16,7 °C (<http://www.estacao.iag.usp.br/boletim.php>).

2.2 Delineamento experimental

Para avaliar os efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton foi realizado um experimento em mesocosmos de fundo aberto na zona litorânea de um lago eutrófico. O experimento consistiu-se em dois tratamentos em tréplica (n=3): C – Controle, sem perifíton; BP – Tratamento com biorreator de perifíton. O experimento foi realizado no período seco (23/julho a 5/agosto/2019) para minimizar os efeitos perturbatórios da chuva sobre o perifíton. Os mesocosmos foram instalados no dia 23 de julho de 2019. No dia seguinte (T0), os substratos artificiais (placas de vidro de 25 cm x 10 cm) para colonização do biorreator de perifíton foram instalados nos mesocosmos do tratamento BP, totalizando 12 dias de colonização. As amostragens para determinação das variáveis abióticas e bióticas foram realizadas no 6º, 9º e 12º dia do período experimental. No Lago das Garças, os dias de amostragem foram determinados com base no processo de colonização e sucessão da comunidade de algas perifíticas, que atingiu o pico de biomassa entre 20 – 25 dias (Borduqui & Ferragut 2012).

Os mesocosmos utilizados constituem-se de cilindros de PVC com 0,5m de diâmetro e 1,5m de altura. A profundidade média da coluna da água e o volume médio dos mesocosmos foi de 88 cm e 173 litros, respectivamente, durante o período experimental. Os mesocosmos foram enterrados no sedimento do lago até a parte consolidada do sedimento (25 – 30 cm), de modo a integrar todas as comunidades algais,

e foram dispostos em função da uniformidade na disponibilidade da luz. Os tratamentos foram aleatorizados em campo (Figura 2).

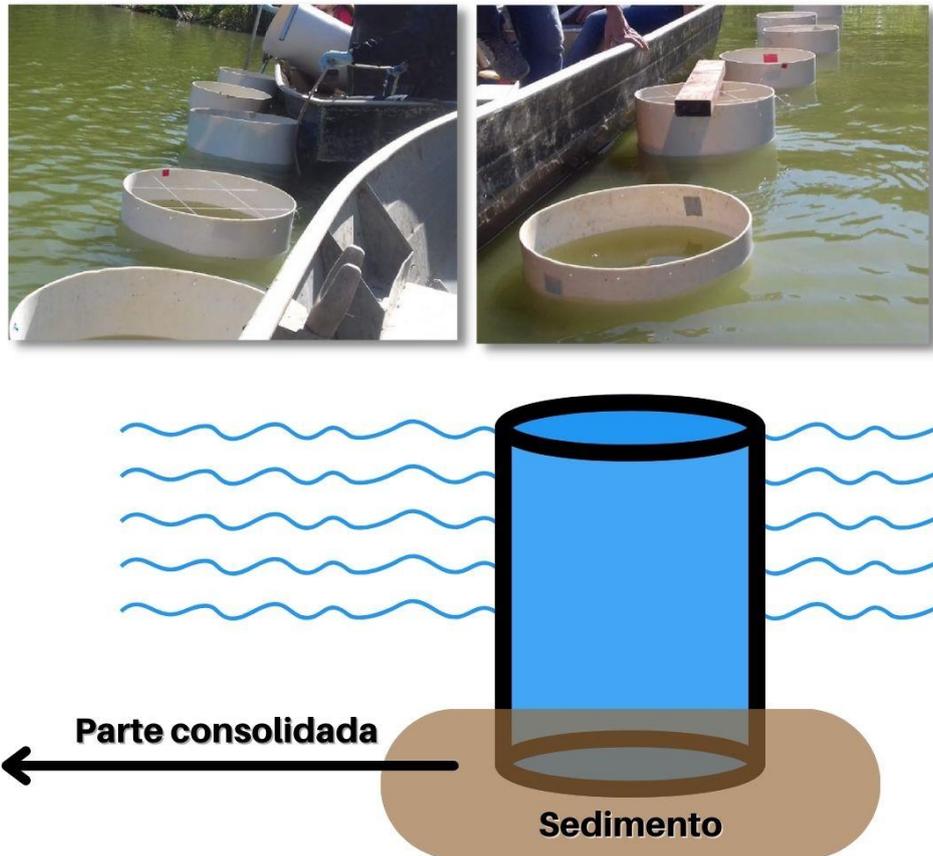


Figura 2. Esquema mostrando a instalação dos mesocosmos de fundo aberto na área de estudo.

As placas de vidro usadas como substratos (biorreator de perifíton) foram colocadas à 25 centímetros da superfície para evitar foto-inibição (Hill 1996) e próximo da superfície do sedimento, onde a liberação de P é mais intensa em sistemas eutróficos (Correll 1999). Inicialmente, foram colocadas 10 placas de vidro na superfície e 10 no fundo, totalizando 20 lâminas (99,52 m² de área de substrato) em cada mesocosmo do tratamento BP. Os biorreatores foram suspensos na subsuperfície (25 cm de profundidade) e próximo ao sedimento (50 cm de profundidade) para a remoção de P

mais uniforme na coluna de água. Os valores dos atributos do biorreator de perifíton foram somados para representar a remoção de P na coluna de água.

O perifíton no substrato artificial foi amostrado para quantificar a biomassa algal no biorreator. Na superfície e no fundo, as placas de vidro colonizadas foram retiradas cuidadosamente, evitando o desprendimento da comunidade. O material perifítico foi removido do substrato através de raspagem com pincel e jatos de água destilada com volume conhecido.

A amostragem da água para análise das variáveis abióticas e do fitoplâncton foram coletadas manualmente com garrafas de polietileno na subsuperfície.

Amostras do sedimento superficial (1 cm) para análise do epipélton foram coletadas através de tubos de PVC de 5 centímetros de diâmetro e 1.20 metros de comprimento. Os tubos foram enterrados no sedimento até a parte consolidada e, posteriormente, retirados de maneira cuidadosa para evitar a mistura da amostra dentro do tubo coletor. No laboratório, as amostras foram diluídas com volume conhecido de água e divididas em alíquotas para posteriores análises. Os pontos de amostragem dentro dos mesocosmos foram aleatorizados e identificados após a coleta, para evitar a reamostragem.

As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos plásticos, dispostas em caixas de coleta contendo gelo e levadas para o laboratório.

2.3 Biorreator de Perifíton

Para quantificar o efeito do biorreator de perifíton sob o fitoplâncton e epipélton, estimou-se a biomassa da comunidade por unidade de área ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$). A biomassa perifítica foi estimada pela concentração de clorofila-*a* (feofitina corrigida, Sartory & Grobblelar 1984) e massa seca livre de cinzas (MSLC) (APHA 2005). Para verificar a remoção e

acúmulo de P no perifíton, a quantidade de TP foi determinada no início (6d) e no final (12d) do período experimental. O conteúdo de P ($\mu\text{g/g MS}$) foi determinado pelo método de Andersen (1976) e modificado por Pompêo & Moschini-Carlos (2003), que consiste em combustão, oxidação e determinação do fósforo reativo solúvel.

2.4 Variáveis abióticas analisadas

No experimento, as seguintes variáveis foram analisadas no laboratório: oxigênio dissolvido (Golterman *et al.* 1978); alcalinidade (Golterman & Clymo 1971); formas de carbono inorgânico dissolvido (CO_2 livre e bicarbonato); material particulado em suspensão (APHA 2005), nitrito e nitrato (Mackereth *et al.* 1978); nitrogênio amoniacal (Solorzano 1969); ortofosfato e fósforo total dissolvido (Strickland & Parsons 1960); nitrogênio total e fósforo total (Valderrama 1981). As amostras para a fração dissolvida dos nutrientes foram filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/F).

As seguintes variáveis foram medidas em campo: temperatura; condutividade elétrica; pH (sonda multiparâmetros – Horiba U53); e radiação subaquática (luxímetro Li-Cor LI250A). A quantidade de luz foi calculada conforme Birge (1915): % de luz = $100 \times (i_1 - i_2) / i_1$, onde: i_1 é a quantidade de luz na subsuperfície e i_2 do fundo.

2.5 Fitoplâncton

Para avaliar o efeito do biorreator de perifíton sobre a estrutura e biomassa do fitoplâncton no experimento, amostras de água foram fixadas com formalina 4% e analisadas ao microscópio óptico (Zeiss Axioscop). A identificação taxonômica das algas foi feita com base em publicações regionais (Ex. Castro *et al.* 1991; Sormus & Bicudo 1994; Tucci *et al.* 2006). As amostras para análise quantitativa foram preservadas em lugol acético e mantidas no escuro até o momento da análise. A contagem das algas foi

realizada em microscópio invertido (Axio Observer D1, Zeiss) em aumento de 400x, segundo o método de Utermöhl (1956). O critério de contagem usado foi a curva de rarefação de espécies e 100 indivíduos do táxon mais abundante. A riqueza de espécies foi determinada com base no número total de táxons quantificados nas amostras. O biovolume algal foi determinado utilizando o biovolume médio das espécies descritas em Fonseca *et al.* (2014) ou estimado de acordo Hillebrand *et al.* (1999). Foram consideradas espécies descritoras aquelas com biovolume superior a 10% e densidade acima de 10% do total. As respostas do fitoplâncton também foram analisadas através da concentração de clorofila-*a* (corrigida de feofitina), a qual foi extraída com etanol (90%) conforme Sartory & Grobblelar (1984). A clorofila-*a* foi usada como medida de biomassa, juntamente com o biovolume.

2.6 Epipélton

Os efeitos do biorreator de perifíton sobre o epipélton foram avaliados através da análise da concentração de clorofila-*a* (corrigida de feofitina), a qual foi extraída com etanol (90%) conforme Sartory & Grobblelar (1984) e pela massa-seca-livre-de-cinzas (MSLC) (APHA 2005).

2.7 Tratamento dos dados

Para detecção de diferenças significativas das variáveis abióticas e biológicas entre tratamentos e tempo, realizou-se análise de variância de medidas repetidas de dois fatores (RM-ANOVA two - way). Para detecção de diferenças significativas dos atributos do perifíton entre os dias de experimento, realizou-se análise de variância (ANOVA one - way). Para comparação múltipla de médias e determinação da diferença mínima significativa entre tratamentos foi aplicado o Teste de Tukey ($\alpha = 0.05$). Os dados foram

logaritimizados sempre que necessário para garantir o cumprimento das premissas das análises (normalidade dos dados e homogeneidade de variância).

Para análise conjunta dos dados abióticos foi realizada a análise de componentes principais (PCA), a qual foi realizada com matriz de covariância e dados logaritimizados no PCORD versão 6.0 (McCune & Mefford 2011).

Análise multivariada permutacional de variância de dois fatores (PERMANOVA) foi aplicada para detecção de diferenças na estrutura do fitoplâncton entre tratamentos. Esta análise foi realizada utilizando o índice de Bray-Curtis como medida de distância com 9999 permutações (PAST 3.25: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

3. Resultados

3.1 Biorreator de Perifíton

A concentração de clorofila-*a* do biorreator de perifíton aumentou durante o período experimental, sendo que os maiores valores foram encontrados no 12º dia de experimento (Figura 3A). O mesmo resultado foi observado com a MSLC do biorreator de perifíton (Figura 3B). Apesar da redução da área disponível para colonização devido à retirada de lâminas para amostragem do perifíton, verificou-se efeito negativo do biorreator sobre a biomassa do fitoplâncton (Figura 3C). O conteúdo de TP no perifíton foi de 109,69 µg/g MS (Dp = 48,69; n = 6) e 87,96 µg/g MS (Dp = 66,88, n = 6) no dia 6 e 12 do período experimental, respectivamente. Após o término do experimento, os biorreatores remanescentes permaneceram nos mesocosmos e verificou-se que o conteúdo de P do perifíton diminuiu com 15 dias de colonização.

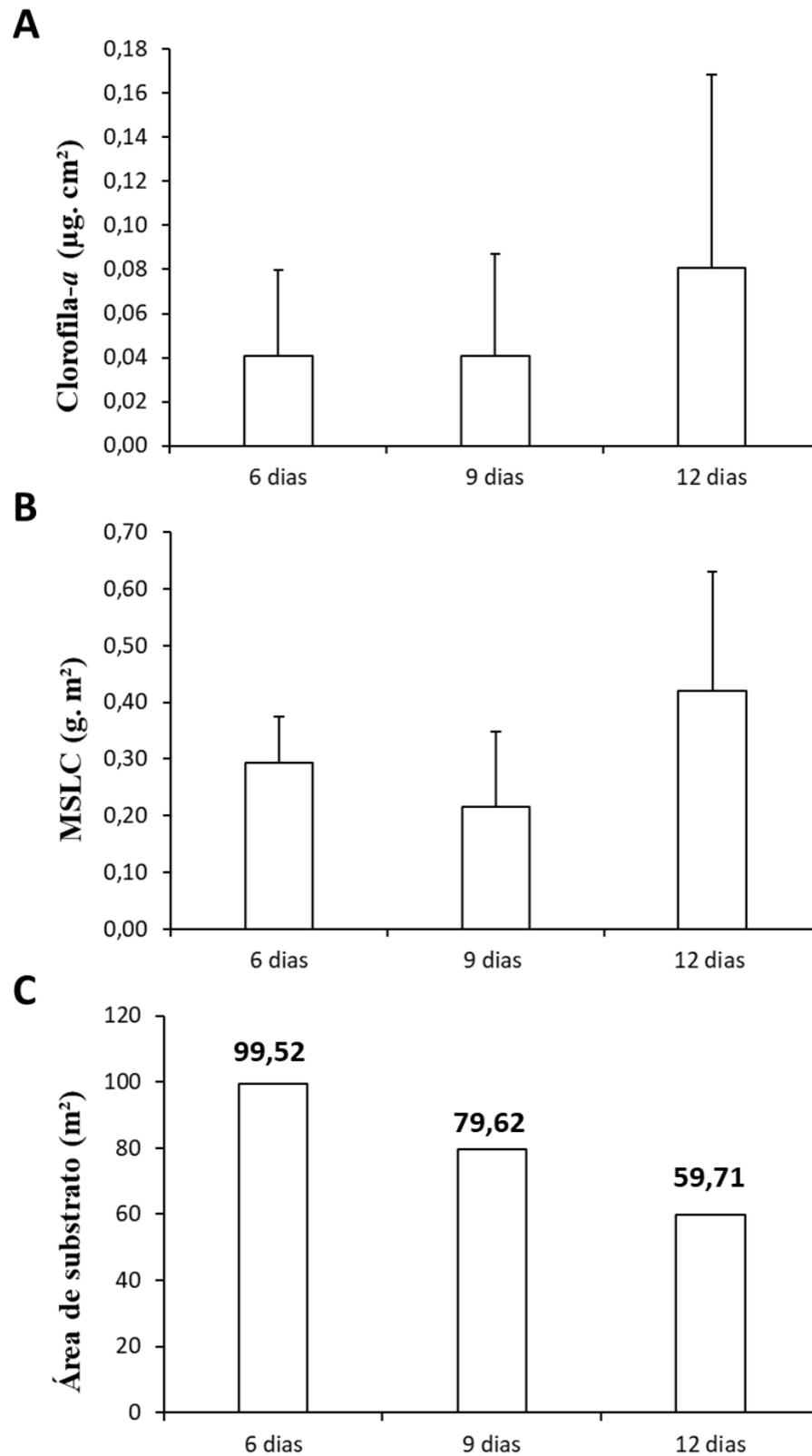


Figura 3. Clorofila-*a* (A), massa-seca-livre-de-cinzas (B) e área de substrato disponível no biorreator para a colonização do perifíton (C) no tratamento com perifíton ($n = 3$; BP).

3.2 Variáveis físicas e químicas da água

Nenhuma das variáveis abióticas analisadas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Interação entre tempo e tratamento foi detectada apenas na concentração N-NH₄ (RM-ANOVA: $F=4,68$, $p=0,05$). As seguintes variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre os dias de experimento (RM ANOVA - fator tempo): PT ($F=45,743$ $p<0,001$); PDT ($F=10,374$ $p=0,006$); NT ($F=60,131$ $p<0,001$); N-NH₄ ($F=23,638$ $p<0,001$); pH ($F=14,171$ $p=0,002$); condutividade ($F=14,776$ $p=0,002$); OD ($F=44,836$ $p<0,001$); temperatura ($F=624,271$ $p<0,001$); TDS ($F=17,636$ $p=0,001$); alcalinidade ($F=39,637$ $p<0,001$); atenuação da luz ($F=9,074$ $p=0,009$); disponibilidade de luz à 25 cm ($F=7,437$ $p=0,015$) e à 50 cm ($F=13,89$ $p=0,002$).

3.3. Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais resumiu 87,14% da variabilidade dos dados abióticos nos dois primeiros eixos (Figura 4). A PCA mostrou que as condições limnológicas pretendidas com os tratamentos foram atingidas durante o período experimental. O eixo 1 ordenou as unidades amostrais em tratamentos, enquanto o eixo 2, em virtude da variância temporal. O tratamento com biorreator de perifíton (BP) foi ordenado do lado positivo do eixo 1. O Controle permaneceu no lado negativo desse mesmo eixo, correlacionado com os maiores valores de nitrogênio inorgânico dissolvido (NID), sólidos totais dissolvidos (TDS) e condutividade. No eixo 2, as unidades amostrais do 6º dia ficaram ordenadas no lado positivo, enquanto os tratamentos do 9º e 12º dia no lado negativo.

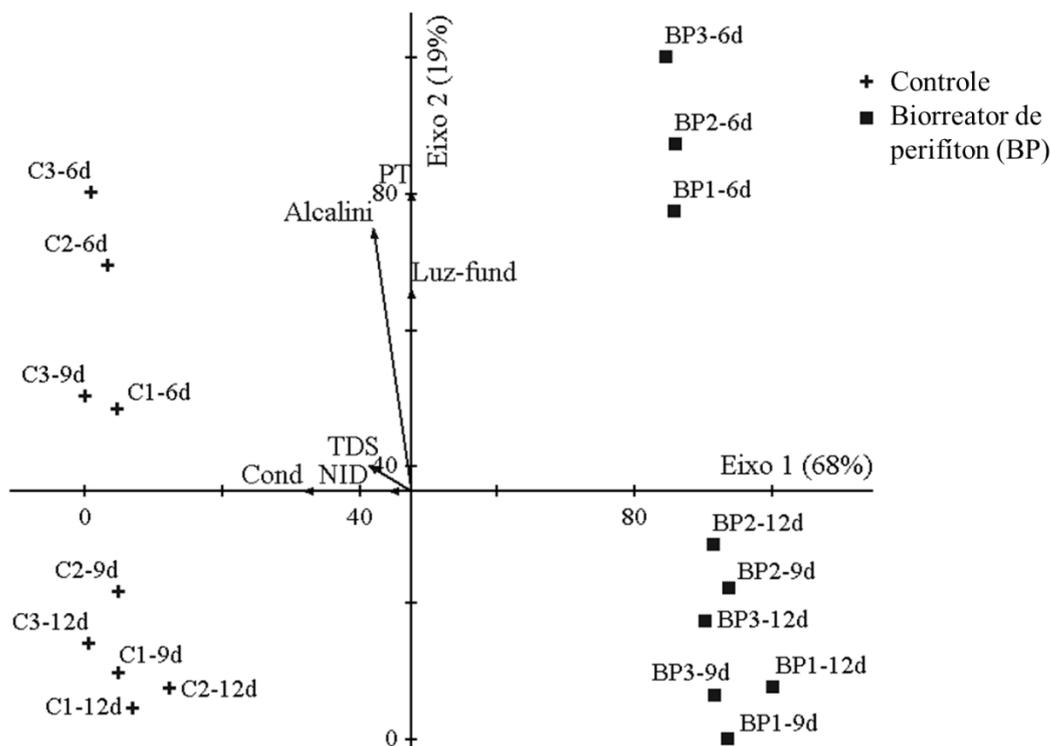


Figura 4. PCA dos dados abióticos dos tratamentos em réplicas durante o período experimental. Unidades amostrais: a primeira letra representa o tratamento, o número representa a réplica e números depois do traço indicam o dia de amostragem. Vetores: TDS - sólidos totais dissolvidos, NID – nitrogênio inorgânico dissolvido, Luz-fund – luz do fundo do mesocosmo, PT - fósforo total, Cond - condutividade elétrica, Alcalini - alcalinidade.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão das variáveis limnológicas (n=3) nos tratamentos do experimento. Resultados da RM-ANOVA dois fatores para os fatores tratamento, tempo e interação entre fatores. Abreviações: ns – não significativo, p<0,05 e p<0,001 – significativo, x – não atende as premissas da ANOVA.

	6º dia		9º dia		12º dia		RM-Anova 2-fatores					
	C	BP	C	BP	C	BP	Tratamento		Tempo		Interação	
							F	P	F	P	F	P
Temperatura (°C)	18,73 (±0,25)	18,54 (±0,40)	17,89 (±0,03)	17,89 (±0,02)	15,04 (±0,31)	14,89 (±0,16)	ns	ns	1185,26	<0,001	ns	ns
CO ₂ Livre (mg. L ⁻¹)	29,63 (±44,16)	70,48 (±59,52)	27,43 (±33,65)	362,81 (±396,96)	6,11 (±4,51)	10,72 (±8,69)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Alcalinidade	0,76 (±0)	0,77 (±0)	0,74 (±0)	0,76 (±0)	0,83 (±0)	0,85 (±0)	ns	ns	39,64	<0,001	ns	ns
pH	6,89 (±0,79)	6,29 (±0,66)	6,73 (±0,53)	5,80 (±0,93)	7,27 (±0,29)	7,07 (±0,39)	ns	ns	8,38	<0,05	ns	ns
Condutividade (µS. cm ⁻¹)	228,67 (±3,06)	229,33 (±3,06)	227,00 (±4,58)	228,33 (±3,51)	231,00 (±6,08)	234,33 (±4,73)	ns	ns	16,98	<0,05	ns	ns
OD (mg. L ⁻¹)	10,20 (±0,12)	11,09 (±0,81)	6,36 (±1,00)	6,68 (±2,15)	4,60 (±0,99)	2,91 (±0,95)	ns	ns	56,44	<0,001	ns	ns
NID (µg. L ⁻¹)	363,06 (±92,20)	356,23 (±84,48)	413,18 (±108,15)	320,42 (±78,92)	380,04 (±72,69)	410,03 (±106,69)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NT (µg. L ⁻¹)	7699,23 (±1891,45)	7689,69 (±1023,20)	4259,42 (±849,34)	2101,49 (±533,55)	3524,20 (±20,67)	3046,78 (±248,18)	ns	ns	60,13	<0,001	ns	ns
P-PO ₄ (µg. L ⁻¹)	<4,0	<4,00	<4,0	<4,0	<4,0	<4,0	x	x	x	x	x	x
PDT (µg. L ⁻¹)	25,83 (±1,51)	27,06 (±6,11)	21,46 (±6,14)	22,05 (±4,78)	15,67 (±0,84)	17,64 (±3,61)	ns	ns	10,37	<0,05	ns	ns
PT (µg. L ⁻¹)	205,94 (±40,67)	257,26 (±29,11)	126,43 (±60,12)	100,95 (±8,24)	101,26 (±11,99)	101,31 (±5,86)	ns	ns	45,74	<0,001	ns	ns
Luz (%)	80,80 (±4,98)	82,10 (±6,06)	59,65 (±5,11)	46,35 (±29,03)	80,91 (±11,06)	77,17 (±8,76)	ns	ns	9,07	<0,05	ns	ns
Atenuação de luz (k)	5,58 (±0,94)	5,88 (±1,27)	3,04 (±0,41)	2,40 (±1,80)	6,11 (±2,68)	5,07 (±1,19)	ns	ns	8,56	<0,05	ns	ns

3.4 Fitoplâncton

A clorofila-*a* do fitoplâncton diminuiu ao longo do período experimental em ambos os tratamentos, mas foi sempre menor na presença do biorreator de perifíton (tratamento BP – Figura 5A). A clorofila-*a* do fitoplâncton apresentou diferenças significativas entre tratamentos (RM-ANOVA: $F= 8,30$; $p = 0,001$) e o tempo (RM-ANOVA: $F= 8,39$; $p = 0,001$), mas a interação entre os fatores não foi significativa.

A densidade total do fitoplâncton foi maior no Controle do que no tratamento BP no período experimental (Figura 5B). RM-ANOVA não detectou diferenças significativas na densidade total do fitoplâncton entre os tratamentos.

A riqueza de espécies foi maior no controle do que no tratamento BP em todo o experimento (Figura 5C). Houve diferença significativa na riqueza de espécies entre tratamentos (RM ANOVA: $F = 11,7$; $p = 0,027$).

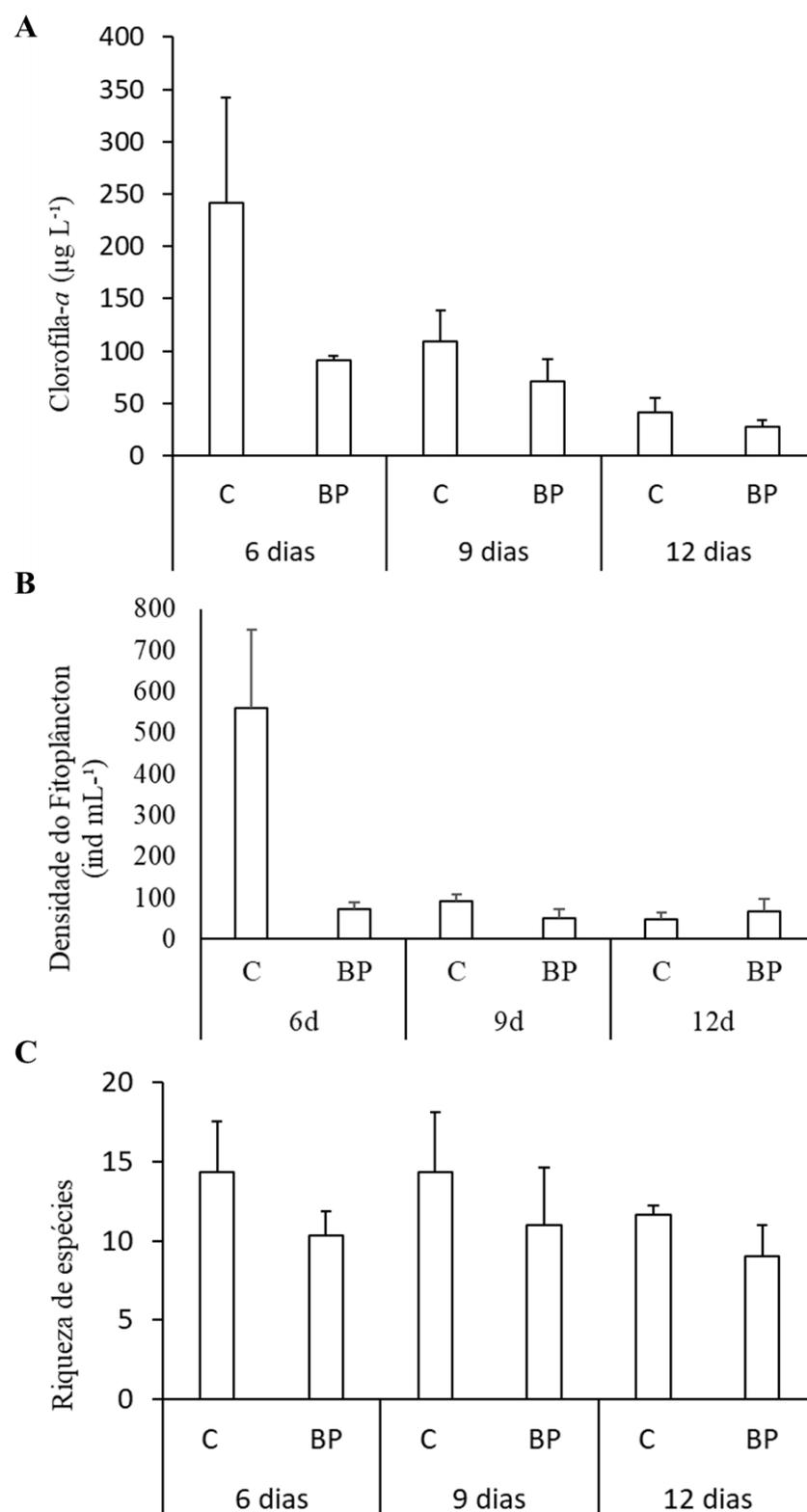


Figura 5. Variação da concentração de clorofila-*a* (A), densidade total (B) e riqueza de espécies (C) do fitoplâncton ($n=3$) no controle e tratamento com biorreator de perifíton (BP) durante o experimento.

Em relação a estrutura do fitoplâncton, verificou-se que *Synechocystis aquatilis* (Sauvageau 1892) foi a espécie com maior densidade no Controle e tratamento BP no período experimental (Figura 6). No entanto, a densidade dessa espécie de cianobactéria foi menor no 6º e 9º dia de experimento na presença do biorreator de perifíton (tratamento BP). A cianobactéria *Pseudanabaena galeata* (Böcher 1949) foi uma espécie abundante em todos os tratamentos durante o experimento, mas apresentou uma densidade menor no BP em comparação ao Controle no 9º e 12 dia. O mesmo resultado foi observado para *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska (Aguilera & al 2018)).

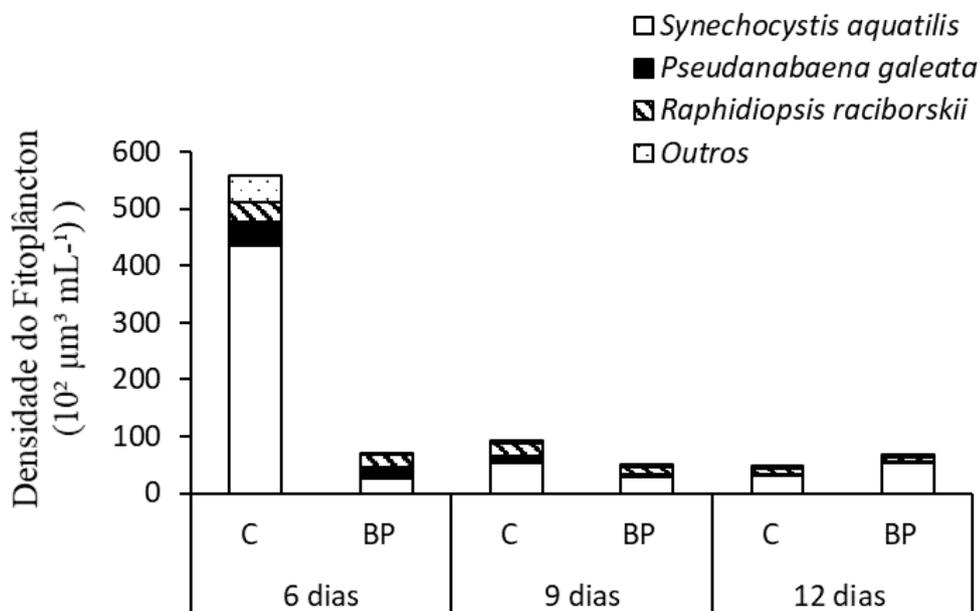


Figura 6. Densidade das espécies descritoras do fitoplâncton (n=3;) no controle (C) e tratamento com biorreator de perifíton (BP) durante o experimento.

Em contrapartida, verificou-se que *Raphidiopsis raciborskii* apresentou o maior biovolume algal em ambos os tratamentos durante todo o período experimental, mas foi menor na presença do biorreator de perifíton (tratamento BP) no 9º e 12º dia de experimento (Figura 7). O mesmo foi observado para a cianobactéria *Pseudanabaena galeata*. O biovolume de *Synechocystis aquatilis* foi menor na presença do biorreator de

perifíton (BP) no início do experimento (6 e 9 dias). De maneira geral, o biovolume das algas do fitoplâncton foi menor na presença do biorreator de perifíton (BP) no 9º e 12º dia de experimento.

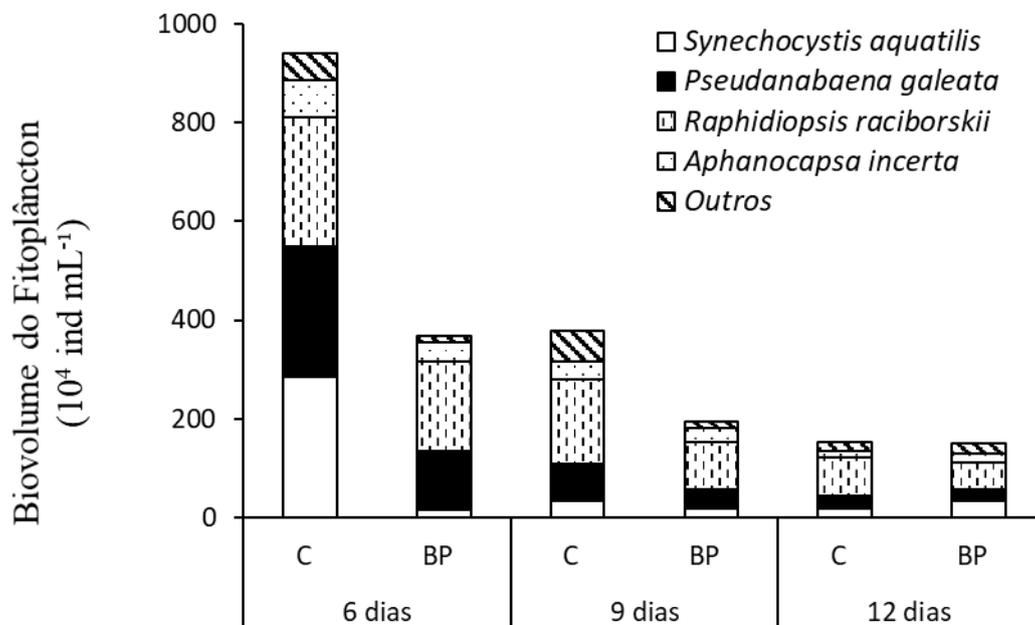


Figura 7. Biovolume das espécies descritoras do fitoplâncton (n=3) no controle (C) e tratamento com biorreator de perifíton (BP) durante o experimento.

3.5 Epipélton

As concentrações de clorofila-*a* do epipélton foram maiores no controle do que no BP em todos os dias de amostragem. A clorofila-*a* do epipélton foi diferente apenas entre os dias experimentais (RM-ANOVA: $F= 4,09$; $p = 0,018$), mas a interação entre os fatores tempo e tratamento foi significativa (RM-ANOVA: $F= 3,36$; $p = 0,035$). A MSLC do epipélton foi maior na presença do biorreator de perifíton apenas no 9º dia de período experimental (figura 8). No entanto, não houve diferenças significativas entre tratamentos, tempo e interação entre os dois fatores.

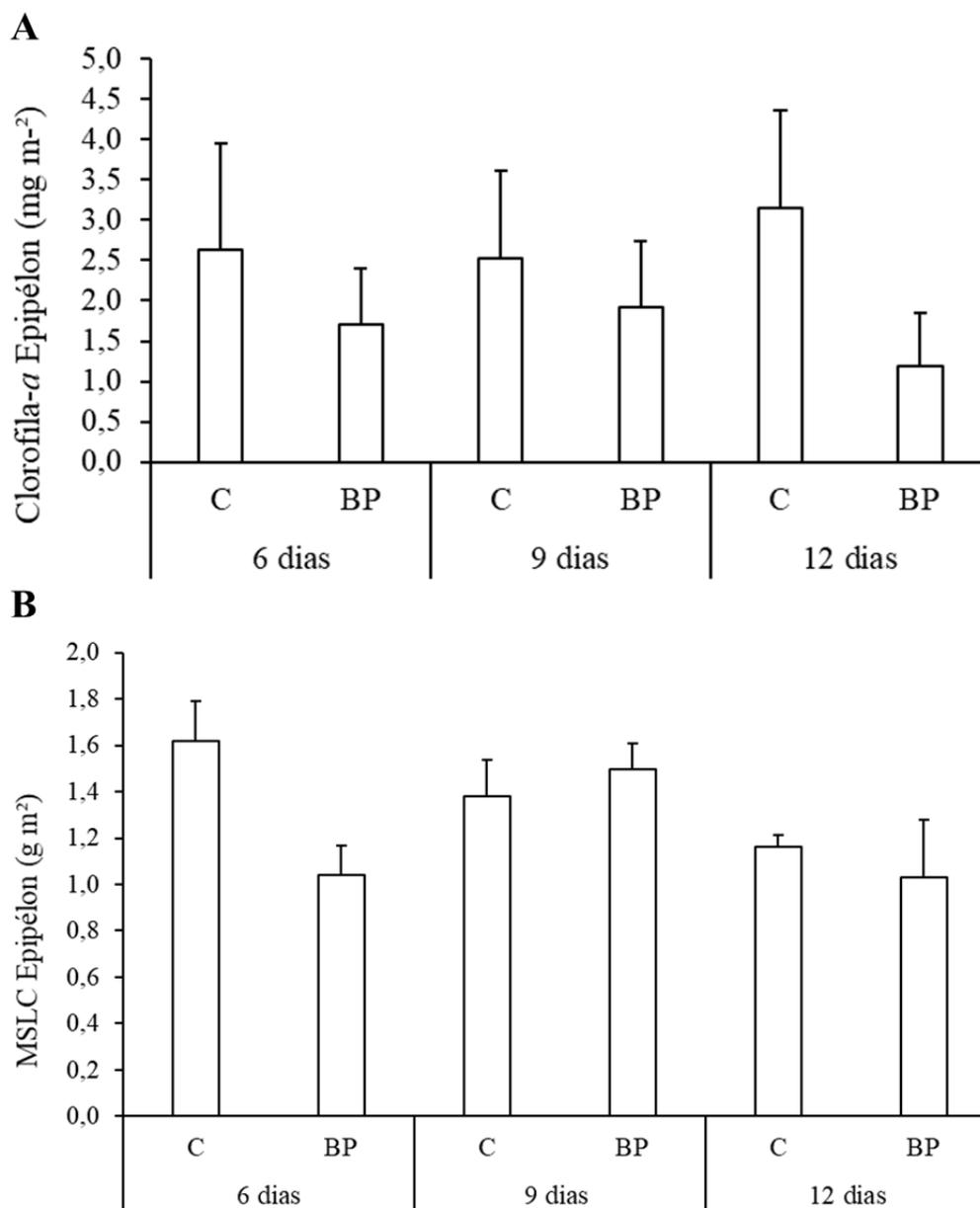


Figura 8. Concentração de clorofila-*a* (A) e MSLC (B) (n=3) do epipélon no sedimento superficial no controle (C) e tratamento com biorreator de perifíton (BP) durante o período experimental.

Discussão

Os resultados mostraram que a presença do biorreator de perifíton reduziu a disponibilidade de P-PO₄ na água e promoveu mudanças na estrutura e biomassa do fitoplâncton em curto intervalo de tempo. A clorofila-*a*, densidade total e biovolume do fitoplâncton foram menores no tratamento com biorreator de perifíton quando comparado ao Controle na maioria dos dias do período experimental. Assim, a presença do biorreator de perifíton influenciou negativamente o fitoplâncton, reduzindo significativamente a sua biomassa. Este resultado tem grande importância para o controle das florações de algas, como reportado em outros estudos (Wu *et al.* 2013; Cui *et al.* 2017; Ko *et al.* 2019), incluindo um estudo observacional no reservatório estudado (Mendes-Souza & Ferragut 2021).

Com relação a estrutura, embora sem diferença significativa, evidenciou-se que a riqueza de espécies do fitoplâncton foi menor no tratamento com biorreator de perifíton (BP) quando comparado ao controle. Em ambientes eutrofizados, o estresse químico gerado pela diluição dos nutrientes pode aumentar a competição por recursos e não favorecer espécies já adaptadas às condições eutróficas, o que pode causar a redução da riqueza e aumento na uniformidade da comunidade (Crossetti *et al.* 2005; Verbeek *et al.* 2018). Portanto, a redução na disponibilidade de fósforo da água causada pela presença do biorreator do perifíton pode promover perda de espécies adaptadas à condição eutrófica, sugerindo mudanças na estrutura do fitoplâncton.

Apesar da redução da densidade e biovolume do fitoplâncton, não houve mudança qualitativa na estrutura do fitoplâncton. Constatou-se a dominância de *Synechocystis aquatilis* e abundância de *Pseudanabaena galeata* e *Raphidiopsis raciborskii* em todos os tratamentos durante o experimento. *Pseudanabaena galeata* é uma espécie comum em lagos e reservatórios, sendo responsável por muitos casos de intoxicação humana no

Brasil, através da ingestão de água contaminada com cianotoxinas produzidas por essas cianobactérias (Rangel *et al.* 2014). *Raphidiopsis raciborskii* é uma espécie de cianobactéria amplamente estudada pela sua capacidade de invasão, produção de toxinas e de substâncias alelopáticas (Antunes *et al.* 2015). Estudo de longa duração reportou a elevada biomassa e florações frequentes de *R. raciborskii* no reservatório estudado até 2014, quando foi substituído por *Ceratium furcoides* (Crossetti *et al.* 2018). Esta cianobactéria possui alta capacidade de rápida absorção de fósforo mesmo em baixa disponibilidade, além da capacidade de fixação de nitrogênio (Padisák 1997), sendo associada à baixa disponibilidade de P no reservatório estudado (Tucci & Santana 2003). Estudo experimental mostrou que *C. raciborskii* teve sucesso em situação de estresse nutricional (Crossetti & Bicudo 2005). Portanto, a presença do biorreator de perifíton (BP) reduziu a densidade e o biovolume de três espécies de cianobactérias bastante adaptadas à condição eutrófica, o que pode ser um indicativo do processo de biorremediação.

Um dos principais problemas para o controle da eutrofização é a fertilização interna decorrente da condição anóxica na superfície do sedimento (Søndergaard *et al.* 2013), onde o crescimento do epipélton pode favorecer a retenção de P (Doods 2003). Dessa forma, o desenvolvimento do epipélton é um aspecto importante do processo de biorremediação de ambientes eutrofizados. Embora a clorofila-*a* do epipélton tenha sido maior no Controle em comparação ao BP, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A MSLC foi maior na presença do biorreator de perifíton no início do processo de colonização (9 dias).

Evidenciou-se que a presença do biorreator de perifíton influenciou negativamente a biomassa do fitoplâncton e alterou a estrutura da comunidade, reduzindo a densidade e biovolume de cianobactérias em curto intervalo de tempo. Como reportado

em outros estudos, a utilização de biorreatores de perifíton para remoção de P em ambientes eutrofizados contribui com a redução das florações de algas e cianobactérias do fitoplâncton (Wu *et al.* 2018; Ko *et al.* 2019). A redução da disponibilidade de P no ambiente, a competição por recursos e a produção de substâncias alelopáticas fazem com que a comunidade perifítica seja uma ferramenta em potencial para a restauração de lagos e reservatórios rasos enriquecidos (Santos & Calijuri 1997; Wu *et al.* 2010). Com base nos resultados encontrados, conclui-se que a remoção de P da água pelo biorreator de perifíton reduziu a floração do fitoplâncton, evidenciando seu potencial biorremediador do processo de eutrofização.

Ressalta-se que, apesar do sucesso do perifíton na biorremediação de ambientes eutrofizados, mais estudos são necessários, principalmente em relação à periodicidade do manejo e eficiência na remoção do P *versus* biomassa acumulada, pois, como evidenciado por Zhao *et al.* (2019), o pico de biomassa algal pode resultar no desprendimento do perifíton e promover o retorno do P ao sistema. Além disso, é fundamental determinar o período do ano mais favorável ao desenvolvimento do biorreator de perifíton, pois períodos de intensa floração podem não favorecer a eficiência do biorreator devido ao forte sombreamento da floração do fitoplâncton.

Os dados obtidos na presente pesquisa serão utilizados para gerar um novo estudo, onde pretende-se avaliar qual a profundidade e tempo de colonização em que o biorreator de perifíton é mais eficiente na remoção de P da água.

Capítulo II: O uso do biorreator de perifíton na manutenção da oligotrofização em ambientes restaurados: experimento em mesocosmos

Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da presença do biorreator de perifíton para na manutenção da oligotrofização em ecossistemas restaurados. Para simular o processo de oligotrofização, realizou-se um experimento de diluição em mesocosmos de fundo aberto *in situ* na região litorânea de um reservatório eutrófico e com florações frequentes do fitoplâncton. Retirou-se 50% da água eutrófica dos mesocosmos com uma bomba de sucção de baixa pressão (2000 L/H). O experimento consistiu em dois tratamentos em tréplicas: D – tratamento diluído (50%) sem o biorreator de perifíton; DP – tratamento diluído (50%) com biorreator de perifíton. Foram realizadas amostragens nos dias 6, 9, 12, 15 e 20 do período experimental. As espécies mais abundantes do fitoplâncton durante todo o experimento foram as cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii*, *Synechocystis aquatilis* e *Pseudanabaena galeata*. A presença do biorreator de perifíton não alterou qualitativamente as espécies descritoras do fitoplâncton, mas a composição e biomassa das espécies mudaram. A clorofila-*a* do epipélton foi maior na presença do biorreator de perifíton do que na ausência. Como o biorreator de perifíton removeu P da água e estocou na matriz, os resultados sugerem que essa remoção pode ter favorecido a manutenção da oligotrofização. Conclui-se que o biorreator de perifíton pode ser usado como uma ferramenta para auxiliar na manutenção de lagos e reservatórios restaurados.

Palavras-chave: biofilme, restauração, remoção de nutrientes

1. Introdução

A eutrofização é o impacto ambiental que mais afeta os ecossistemas aquáticos em nível mundial (Costa *et al.* 2018; Le Moal *et al.* 2019). A oligotrofização é uma das metas para reverter a eutrofização de ecossistemas aquáticos. Uma vez que reverter a eutrofização é um desafio mundial, diversos métodos têm sido desenvolvidos na tentativa de diminuir a concentração de nutrientes, principalmente fósforo (P) e nitrogênio (N), e controlar as florações do fitoplâncton em ambientes eutrofizados (de-Bashan & Bashan 2004; Wu *et al.* 2005). Dentre os métodos biológicos, podemos citar a aplicação de biorreatores de perifíton para a remoção de P da água (Wu *et al.* 2010; 2011, Lu *et al.* 2014; Gao *et al.* 2019). O perifíton constitui-se de uma assembleia de microrganismos (algas, bactérias, animais e fungos), que se desenvolve sobre substratos submersos (Wetzel 1981). Durante o desenvolvimento, o perifíton absorve e adsorve concentrações significativas de nutrientes e outras substâncias, como o P (Dodds 2003; Yi 2019). O perifíton pode remover o P da água, tornando-o indisponível para o fitoplâncton através da assimilação deste nutriente pelas algas e outros microrganismos (Wu *et al.* 2018) e pela adsorção na matriz de polissacarídeos (EPS, substância polimérica extracelular) (Lu *et al.* 2014). Além disso o perifíton pode criar condições bioquímicas que favorecem a deposição e permanência do P na comunidade (Dodds 2003; Lu *et al.* 2016). No caso do epipélton, por exemplo, quando a comunidade se encontra fotossinteticamente ativa, há produção de oxigênio, que pode resultar em supersaturação, elevando o pH do sedimento e favorecendo a precipitação e co-precipitação de fosfato com íons de metais (Dodds 2003). Diversos estudos abordam a capacidade e a eficiência do perifíton na remoção de P em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2013; Gao *et al.* 2019; Ko *et al.* 2019) e no tratamento de águas residuais (Basílico *et al.* 2016).

Embora vários métodos de biorremediação de ambientes eutrofizados que levam à oligotrofização tenham sido aplicados, estudos mostram que a recarga interna de P é muito elevada e dificulta a recuperação dos ecossistemas eutrofizados (Søndergaard *et al.* 2013). Conforme Søndergaard *et al.* (2003), a biomanipulação para melhorar a qualidade da água, por exemplo, deve ser considerada após a redução do carregamento externo de fósforo, sendo indicado esperar alguns anos até que a influência da ciclagem interna deste nutriente diminua. Mudanças nas condições ambientais, como a anoxia, pode promover a liberação do P do sedimento para a coluna da água, aumentando a disponibilidade deste nutriente para o fitoplâncton, causando novas florações (Carlton & Wetzel 1988; Søndergaard *et al.* 2013). Como exemplo disso no Brasil, podemos citar o caso do Lago Paranoá, em Brasília, onde um estudo recente mostrou o aumento na biomassa de cianobactérias após um longo período de oligotrofização (Batista & Fonseca 2018). Considerando o problema da liberação do P estocado no sedimento de lagos eutróficos recuperados, estudos têm mostrado que o perifíton desenvolvido no sedimento, o epipélton, pode contribuir para a manutenção da oligotrofização (Jobsen *et al.* 2004; Liboriussen & Jeppesen 2006). A presença do epipélton cria condições bioquímicas que podem favorecer a permanência do P no sedimento, ou seja, minimizando a liberação do P para a coluna de água (Dodds 2003). Além da redução na disponibilidade de nutrientes na coluna de água, o aumento da biomassa do epipélton pode estimular a competição por P com o fitoplâncton (Wu *et al.* 2010). Assim, há evidências de sucesso do perifíton na retenção de P em ecossistemas, como nos Everglades da Flórida (McCormick *et al.* 2006), e em estudos experimentais (Gao *et al.* 2019; Amaral *et al.* 2020). Dessa forma, o biorreator de perifíton pode ser uma ferramenta promissora na manutenção de ecossistemas oligotrofizados a longo prazo.

O presente estudo avaliou experimentalmente os efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton na simulação da oligotrofização em um lago eutrófico e raso. Considerando a elevada biomassa de fitoplâncton no lago eutrófico estudado (Bicudo *et al.* 2020), a capacidade do perifíton de estocar o P (Dodds 2003; Jobgen *et al.* 2004; Lu *et al.* 2016) e o potencial da comunidade na biorremediação de ambientes eutrofizados (Wu *et al.* 2013; Ko *et al.* 2019), três hipóteses foram avaliadas. A primeira hipótese (**H1**) é de que, se o biorreator de perifíton remove P da água, então, o biorreator de perifíton pode afetar negativamente a abundância e biomassa do fitoplâncton, auxiliando na manutenção da oligotrofização. A segunda hipótese (**H2**) é que, se o biorreator de perifíton atua na remoção de P e compete com o fitoplâncton por recursos, então, após a oligotrofização, a presença do biorreator pode influenciar a composição de espécies da comunidade, reduzindo a biomassa do fitoplâncton. A nossa terceira hipótese (**H3**) é que, se o biorreator do perifíton remove P da água e a oligotrofização pode favorecer o crescimento do epipélton fototrófico (Amaral *et al.* 2020), então, após oligotrofização, a presença do biorreator de perifíton pode favorecer o aumento da biomassa fotossintética do epipélton, contribuindo para manutenção da oligotrofização. O presente experimento em mesocosmos contribui para o melhor entendimento do uso do biorreator de perifíton como uma ferramenta para manutenção de lagos e reservatórios rasos restaurados.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo

O experimento foi desenvolvido no Lago das Garças (Figura 1), que está situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) (23° 64' 75,0"S e 46° 62' 22,7"W), assim como descrito no Capítulo 1 da presente dissertação. Este reservatório foi escolhido

para realização do experimento por se tratar de um reservatório eutrófico com florações frequentes do fitoplâncton e apresentar dados limnológicos de estudos de longa duração (Bicudo *et al.* 2007; Crossetti *et al.* 2018; Bicudo *et al.* 2020).

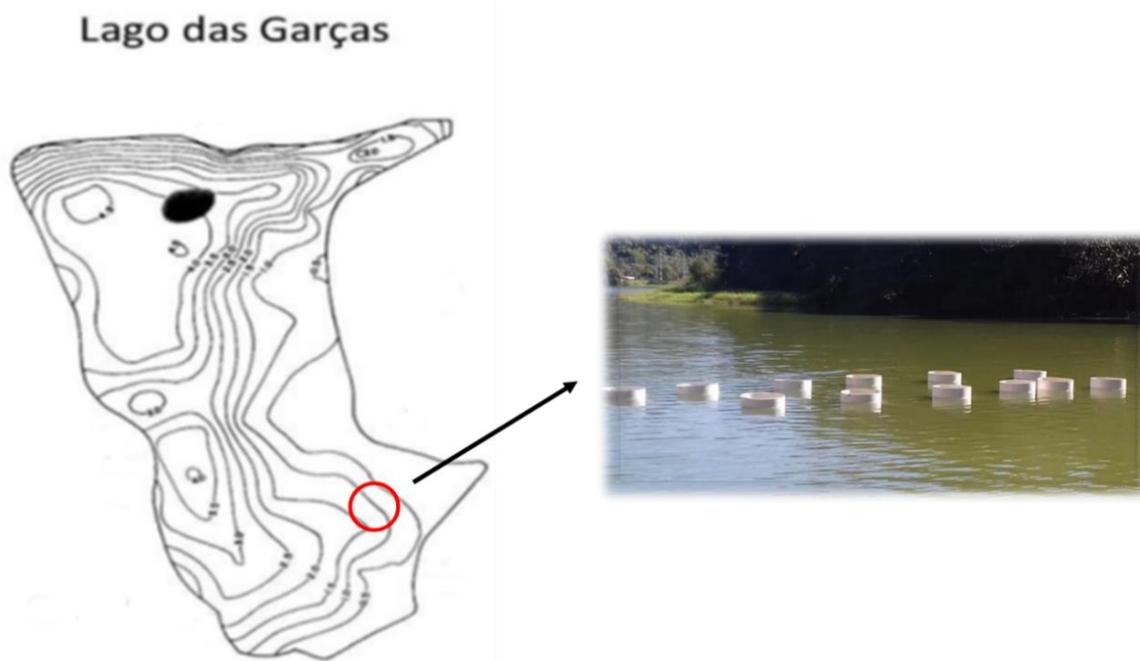


Figura 1. Mapa batimétrico do Lago das Garças com localização das unidades experimentais na zona litorânea. Fonte: Bicudo *et al.* (2002).

O clima regional é classificado como tropical de altitude, que predomina nos planaltos e montanhas do sudeste do Brasil (Conti & Furlan 2003). Durante o período experimental (23 de julho – 13 de agosto de 2019), a precipitação total acumulada foi de 3 mm e a temperatura média 17,5 °C (<http://www.estacao.iag.usp.br/boletim.php>).

2.2. Delineamento experimental

Os efeitos da presença do perifíton em substrato artificial, como biorreator para remoção do P, sobre o fitoplâncton e epipélton após a oligotrofização foi analisado em mesocosmos de fundo aberto. O experimento consistiu em dois tratamentos em réplicas

(n=3): D – Tratamento diluído (50%) e sem biorreator de perifíton; DP – Tratamento diluído (50%) com biorreator de perifíton. Os tratamentos foram aleatorizados em campo. O experimento foi realizado no período seco (23/julho a 13/agosto/2019) para minimizar os efeitos perturbatórios da chuva sobre o perifíton. Após 1 dia de aclimação (24/julho a 13/agosto), os substratos artificiais foram inseridos nos mesocosmos do tratamento DP para a formação dos biorreatores de perifíton.

As amostragens para determinação das variáveis abióticas, fitoplâncton, epipélton e do biorreator de perifíton foram realizadas nos 6º, 9º, 12º, 15º e 20º dia do período experimental. No Lago das Garças, os dias de amostragem foram determinados com base no processo de colonização e sucessão da comunidade de algas perifíticas, que atingiu o pico de biomassa entre 20 – 25 dias (Borduqui & Ferragut 2012).

Os mesocosmos utilizados constituem-se em cilindros de PVC com 0,5 m de diâmetro, 1,5 m de altura e volume médio de 160 litros. A profundidade média da coluna da água e o volume médio dos mesocosmos durante o período experimental foi de 79 cm e 156 litros, respectivamente. Os mesocosmos foram enterrados no sedimento do lago, de modo a integrar todas as comunidades algais, e foram dispostos em função da disponibilidade da luz.

Os mesocosmos de fundo aberto foram inseridos manualmente e cuidadosamente na coluna de água do lago, o que promoveu o enchimento completo. Para simular a oligotrofização, o volume de água do lago retirado dos mesocosmos dos tratamentos D e DP foi de 50%, que parece favorecer o desenvolvimento do epipélton (Amaral *et al.* 2020). A retirada da água do mesocosmo foi feita com bomba de sucção de baixa pressão (2000 L/H), sendo a mangueira inserida na superfície para evitar ressuspensão do sedimento. Após a retirada de 50% do volume total de água do mesocosmo, inseriu-se a água destilada de maneira cuidadosa, para evitar a ressuspensão do sedimento (Figura 2). Um

grupo Controle (n=3; sem diluição) foi utilizado durante o experimento para avaliar a eficiência da diluição realizada nos tratamentos, embora os dados dessas unidades amostrais não tenham sido considerados nas análises estatísticas (Tabela 3).

Para avaliar o biorreator de perifíton na remoção de P, substratos artificiais foram inseridos em cada mesocosmo do tratamento DP. As placas de vidro (25 x 10 cm) usadas como substratos foram colocados à 25 centímetros da superfície para evitar foto-inibição (Hill 1996) e próximo ao fundo do mesocosmo, onde a liberação de P é mais intensa em sistemas eutróficos (Correll 1999). Foram colocadas 10 placas de vidro na superfície e 10 no fundo em cada mesocosmo, totalizando 20 lâminas (99,52 m² de área de substrato). Os biorreatores foram suspensos em duas profundidades distintas para a remoção de P mais uniforme na coluna de água.

Em cada tratamento, a amostragem da água para análise das variáveis abióticas e do fitoplâncton foram coletadas manualmente na subsuperfície. Amostras de sedimento superficial (1 cm) para análise do epipélton foram coletadas através de tubos de PVC de 5 centímetros de diâmetro. Os tubos foram enterrados no sedimento até a parte consolidada e, posteriormente, retirados de maneira cuidadosa para evitar a mistura da amostra dentro do tubo coletor.

O perifíton foi amostrado para quantificar os efeitos do biorreator de perifíton sobre o fitoplâncton e epipélton. Na superfície e no fundo, as lâminas de vidro colonizadas foram retiradas cuidadosamente para evitar o desprendimento da comunidade. O material perifítico foi removido das placas de vidro através de raspagem com pincel e jatos de água destilada com volume conhecido. As amostras do perifíton do biorreator coletadas foram acondicionadas em frascos plásticos opacos, dispostas em caixas de coleta contendo gelo e levadas para o laboratório. No laboratório, as amostras do perifíton foram

diluídas com volume conhecido de água e divididas em alíquotas para as posteriores análises.

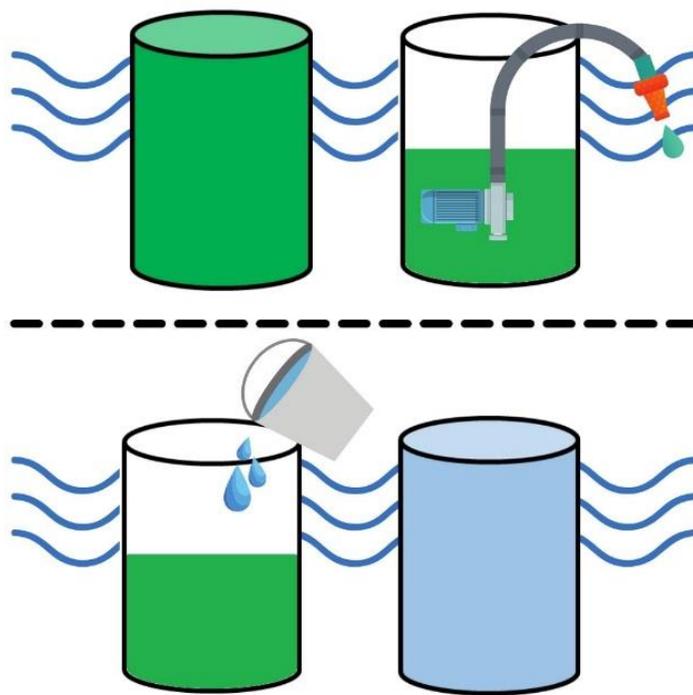


Figura 2. Esquema mostrando a diluição de 50% da água realizada em mesocosmos de fundo aberto durante experimento *in situ* na região litorânea do Lago das Garças.

2.3 Biorreator de Perifíton

A biomassa do biorreator de perifíton foi estimada pela concentração de clorofila-*a* (feofitina corrigida, Sartory & Grobblelar 1984) e pela massa seca livre de cinzas (MSLC) (APHA 2005). Para avaliar a quantidade de P estocado no perifíton ao longo do tempo, o conteúdo de P foi determinado por combustão a 550° C por 1 h, seguida pela oxidação em HCl 1N a 80° C por 30 min, conforme método descrito em Andersen (1976), modificado por Pompêo & Moschini-Carlos (2003). Posteriormente, o fósforo reativo solúvel foi determinado pelo método do ácido ascórbico (Strickland & Parsons, 1960).

2.4 Variáveis abióticas analisadas

As seguintes variáveis foram analisadas no experimento: oxigênio dissolvido (Golterman *et al.* 1978); alcalinidade (Golterman & Clymo 1971); formas de carbono inorgânico dissolvido (CO₂ livre e bicarbonato; Golterman & Clymo 1971), material particulado em suspensão (APHA 2005), nitrito e nitrato (Mackereth *et al.* 1978), nitrogênio amoniacal (Solorzano 1969), ortofosfato e fósforo total dissolvido (Strickland & Parsons 1960), nitrogênio total e fósforo total (Valderrama 1981). As amostras para a fração dissolvida dos nutrientes foram filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/F).

As seguintes variáveis limnológicas foram medidas *in situ*: temperatura, condutividade elétrica, pH (sonda multiparâmetros – Horiba U53) e radiação subaquática (luxímetro Li-Cor LI250A). A porcentagem de luz incidente foi calculada conforme Birge (1915): % de luz = $100 \times (i_1 - i_2) / i_1$, onde: i_1 é a quantidade de luz na subsuperfície e i_2 do fundo.

2.5. Fitoplâncton

Para avaliar os efeitos do biorreator de perifíton sobre a estrutura taxonômica do fitoplâncton, amostras de água foram fixadas com formalina 4% e analisadas ao microscópio óptico (Zeiss Axioscop). A identificação taxonômica das algas foi feita com base em publicações regionais (Castro *et al.* 1991; Sormus & Bicudo 1994; Tucci *et al.* Azevedo 2006). As amostras para análise quantitativa foram preservadas em lugol acético e mantidas no escuro até o momento da análise. A contagem das algas foi realizada em microscópio invertido (Axio Observer D1, Zeiss,) em aumento de 400x, segundo o método de Utermöhl (1956). O critério de contagem usado foi a curva de rarefação de espécies e 100 indivíduos do táxon mais abundante. A riqueza de espécies foi determinada

com base no número total de táxons quantificados nas amostras. O biovolume algal foi determinado utilizando o biovolume médio das espécies descritas em Fonseca *et al.* (2014). O biovolume das espécies ausentes na lista foi estimado de acordo Hillebrand *et al.* (1999). Foram consideradas espécies descritoras aquelas com biovolume superior a 10% e densidade acima de 10% do total.

Além das mudanças na estrutura, as respostas do fitoplâncton foram analisadas através da concentração de clorofila-*a* (corrigida de feofitina), a qual foi extraída com etanol (90%) conforme Sartory & Grobblelar (1984).

2.6. Epipélton

Os efeitos do biorreator de perifíton sobre o epipélton foram avaliados através da análise da concentração de clorofila-*a* (corrigida de feofitina), a qual foi extraída com etanol (90%) conforme Sartory & Grobblelar (1984) e pela massa-seca-livre-de-cinzas (MSLC) (APHA 2005).

2.7. Tratamento dos dados

Para detecção de diferenças significativas das variáveis abióticas e biológicas entre tratamentos e tempo, realizou-se análise de variância de medidas repetidas de dois fatores (RM-ANOVA two - way). Para comparação múltipla de médias e determinação da diferença mínima significante entre tratamentos foi aplicado o Teste de Tukey ($\alpha < 0,05$). Os dados foram logaritimizados sempre que necessário para garantir o cumprimento das premissas das análises (normalidade dos dados e homogeneidade de variância).

Análise multivariada permutacional de variância de dois fatores (PERMANOVA) foi aplicada para detecção de diferenças na estrutura do fitoplâncton entre tratamentos e

dias de amostragem. Esta análise foi realizada utilizando o índice de Bray-Curtis como medida de distância com 9999 permutações (PAST 3.25: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

3. Resultados

3.1. Perifíton (Biorreator)

A concentração de clorofila-*a* e MSLC do biorreator de perifíton foram maiores no 12º dia de período experimental (Figura 3A e B, respectivamente). Não houve diferenças significativas entre os dias experimentais (fator tempo) para o biorreator de perifíton (tratamento DP). O biorreator de perifíton acumulou P durante todo período experimental, mas o conteúdo médio de TP foi maior no início do experimento do que no final (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo médio e desvio padrão do fósforo total no perifíton (n=3).

	mg P g ⁻¹ MS	Desvio Padrão
6d	0,65	0,94
12d	0,77	0,78
15d	0,19	0,14
20d	0,19	0,05

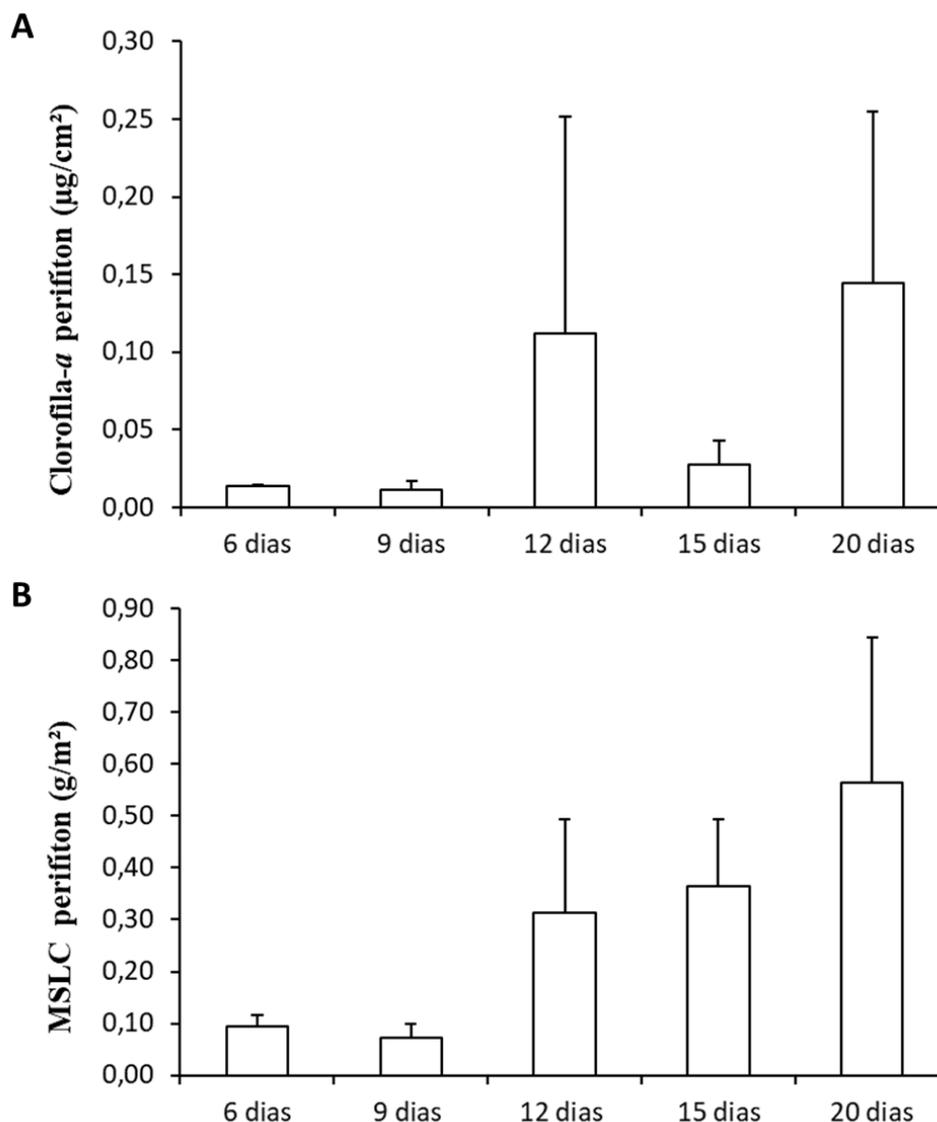


Figura 3. Concentração de clorofila-*a* (A) e massa-seca-livre-de-cinzas (B) do biorreator de perifíton no tratamento diluído com perifíton (n=3; tratamento DP).

3.2 Variáveis abióticas da água

Nenhuma das variáveis abióticas analisadas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Interação entre os fatores tempo e tratamento foi detectada apenas na concentração de NT (RM-ANOVA: $F = 5,50$, $p = 0.03$). As seguintes variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre os dias de experimento (RM ANOVA - fator tempo): PT ($F = 13,528$, $p < 0,001$); PDT ($F = 9,275$, $p < 0,001$); NT

($F= 9,275$ $p = <0,001$); $N-NO_3$ ($F= 33,484$ $p = <0,001$); pH ($F= 12,323$ $p = <0,001$); condutividade ($F= 19,265$ $p = <0,001$); OD ($F= 5,403$ $p = 0,006$); temperatura ($F= 388,935$ $p = <0,001$); TDS ($F= 43,378$ $p = <0,001$); CO_2 ($F= 13,193$ $p = <0,001$); alcalinidade ($F= 55,075$ $p = <0,001$); atenuação da luz ($F= 6,319$ $p = 0,003$). A oligotrofização da água eutrófica do lago acarretou mudanças nas condições ambientais, particularmente em relação à disponibilidade de nutrientes (Tabelas 2-3).

Tabela 2. Valor de média e desvio padrão das variáveis abióticas nos tratamentos no período experimental.

	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias	20 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias	20 dias
Alcalinidade (mEq L ⁻¹)	0,45 (±0,03)	0,50 (±0,05)	0,43 (±0,04)	0,48 (±0,07)	0,50 (±0,02)	0,59 (±0,07)	0,63 (±0,03)	0,69 (±0,13)	0,76 (±0,02)	0,80 (±0)
Condutividade (uS cm ⁻²)	130,00 (±6,38)	141,00 (±10,8)	127,67 (±9,1)	140,67 (±15,11)	136,00 (±9,2)	152,67 (±15,43)	146,33 (±14,38)	156,67 (±27,15)	158,00 (±20,7)	185,33 (±24,73)
CO ₂ livre (mg L ⁻¹)	48,43 (±29,35)	49,68 (±34,78)	144,12 (±99,18)	57,91 (±49,46)	2,72 (±1,89)	5,12 (±2,88)	15,93 (±18,6)	7,53 (±3,55)	41,57 (±7,94)	39,80 (±10,65)
Luz (%)	78,93 (±7,38)	69,75 (±11,47)	46,37 (±8,8)	58,37 (±4,15)	60,28 (±13,5)	66,27 (±12,55)	73,22 (±9,76)	75,72 (±1,73)	85,13 (±2,27)	77,85 (±10,53)
Luz à 25 cm (μmol m ⁻² s ⁻¹)	175,39 (±62,85)	112,17 (±35,19)	37,35 (±16,95)	35,34 (±11,85)	292,67 (±160,56)	298,59 (±167,82)	396,47 (±151,32)	350,73 (±102,8)	59,38 (±26,46)	64,08 (±19,52)
Luz no fundo (μmol m ⁻² s ⁻¹)	32,33 (±2,66)	33,41 (±13,93)	18,66 (±5,36)	15,09 (±5,87)	100,84 (±42,25)	90,14 (±53,68)	94,10 (±25,82)	85,53 (±27,01)	9,38 (±5,47)	12,57 (±5,09)
OD (mg L ⁻¹)	10,45 (±0,11)	10,74 (±0,43)	7,77 (±1,58)	5,82 (±0,36)	6,46 (±2,15)	5,84 (±2,42)	4,47 (±0,78)	4,69 (±2,99)	4,66 (±1,06)	6,54 (±1,51)
pH	6,16 (±0,47)	6,25 (±0,55)	5,60 (±1,09)	6,28 (±0,59)	7,43 (±0,30)	7,21 (±0,28)	7,03 (±0,55)	7,09 (±0,22)	6,29 (±0,08)	6,34 (±0,12)
PT (μg L ⁻¹)	151,49 (±48,82)	85,34 (±12,40)	91,43 (±32,45)	81,50 (±9,23)	81,39 (±8,17)	69,69 (±11,68)	69,33 (±8,94)	62,52 (±4,64)	46,76 (±3,69)	46,76 (±5,29)
PDT (μg L ⁻¹)	18,81 (±4,50)	13,27 (±0,98)	13,86 (±1,46)	16,31 (±3,85)	15,57 (±1,87)	14,69 (±0,56)	19,60 (±4,30)	16,07 (±4,45)	26,03 (±7,54)	25,34 (±2,75)
P-PO ₄ (μg L ⁻¹)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)	5,00 (±0)
NT (μg L ⁻¹)	4037,42 (±931,05)	3044,39 (±414,38)	3400,07 (±129,34)	2168,33 (±56,79)	2275,74 (±479,91)	2512,07 (±118,16)	1015,36 (±380,31)	1120,39 (±430,04)	769,48 (±300,49)	1024,90 (±701,23)
N-NH ₄ (μg L ⁻¹)	134,66 (±53,88)	220,92 (±62,17)	109,88 (±51,55)	356,55 (±110,66)	474,94 (±64,97)	721,43 (±198,55)	177,05 (±37,19)	288,46 (±93,5)	211,74 (±47,78)	340,95 (±158,61)
N-NO ₂ (μg L ⁻¹)	14,64 (±2,46)	16,47 (±1,5)	15,08 (±4,71)	18,71 (±1,77)	12,27 (±4,91)	15,47 (±2,99)	10,40 (±3,36)	13,56 (±3,08)	15,05 (±4,95)	21,26 (±9,26)
N-NO ₃ (μg L ⁻¹)	128,37 (±23,3)	156,30 (±13,53)	133,49 (±30,34)	141,48 (±10,15)	93,62 (±18,72)	82,47 (±4,50)	84,70 (±27,01)	80,37 (±3,89)	53,88 (±4,68)	62,67 (±20,58)
TDS (mg L ⁻¹)	0,08 (±0)	0,09 (±0,01)	0,08 (±0,01)	0,09 (±0,01)	0,09 (±0,01)	0,10 (±0,01)	0,10 (±0,01)	0,11 (±0,01)	0,10 (±0,01)	0,12 (±0,02)
Temperatura (°C)	18,43 (±0,19)	18,64 (±0,40)	17,90 (±0,04)	17,91 (±0,02)	14,90 (±0,28)	14,83 (±0,13)	17,74 (±0,31)	17,56 (±0,05)	19,54 (±0,04)	19,56 (±0,02)

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão das variáveis abióticas das condições ambientais (mesocosmos sem diluição).

	Controle (C)				
	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias	20 dias
Alcalinidade (mEq L ⁻¹)	0,77 (±0,01)	0,75 (±0,03)	0,83 (±0,02)	0,87 (±0,03)	0,83 (±0,02)
Condutividade (uS cm ⁻²)	228,67 (±2,49)	227,00 (±3,74)	231,00 (±4,97)	235,00 (±6,38)	240,33 (±10,21)
CO ₂ livre (mg L ⁻¹)	29,63 (±36,06)	27,43 (±27,47)	6,11 (±3,69)	8,27 (±6,93)	38,44 (±16,68)
Luz (%)	80,80 (±4,06)	59,65 (±4,17)	80,91 (±9,03)	70,45 (±10,88)	80,27 (±8,32)
Luz à 25 cm (μmol m ⁻² s ⁻¹)	64,25 (±36,53)	19,83 (±5,89)	202,35 (±79,08)	394,30 (±102,43)	35,76 (±12,64)
Luz no fundo (μmol m ⁻² s ⁻¹)	10,91 (±3,51)	7,77 (±1,63)	34,92 (±21,50)	112,02 (±49,16)	7,95 (±5,96)
OD (mg L ⁻¹)	10,20 (±0,10)	6,36 (±0,82)	4,60 (±0,81)	4,33 (±1,02)	5,75 (±2,56)
pH	6,89 (±0,64)	6,73 (±0,43)	7,27 (±0,24)	7,23 (±0,33)	6,41 (±0,22)
PT (μg L ⁻¹)	205,94 (±33,20)	126,43 (±49,09)	101,26 (±9,79)	61,32 (±8,60)	61,11 (±10,85)
PDT (μg L ⁻¹)	25,83 (±1,23)	21,46 (±5,01)	15,67 (±0,68)	15,67 (±0,57)	24,21 (±2,16)
P-PO ₄ (μg L ⁻¹)	5 (±0)	5 (±0)	5 (±0)	5 (±0)	5 (±0)
NT (μg L ⁻¹)	7699,23 (±1544,37)	4259,42 (±693,48)	3524,20 (±16,88)	1819,81 (±579,59)	1402,07 (±111,61)
N-NH ₄ (μg L ⁻¹)	116,67 (±8,57)	113,00 (±11,24)	159,07 (±18,90)	243,13 (±30,33)	278,00 (±45,65)
N-NO ₂ (μg L ⁻¹)	31,07 (±1,64)	44,09 (±11,74)	43,43 (±22,62)	38,72 (±24,39)	71,70 (±43,47)
N-NO ₃ (μg L ⁻¹)	215,31 (±20,16)	256,10 (±29,41)	177,55 (±60,17)	158,01 (±74,65)	160,50 (±79,89)
TDS (mg L ⁻¹)	0,15 (±0)	0,15 (±0)	0,15 (±0)	0,16 (±0)	0,16 (±0,01)
Temperatura (°C)	18,73 (±0,20)	17,89 (±0,02)	15,04 (±0,25)	17,70 (±0,13)	19,54 (±0,03)

3.3 Fitoplâncton

A concentração de clorofila-*a* do fitoplâncton foi menor na presença do biorreator de perifíton (tratamento DP) apenas no 9º dia de experimento (Figura 4A). RM ANOVA two-way não detectou diferenças estatísticas significativas na clorofila-*a* do fitoplâncton entre os tratamentos, tempo e interação entre os dois fatores (D e DP).

A densidade total do fitoplâncton foi menor na presença do biorreator de perifíton no 6º, 15º e 20º dia do período experimental (Figura 4B). Nenhuma diferença significativa foi detectada na densidade entre dias e tratamentos.

O biovolume total do fitoplâncton foi menor na presença do biorreator de perifíton no 6º, 15º e 20º dia do período experimental (Figura 4C). O biovolume foi diferente entre os dias de amostragem (RM ANOVA: $F = 7,93$; $p = 0,001$). A interação entre tempo e tratamento foi significativa para o biovolume (RM ANOVA: $F = 4,78$; $p = 0,01$). Teste de Tukey indicou diferenças no biovolume total do fitoplâncton entre tratamentos no dia 6 ($p = 0,001$).

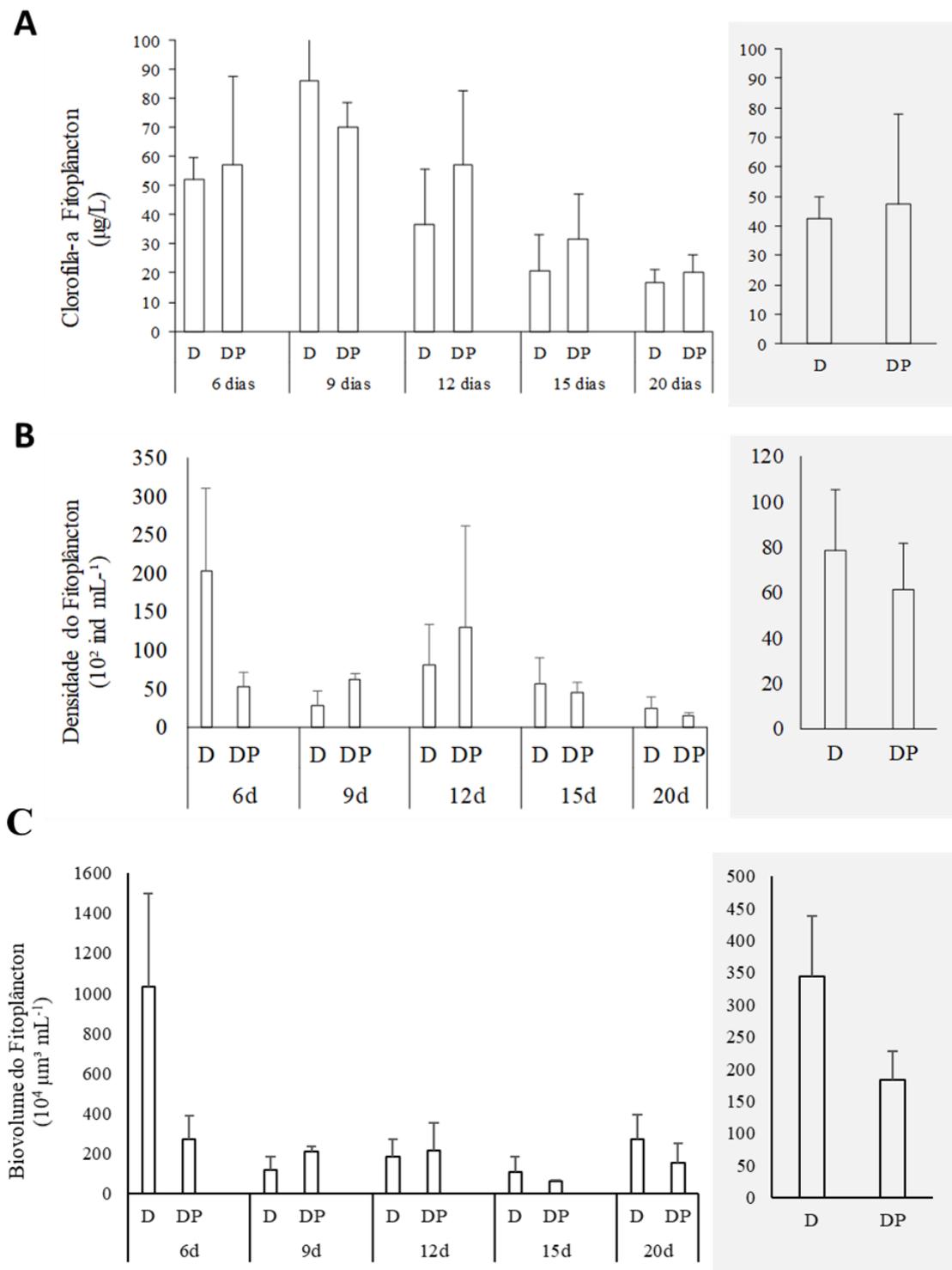


Figura 4. Valores médios em cada dia (n=3) e no período (n = 15) da concentração de clorofila-a (A), densidade (B) e biovolume total (C) do fitoplâncton no tratamento diluído (D) e diluído com biorreator de perifíton (DP).

Em termos de biovolume relativo, verificou-se que a apesar das espécies descritoras permanecerem no fitoplâncton durante o período experimental, a contribuição das espécies para a estrutura mudou (Figura 5). A análise conjunta das espécies pela PERMANOVA mostrou que houve diferenças significativas entre os dias de amostragem ($F = 10,988$; $p = 0,0001$) e tratamentos ($F = 4,7534$; $p = 0,0088$) e a interação entre os fatores foi significativa ($F = 4,4348$; $p = 0,0028$). *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) (Aguilera & al 2018)) apresentou o maior biovolume no tratamento D durante praticamente todo o período experimental, exceto no dia 20 (Figura 5). O biovolume da *R. raciborskii* foi diferente entre dias ($F = 229,31$; $p < 0,001$) e tratamentos ($F = 42,56$; $p = 0,003$) e a interação entre os fatores foi significativa ($F = 73,35$; $p < 0,001$).

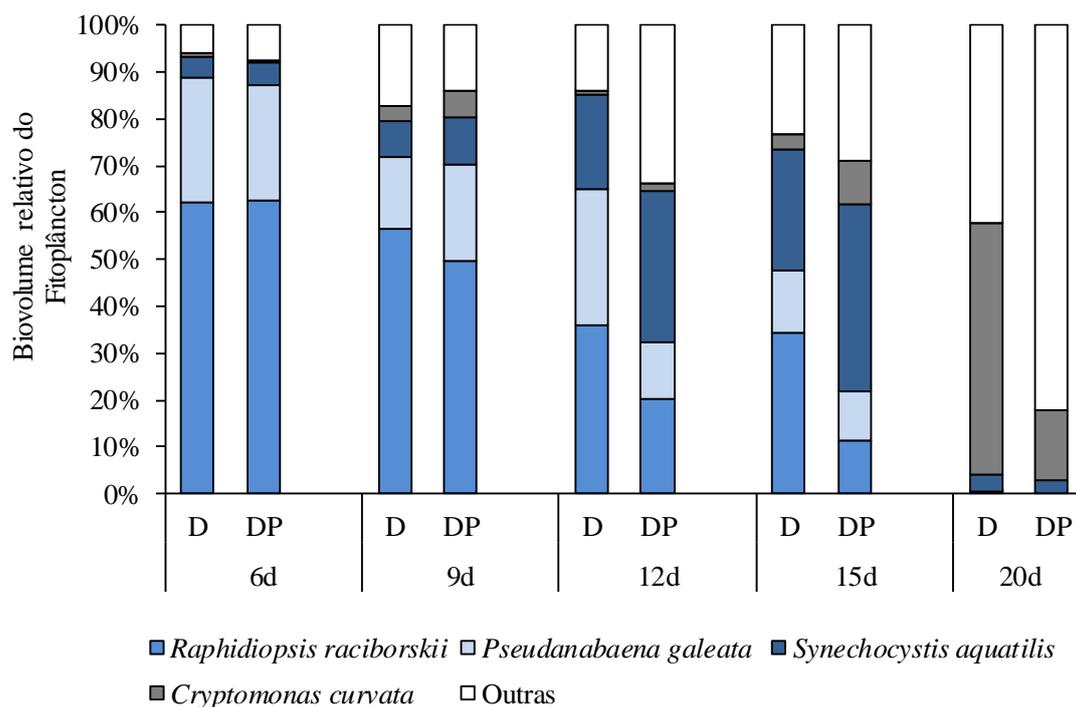


Figura 5. Biovolume das espécies descritoras do fitoplâncton (n=3) no tratamento diluído (D) e diluído com biorreator de perifíton (DP) durante o experimento.

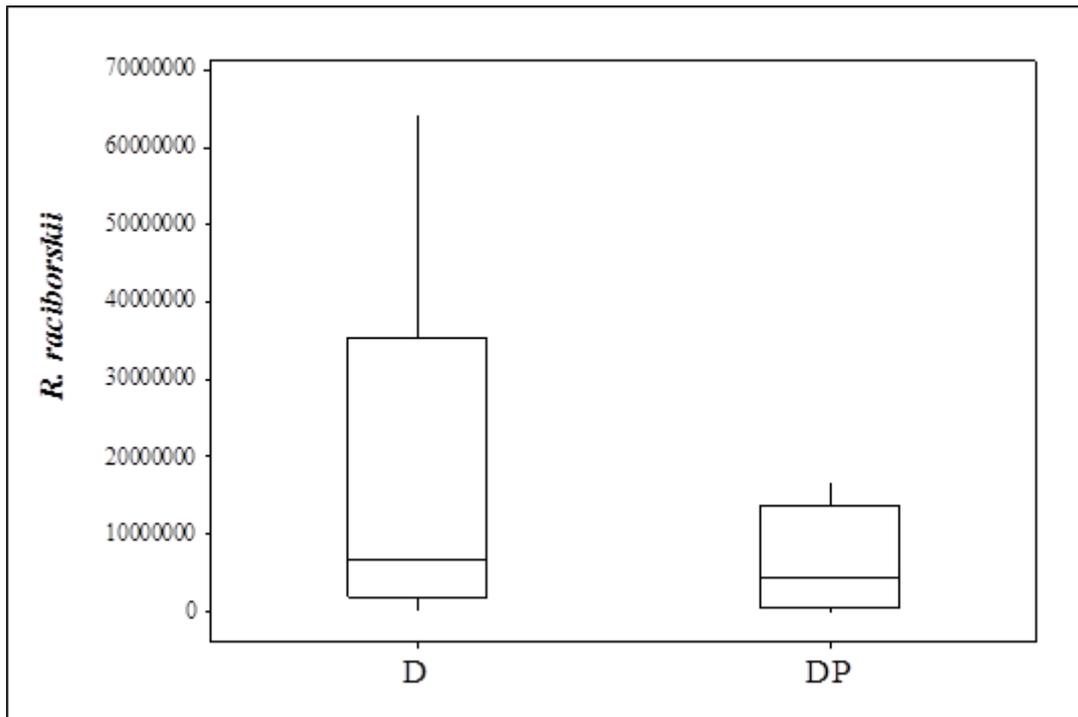


Figura 6. Biovolume de *Raphidiopsis raciborskii* no fitoplâncton (n=15) no tratamento diluído (D) e diluído com biorreator de perifíton (DP).

3.4 Epipélton

A clorofila-*a* do epipélton foi maior na presença do biorreator de perifíton (tratamento DP) em todo o período experimental, com exceção do 12º dia (Figura 7A). A clorofila-*a* foi diferente apenas entre os dias experimentais (RM ANOVA: $F = 5,45$; $p = 0,032$). A MSLC foi maior na presença do biorreator de perifíton (tratamento DP) durante todo o período experimental, com exceção do 20º dia. A MSLC do epipélton foi significativamente diferente apenas entre os dias de experimento ($F = 3,872$; $p = 0,022$).

Com base na clorofila-*a*, MSLC e conteúdo de P, a análise conjunta mostrou que a comunidade do epipélton foi significativamente diferente entre tratamentos (PERMANOVA: $p = 0,0073$) e entre dias (PERMANOVA: $p = 0,0001$).

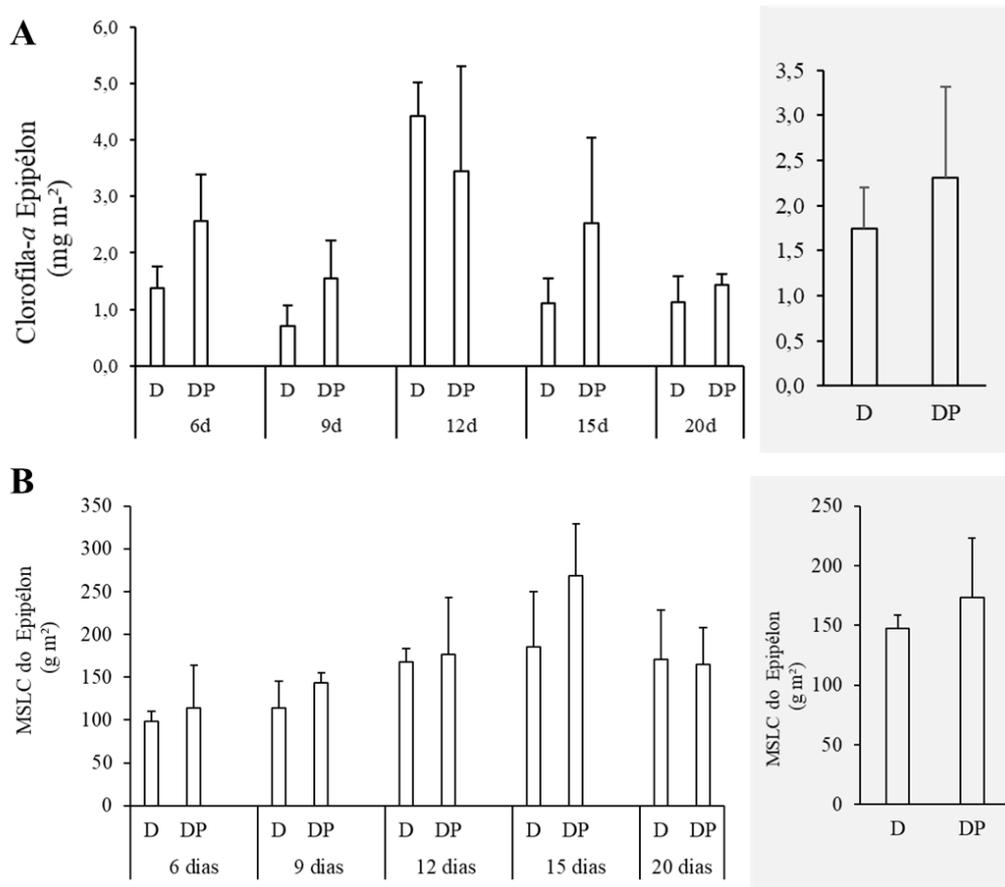


Figura 7. Valores médios em cada dia ($n=3$) e no período ($n = 15$) da concentração de clorofila-*a* (A) e MSLC (B) do epipelton no tratamento diluído (D) e diluído com biorreator de perifíton (DP).

Discussão

No presente estudo, o acompanhamento da formação do biorreator de perifíton durante 20 dias mostrou um aumento do incremento de biomassa (clorofila-*a*, MSLC) da comunidade ao longo do período experimental. Contudo, o conteúdo de P foi maior no início do experimento do que no final do período de colonização. O perifíton em lagos eutróficos pode reter quantidades consideráveis de fósforo (Pei *et al.* 2015), incluindo no lago estudado (Mendes-Santos & Ferragut 2021). Estudos demonstraram que o acúmulo de P no perifíton tende a ser maior na fase inicial da colonização, uma vez que a comunidade nos estágios iniciais de sucessão possui mais superfície de área e sítios específicos de adsorção do que uma matriz mais espessa, característica das comunidades mais maduras (Lu *et al.* 2014). Apesar da variação da biomassa e do conteúdo de P do biorreator de perifíton, os resultados mostraram que a presença do biorreator influenciou as respostas do fitoplâncton e do epipelon.

A hipótese (H1) de que o biorreator de perifíton poderia afetar negativamente o fitoplâncton foi evidenciada pela redução significativa do biovolume, particularmente no dia 6 do período experimental. Embora a clorofila-*a* do fitoplâncton tenha sido reduzida na presença do biorreator no 9º dia, e a densidade na maioria dos dias experimentais, nenhuma diferença significativa foi detectada entre tratamentos. Além de manter as condições limnológicas atingidas com a diluição, a presença do biorreator de perifíton contribuiu com a redução do biovolume do fitoplâncton. Como evidenciado em outros estudos (Wu *et al.* 2013; Cui *et al.* 2017), o biorreator de perifíton pode ter grande importância em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados, incluindo o controle das florações de cianobactérias (Wu *et al.* 2010; Ko *et al.* 2019).

A segunda hipótese (H2) foi que a presença do biorreator pode influenciar a composição de espécies, reduzindo principalmente a biomassa de cianobactérias. Os

resultados mostraram que a presença do biorreator de perifíton não alterou qualitativamente as espécies descritoras do fitoplâncton, mas a composição e a contribuição das espécies para a comunidade mudaram. Assim, embora as espécies descritoras tenham permanecido na estrutura após a oligotrofização, a PERMANOVA da biomassa das espécies mostrou que a presença do biorreator de perifíton influenciou a estrutura do fitoplâncton.

Considerando a cianobactéria dominante nos tratamentos, evidenciou-se o efeito negativo da presença do biorreator do perifíton sobre a biomassa e contribuição relativa da *Raphidiopsis raciborskii*. Claramente a oligotrofização afetou negativamente a dominância de *R. raciborskii*, reduzindo-a ao longo do tempo. Contudo, em presença do biorreator do perifíton ocorreu a maior perda de biomassa e redução da contribuição dessa cianobactéria para a estrutura do fitoplâncton. No reservatório estudado, estudo de longa duração reportou a elevada biomassa e florações frequentes de *R. raciborskii* no período de 1998 a 2014, quando a dominância mudou para *Ceratium furcoides* (Crossetti *et al.* 2018). Essa espécie foi associada à baixa disponibilidade de P no reservatório estudado (Tucci & Santana 2003). Destaca-se que essa espécie de cianobactéria possui capacidade de invasão, produção de toxinas e substâncias alelopáticas, além da capacidade de rápida absorção de fósforo, mesmo em baixa disponibilidade, e fixação de nitrogênio (Padisák 1997; Antunes *et al.* 2015), tendo sucesso em situação de estresse nutricional (Crossetti & Bicudo 2005). Estudo em lago da água doce reportou elevada dominância de *R. raciborskii* em condições de baixa disponibilidade de luz e nutrientes (Tonetta *et al.* 2015). Portanto, apesar da presença de eficientes estratégias adaptativas para sobrevivência em diferentes condições ambientais, a diluição aliada ao biorreator de perifíton ampliou o efeito negativo sobre o crescimento de *R. raciborskii*.

A terceira hipótese (H3) foi a de que o biorreator do perifíton poderia favorecer o crescimento do epipélton após oligotrofização, contribuindo para manutenção das condições ambientais. Os resultados mostram que a clorofila-*a* e MSLC foram maiores na presença do perifíton na maioria dos dias do período experimental. Além disso, o efeito positivo do biorreator do perifíton sobre o epipélton foi evidenciado pela análise conjunta dos atributos (PERMANOVA). Estudos reportaram que o aumento da disponibilidade de luz pode favorecer o crescimento do epipélton fototrófico (Pouličková *et al.* 2014; Tavares *et al.* 2019; Amaral *et al.* 2020), sendo a luz um fator determinante para o epipélton (Vadeboncoeur *et al.* 2014). No presente estudo, a diluição aumentou a disponibilidade de luz no fundo dos mesocosmos dos tratamentos com e sem perifíton, quando comparada à condição sem diluição. Contudo, em presença do biorreator de perifíton, o epipélton fototrófico apresentou, em média, o maior desenvolvimento.

Em suma, evidenciou-se que a presença do biorreator de perifíton exerceu influência negativa sobre o fitoplâncton, reduzindo e mantendo baixa a biomassa de cianobactérias. Por outro lado, o biorreator proporcionou um aumento da biomassa fotossintética do epipélton, o que pode ter contribuído para a manutenção das condições limnológicas atingidas pela oligotrofização da água eutrófica do reservatório. Como o biorreator de perifíton removeu P da água e o estocou na matriz, os resultados sugerem que essa remoção pode ter favorecido a manutenção da oligotrofização durante o experimento. Conclui-se que o biorreator de perifíton tem potencial para ser usado como uma ferramenta para auxiliar na manutenção de lagos e reservatórios restaurados. Destaca-se ainda que mais estudos precisam ser realizados para garantir e quantificar a eficiência do biorreator de perifíton, principalmente em estudos experimentais de longa duração.

Conclusão Geral

De maneira geral, a presente pesquisa avaliou os efeitos da remoção de P sobre o fitoplâncton e epipélton. Particularmente, pretendeu-se determinar se a presença do biorreator de perifíton remove o P da água em concentrações suficientes para reduzir a biomassa e as florações do fitoplâncton, aumentando a luz no fundo do sistema e favorecendo o desenvolvimento do epipélton, que por sua vez pode contribuir com a manutenção da oligotrofização através da retenção de P.

No primeiro experimento, houve uma redução na densidade e biovolume do fitoplâncton na presença do biorreator de perifíton. A clorofila-*a* e MSLC do epipélton foram menores na presença do biorreator de perifíton. No entanto, ambas as variáveis não foram significativamente diferentes entre tratamentos.

No segundo experimento, além de manter as condições limnológicas atingidas com a oligotrofização (diluição de 50% da água dos mesocosmos), observou-se uma redução na densidade e biovolume do fitoplâncton na presença do biorreator de perifíton. O aumento da luz no fundo proporcionou o aumento da clorofila-*a* e MSLC no epipélton.

Em ambos os experimentos, a presença do biorreator de perifíton contribuiu com a redução da densidade e biovolume de cianobactérias formadoras de floração e produtoras de toxinas. Além disso, o perifíton promoveu um aumento no desenvolvimento do epipélton. Concluímos que os biorreatores de perifíton apresentam grande potencial para serem utilizados em processos de biorremediação de ambientes eutrofizados, incluindo a área de estudo da presente pesquisa (Lago das Garças), a qual pode passar por um processo de restauração no futuro, subsidiado em parte pelos conhecimentos produzidos neste trabalho.

Considerando que o epipélton pode contribuir com a retenção de P no sedimento através da fotossíntese, supersaturação de oxigênio e elevação dos níveis de pH, evitando a ciclagem interna de P em lagos e reservatórios, sugerimos que mais estudos precisam ser realizados com o intuito de melhor compreender a relação entre a remoção de P da água pelo biorreator de perifíton e o epipélton em processos de restauração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L. M., Castilho, M. C. A., Henry, R. & Ferragut, C. 2020. Epipelon, phytoplankton and zooplankton responses to the experimental oligotrophication in a eutrophic shallow reservoir. *Environmental Pollution*, 263.
- Antunes, J. T., Leão, P. N. & Vasconcelos, V. M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: distribution, phylogeography and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*, 6: 473.
- APHA, AWWA. & WEF. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Basílico, G., Cabo, L., Magdaleno, A. & Faggi, A. 2016. Poultry effluent bio-treatment with *Spirodela intermedia* and periphyton in mesocosms with water recirculation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227: 190.
- Batista, B. D. & Fonseca, B. M. 2018. Fitoplâncton da região central do Lago do Paranoá, DF: uma abordagem ecológica e sanitária. *Engenharia Sanitária Ambiental*, 23(2): 9-241.
- Bicudo, C. E. M., Carmo, C. F., Bicudo, D. C., Henry, R., Pião, A. C. S., Santos, C. M. & Lopes, M. R. M. 2002. Morfologia e morfometria de três reservatórios do PEFI. In: Bicudo, D. C., Forti, M. C. & Bicudo, C.E.M. (orgs.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo. Ed. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo.
- Bicudo, D. C., Fonseca, B. M., Bini, L. M., Crossetti, L. O., Bicudo, C. E. M. & Araújo-Jesus, T. 2007. Undesirable side-effects of water hyacinth control in a shallow tropical reservoir. *Freshwater Biology*, 52: 1120-1133.
- Bicudo, D. C., Zanon, J. E., Ferragut, C., Crossetti, L. O., Faustino, S. B. & Bicudo, C. E. M. 2020. Garças Reservoir trophic state dynamics: a 20-year synthesis. *Hoehnea*, 47.
- Borduqui, M. & Ferragut, C. 2012. Factors determining periphytic algae succession in a tropical hypereutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 683: 109-122.
- Carlton, R. G. & Wetzel, R. G. 1988. Phosphorus flux from lake sediments: effect of epipellic algal oxygen production. *Limnology and Oceanography*, 33: 562-570.
- Castro, A. A. J., Bicudo, C. E. M. & Bicudo, D. C. 1991. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 2: Cryptophyceae. *Hoehnea*, 18: 87-106.

- Conti, J. B. & Furlan, S. A. 2003. Geografia do Brasil. São Paulo, Edusp.
- Correll, D. L. 1999. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poultry Science*, 78: 674-682.
- Costa, J. A., Souza, J. P., Teixeira, A. P., Nabout, J. C. & Carneiro, F. M. 2018. Eutrophication in aquatic ecosystems: a scientometric study. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 30: e2.
- Crossetti, L. O. & Bicudo, C. E. M. 2005. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, 541: 71-85.
- Crossetti, L. O., Bicudo, D. C., Bini, L. M., Dala-Corte, R. B., Ferragut, C. & Bicudo, C. E. M. 2018. Phytoplankton species interactions and invasion by *Ceratium furcoides* are influenced by extreme drought and water-hyacinth removal in a shallow tropical reservoir. *Hydrobiologia*, 831: 71-85.
- Cui, Y., Jin, L., Ko, S. R., Chun, S. J., Oh, H. S., Lee, C. S., Srivastava, A., Oh, H. M. & Ahn, C. Y. 2017. Periphyton effects on bacterial assemblages and harmful cyanobacterial blooms in a eutrophic freshwater lake: a mesocosm study. *Scientific Reports*, 7: 7827.
- de-Bashan, L. E. & Bashan, Y. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water Research*, 38: 4222-4246.
- Dodds, W. K. 2003. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *Journal of Phycology*, 39: 840-849.
- Fonseca, B. M., Ferragut, C., Tucci, A., Crossetti, L. O., Ferrari, F., Bicudo, D. C., Sant'Anna, C. L. & Bicudo, C. E. M. 2014. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. *Hoehnea*, 41: 9–30.
- Gaiser, E. E. 2009. Periphyton as an indicator of restoration in the Everglades. *Ecological Indicators*, 9(6): S37-S45.
- Gao, X., Wang, Y., Sun, B. & Li, N. 2019. Nitrogen and phosphorus removal comparison between periphyton on artificial substrates and plant-periphyton complex in floating treatment wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 21161-21171.
- Godoy, R. F. B., Radomski, F. A. D., de la Cruz Guerra, B. & Kuroda, C. Y. 2019. Eutrophication: a threat to freshwater reservoirs and human health. *Multidisciplinary Reviews*.

- Golterman, H. L. & Clymo, R. S. 1971. Methods for chemical analysis of freshwaters. Ed. Oxford and Edinburg, Blackwell Scientific Publications. International Biological Programmer. 166p.
- Golterman, H. L., Clymo, R. S. & Ohmstad, M. A. M. 1978. Methods for physical and chemical analysis of freshwaters. 2^a Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. International Biological Programmer, 213p. (Handbook, 8).
- Hill, W.R. 1996. Light effects. In: Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. & Lowe, R. L. (eds.). Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems. Academic press. San Diego, USA. p. 121–148.
- Hillebrand, H., Durselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35: 403–424.
- Jobgen, A. M., Palm, A. & Melkonian, M. 2004. Phosphorus removal from eutrophic lakes using periphyton on submerged artificial substrata. *Hydrobiologia*, 528: 123-142.
- Ko, S. R., Srivastava, A., Lee, N., Jin, L., Oh, H. M. & Ahn, C. Y. 2019. Bioremediation of eutrophic water and control of cyanobacterial bloom by attached periphyton. *International Journal of Environmental Science and Technology*.
- Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, A. & Pinay, G. 2019. Eutrophication: a new wine in an old bottle? *Science of the Total Environment*, 651: 1-11.
- Liboriussen, L., & Jeppesen, E. 2006. Structure, biomass, production and depth distribution of periphyton on artificial substratum in shallow lakes with contrasting nutrient concentrations. *Freshwater Biology*, 51(1): 95-109.
- Lu, H., Yang, L., Shabbir, S. & Wu, Y. 2014. The adsorption process during inorganic phosphorus removal by cultured periphyton. *Environmental Science Pollution Research*.
- Lu, H., Wan, J., Li, J., Shao, H. & Wu, Y. 2016. Periphytic biofilm: a buffer for phosphorus precipitation and release between sediments and water. *Chemosphere*, 144: 2058-2064.
- Mackereth, F. J. H., Heron, J. & Talling, J. F. 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. Kendall: Titus Wilson and Son Ltd. 117 p.
- Mandenius, C. F. 2016. Bioreactors: design, operation and novel applications. John Wiley & Sons.

- McCune, M. J. & Mefford, B. 2011. Gleneden Beach: MjM Software Design.
- Mendes-Santos, S. A. & Ferragut, C. 2021. Evaluating the periphyton as a bioreactor for removal of nutrients in a shallow hypereutrophic reservoir. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 33: 10
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Hydrobiologia*, 4: 563-593.
- Pei, G., Wang, Q. & Liu, G. 2015. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow lakes with different trophic status, China. *Aquatic Botany*, 125: 17-22.
- Pompêo, M. L. M. & Moschini-Carlos, V. 2003. *Macrófitas aquáticas e perifíton: aspectos ecológicos e metodológicos*. Rima/Fapesp, São Carlos.
- Rangel, M., Martins, J. C. G., Garcia, A. N., Conserva, G. A. A., Costa-Neves, A., Sant'Anna, C. L. & Carvalho, L. R. 2014. Analysis of the toxicity and histopathology induced by the oral administration of *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema splendidum* (Cyanobacteria) extracts to mice. *Marine Drugs*, 12: 508-524.
- Sartory, D. P. & Grobbelaar, J. U. 1984. Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114: 177-187.
- Schindler, D. W. 2012. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences*, 279: 4322–4333.
- Schindler, D. W., Carpenter, S. R., Chapra, S. C., Hecky, R. E. & Orihel, D. M. 2016. Reducing phosphorus to curb lake eutrophication is a success. *Environmental Science & Technology*, 50(17): 8923-8929.
- Shangguan, H., Liu, J., Zhu, Y., Tong, Z. & Wu, Y. 2015. Start-up of a spiral periphyton bioreactor (SPR) for removal of COD and the characteristics of the associated microbial community. *Bioresource technology*, 193: 456-462.
- Sládečková, A., Marvan, P. & Vymazal, J. 1983. The utilization of periphyton in waterworks pre-treatment for nutrient removal from enriched influents. *Periphyton of Freshwater Ecosystems*, 17: 285-289.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14: 799-801.
- Søndergaard, M., Bjerring, R. & Jeppesen, E. 2013. Persistent internal phosphorus loading during summer in shallow eutrophic lakes. *Hydrobiologia*, 710: 95-107.

- Søndergaard, M., Jensen, J. P. & Jeppesen, E. 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia*, 506-509: 135-145.
- Sormus, L. & Bicudo, C. E. M. 1994. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 6: Zygnemaphyceae (Closteriaceae). *Hoehnea*, 21: 75-92.
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. 1960. A manual of seawater analysis. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*, 125: 1-185.
- Tonetta, D., Hennemann, M. C., Brentano, D. N. & Petrucio, M. M. 2015. Considerations regarding the dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* under low light availability in a low phosphorus lake. *Acta Botanica Brasilica*, 29 (3).
- Tucci, A. & Sant'Anna, C. L. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 97-112.
- Tucci, A., Sant'Anna, C. L., Gentil, R. C. & Azevedo, M. T. P. 2006. Fitoplâncton do Lago das Garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano eutrófico. *Hoehnea*, 33 (2): 147-175.
- Vadeboncoeur, Y. & Steinman, A. D. 2002. Periphyton function in lake ecosystems. *The Scientific World Journal*, 2: 1449-1468.
- Vadeboncoeur, Y., Devlin, S. P., McIntyre, P. B. & Zanden, M. J. V. 2014. Is there light after depth? distribution of periphyton chlorophyll and productivity in lake littoral zones. *Freshwater Science*, 33 (2): 524-536.
- Valderrama, G. C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemical*, 10: 109-112.
- Wetzel, R. G. 2001. *Limnology*. New York: Academic Press, 1006 p.
- Wu, Y., Feng, M., Liu, J. & Zhao, Y. 2005. Effects of polyaluminium chloride and copper sulfate on phosphorus and UV254 under different anoxic levels. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13: 406-412.
- Wu, Y., Zhang, S., Zhao, H. & Yang, L. 2010. Environmentally benign periphyton bioreactors for controlling cyanobacterial growth. *Bioresource Technology*, 101: 9681-9687.

- Wu, Y., Hu, Z., Yang, L., Graham, B. & Kerr, P. G. 2011. The removal of nutrients from non-point source wastewater by a hybrid bioreactor. *Bioresource Technology*, 102: 2419-2426.
- Wu, Y., Li, T. & Yang, L. 2012. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. *Bioresource Technology*, 107: 10-18.
- Wu, Y., Xia, L., Yu, Z., Shabbir, S. & Kerr, P. G. 2014. In situ bioremediation of surface waters by periphytons. *Bioresource Technology*, 151, 367-372.
- Wu, Y., Liu, J. & Rene, E. R. 2018. Periphytic biofilms: a promising nutrient utilization regulator in wetlands. *Bioresource Technology*, 248: 44-48.
- Yi, Z., Yang, Y., Yan, C. & Pei, G. 2019. The influence of periphyton biofilm on phosphorus migration in sediments. *International Journal of Environmental Research*.
- Zhang, L., Zhao, J., Cui, N., Dai, Y., Kong, L., Wu, J. & Cheng, S. 2016. Enhancing the water purification efficiency of a floating treatment wetland using a biofilm carrier. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 7437-7443.
- Zhao, Y., Chen, X., Xiong, X. & Wu, C. 2019. Capture and release of phosphorus by periphyton in closed water systems influenced by illumination and temperature. *Water*, 11(5): 1021.