

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ADOLFO PAULO DE MATTOS JÚNIOR

**INFLUÊNCIAS DA EUTROFIZAÇÃO E DAS VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS
SOBRE A MORTANDADE DE PEIXES E A COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA DA
COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA NO RESERVATÓRIO DE FURNAS E
EXPERIMENTOS DE TOXICIDADE COM *CERIODAPHNIA SILVESTRII*
(CLADOCERA: DAPHNIDAE)**

Alfenas/MG

2020

ADOLFO PAULO DE MATTOS JÚNIOR

INFLUÊNCIAS DA EUTROFIZAÇÃO E DAS VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS SOBRE A MORTANDADE DE PEIXES E A COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA DA COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA NO RESERVATÓRIO DE FURNAS E EXPERIMENTOS DE TOXICIDADE COM *CERIODAPHNIA SILVESTRII* (CLADOCERA: DAPHNIDAE)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Profa. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Mattos Júnior, Adolfo Paulo de
M444i Influências da eutrofização e das variáveis climatológicas sobre a
mortalidade de peixes e a composição e abundância da comunidade
zooplancônica no reservatório de furnas e experimentos de toxicidade com
ceriodaphnia silvestrii (cladocera: daphnidae) / Adolfo Paulo de Mattos Júnior.
– Alfenas, MG, 2020.

114 f.: il. –

Orientadora: Maria José dos Santos Wisniewski.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de
Alfenas, 2020.

Bibliografia.

1. Ecotoxicologia. 2. Zooplâncton. 3. Hormônios Esteroides Gonadais.
4. Filtração.. I. Wisniewski, Maria José dos Santos. II. Título.

CDD- 577.27

ADOLFO PAULO DE MATTOS JUNIOR

INFLUÊNCIAS DA EUTROFIZAÇÃO E DAS VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS SOBRE A MORTANDADE DE PEIXES E A COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA DA COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA NO RESERVATÓRIO DE FURNAS E EXPERIMENTOS DE TOXICIDADE EM *CERIODAPHNIA SILVESTRII* (CLADOCERA: DAPHNIDAE)

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 27 de novembro de 2020

Profa. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Raquel Aparecida Moreira
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Giseli Swerts Rocha
Instituição: Universidade de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **Maria José dos Santos Wisniewski, Professor do Magistério Superior**, em 27/11/2020, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Aparecida Moreira, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giseli Swerts Rocha, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0414272** e o código CRC **A3AEE1A3**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos os trabalhadores, professores, técnicos e prestadores de serviços da Universidade Federal de Alfenas que, em meio a um ano turbulento de pandemia, me prestaram a mais solene e caridosa mão amiga. Em especial à minha orientadora Maria José, que me auxiliou não só no trabalho acadêmico como também na condução de minha vida pessoal. Também agradeço aos meus colegas de Laboratório Hugo, Deivid, Érika e demais, que não hesitaram em sanar minhas dúvidas e pelos ótimos bate-papos tomando café nas pausas da pesquisa. Agradeço também a confiança interminável dos meus pais, que depositam em mim, continuamente, milhares de votos de motivação e de orgulho. Estendo o agradecimento à Thaís e seus familiares, minha segunda família, a qual não mediu esforços para trilhar comigo essa árdua caminhada. Por fim, agradeço às agências de fomento brasileiras, em especial a CAPES, que financiou minha pesquisa e possibilitou que este trabalho se concretizasse. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Atividades antrópicas impactam o meio ambiente e os recursos naturais. Nos recursos hídricos, o impacto pode ser percebido na prevalência de processos de eutrofização, de mortandade de peixes, de intoxicação e consequente diminuição das espécies aquáticas. Este trabalho analisou o efeito da eutrofização, despejo de efluentes domésticos e a criação de peixes na estrutura da comunidade zooplanctônica e correlacionou os fatores químicos, físicos e biológicos que atuaram em dois episódios de mortalidade de peixes. Durante esses episódios, a grande quantidade de rotíferos e a presença de Cyclopoida como *Thermocyclops decipiens* demonstram a qualidade já deteriorada da água, onde um evento climático contribuiu para depleção de oxigênio dissolvido e a consequente morte dos peixes. Este trabalho também analisou os efeitos de compostos comumente encontrados em sistemas aquáticos, por meio de testes de toxicidade aguda e crônica com os 3 compostos, cloprostenol, 17 α -etinilestradiol e Estrona, sobre os parâmetros sobrevivência, reprodução e comportamento alimentar (filtração) de uma espécie neotropical indicadora de poluição aquática, o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. O teste de toxicidade aguda com cloprostenol nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ apresentou CE₅₀ de 0,41 \pm 0,08 mg.L⁻¹ e a toxicidade crônica nas concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,7; 1,0; 1,5 mg.L⁻¹ apresentou CE₅₀ de 0,618 \pm 0,05 mg.L⁻¹. Organismos expostos a cloprostenol produziram menos neonatos a partir das 48 h de exposição a 1,5 mg.L⁻¹. A CE₅₀ da toxicidade aguda de 17 α -etinilestradiol foi de 0,23 \pm 0,03 mg.L⁻¹, e a CE₅₀ da toxicidade crônica, com as concentrações 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹ foi de 0,89 \pm 0,26 mg.L⁻¹. A toxicidade aguda com Estrona utilizando as concentrações 0; 0,16; 0,31; 0,63; 1,59; 3,18 mg.L⁻¹ apresentou CE₅₀ de 0,71 \pm 0,07 mg.L⁻¹, e a toxicidade crônica com as concentrações 0; 0,09; 0,19; 0,38 e 1,908 mg.L⁻¹ apresentou CE₅₀ de 0,543 \pm 0,17 mg.L⁻¹. A taxa de filtração dos organismos expostos de forma aguda ao cloprostenol aumentou, e neonatos derivados de espécimes expostos cronicamente à cloprostenol demonstraram nenhuma diferença na filtração. Quando diretamente expostos, suas taxas de filtração aumentaram com estrona, diminuíram com cloprostenol e não foram significativamente alteradas com 17 α -etinilestradiol. Hormônios que podem ser encontrados em locais de despejo de esgoto impactam a sobrevivência e reprodução de *C. silvestrii* e, portanto, pode impactar o ecossistema aquático, a estrutura da comunidade, alterar herbivoria e a transferência de energia.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Comunidade zooplanctônica. Hormônios esteroides. Filtração.

ABSTRACT

Anthropic activities always impact nature and natural resources. On hydric resources, the burden is seen on the prevalence of eutrophication processes, of fish die-offs, of toxicity of waters and depletion of aquatic species. This work aimed at tackling the effect of eutrophication, sewage disposal and fish production on zooplankton community and to correlate physical and chemical with biological aspects factoring in two episodes of fish die-off. On the analysis of the zooplankton community found on 2 fish die-off events, the prevalence of Rotifera organisms and the presence of Cyclopoida such as *Thermocyclops decipiens* attest to the previously deteriorated water quality, in where a worsening event, dropping the dissolved oxygen, led to the fish die-off. This work also aimed at analyzing the effects of compounds commonly found in aquatic systems, through sewage disposal and through lixiviation, studying the acute and chronic toxicity of 3 compounds – cloprostenol, 17 α -ethynilestradiol and estrone – on reproduction, survival and filtering behavior aspects of a well-known water pollution indicator, *Ceriodaphnia silvestrii*. EC₅₀ (48 hours) acute toxicity test for cloprostenol, using the concentrations 0; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L⁻¹, was 0.41 \pm 0.08 mg.L⁻¹, and EC₅₀ for the chronic test, with the concentrations 0; 0.2; 0.4; 0.7, 1.0, 1.5 mg.L⁻¹ was of 0.618 \pm 0.05 mg.L⁻¹. Specimens exposed to Cloprostenol yielded lower numbers of neonates on 48 hours exposition to 1.5 mg.L⁻¹. EC₅₀ acute toxicity test for 17 α -ethynilestradiol, with the concentrations 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 3 was 0.23 \pm 0.03 mg.L⁻¹, and chronic toxicity with the concentrations 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 4 mg.L⁻¹ was of 0.89 \pm 0.26 mg.L⁻¹. Estrone CE₅₀ acute toxicity, with the concentrations 0; 0.16; 0.31; 0.63; 1.59; 3.18 mg.L⁻¹ was 0.71 \pm 0.07 mg.L⁻¹, and chronic toxicity with the concentrations 0; 0.09; 0.19; 0.38; 1,908 mg.L⁻¹ was 0.543 \pm 0.17 mg.L⁻¹. Filtering rates of specimens after acute toxicity exposure (48 hours) to cloprostenol increased, and neonates derived from specimens exposed chronically to cloprostenol (7 days) showed no differences in filtering rates. When directly exposed, filtering rates increased with estrone, decreased with cloprostenol and were non-significant for 17 α -ethynilestradiol. Hormones that can be found at sewage release sites impact survival and reproduction of the cladoceran *C. silvestrii* and thus can affect the aquatic ecosystem, disrupting the community structure and changing clearance rates and therefore energy transference.

Key-words: Ecotoxicology. Zooplankton community. Steroidal hormones. Filtering behavior.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 11 |
| 2.1 | Histórico legal e manejo da qualidade dos recursos hídricos..... | 12 |
| 2.2 | Ecologia de reservatórios impactos ambientais sobre os recursos hídricos... | 13 |
| 2.3 | Poluentes e seus impactos nos ecossistemas aquáticos..... | 17 |
| 2.3.1 | Poluentes derivados de esgoto..... | 17 |
| 2.3.2 | Poluentes derivados de lixiviação..... | 21 |
| 3 | COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA | 23 |
| 3.1 | A comunidade zooplancônica na qualidade e toxicidade da água..... | 25 |
| 3.2 | O Cladocera <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> como modelo de estudo tropical brasileiro..... | 27 |
| 4 | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 4.1 | Objetivos específicos..... | 29 |
| 5 | Capítulo 1 – Factors that lead to fish die-offs: a literature review and two case studies on a tropical reservoir in Brazil..... | 31 |
| 6 | Capítulo 2 – Artificial hormone Cloprostenol toxicity in <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday, 1902: effects on size, filtering rates and egg production..... | 54 |
| 7 | Capítulo 3 – Life history traits and toxicity of endocrine compounds 17α-ethynilestradiol and Estrone on <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday 1902..... | 77 |
| 8 | Capítulo 4 – Xenohormones cloprostenol, estrone and 17α-etinilestradiol alters filtering rates of the tropical cladoceran <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> DADAY 1902..... | 91 |
| 9 | CONCLUSÕES GERAIS..... | 103 |
| | REFERÊNCIAS..... | 104 |

Organização do trabalho e dos capítulos

O presente trabalho analisou a estrutura de comunidade zooplanctônica exposta à contaminação hídrica derivada de despejo de esgoto sanitário, industrial e criação de peixes. Os efeitos derivados do despejo destes compostos alteram a qualidade da água e interferem na reprodução e sobrevivência das espécies zooplanctônicas dulcícolas.

Foram analisadas a diversidade e a composição da comunidade zooplanctônica em um compartimento eutrofizado do reservatório de Furnas próximo à Alfenas em episódios de mortalidade de peixes, e realizados testes de toxicidade com três compostos, que são conhecidos por causar desregulação endócrina, o Cloprostenol e o 17 α -etinilestradiol, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, que são compostos que potencialmente podem estar presentes na água devido a lançamentos de esgoto sanitário e atividades de pecuária ao redor do corpo hídrico.

No capítulo 1 são discutidas as contribuições das variáveis climáticas e a qualidade da água em região que recebe efluentes de esgoto na composição da comunidade zooplanctônica, em dois episódios de mortalidade de peixes, em um compartimento do Reservatório de Furnas. Dentre os organismos zooplanctônicos no reservatório de Furnas, foi registrada a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*, que foi então selecionada para testes de toxicidade.

No capítulo 2 são apresentados os resultados dos testes agudos e crônicos do composto cloprostenol em diferentes concentrações, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, além do seu efeito nas taxas de filtração do organismo. O composto cloprostenol é um regulador hormonal, análogo a prostaglandina F2 α , comercializado com o intuito de diminuir a produção de progesterona em suínos e bovinos e sincronizar o período fértil das fêmeas.

No capítulo 3 são apresentados os resultados dos testes agudos e crônicos em *C. silvestrii* exposta à diferentes concentrações de 17 α -etinilestradiol e Estrona, um hormônio sintético e um hormônio natural comumente encontrados em corpos d'água que recebem esgoto sanitário.

No capítulo 4 são apresentados os efeitos da presença dos compostos cloprostenol, 17 α -etinilestradiol e estrona sobre o comportamento de filtração (consumo de algas de *Raphidocelis subcapitata*) do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico dos últimos séculos trouxe um crescimento exponencial da população humana, dos materiais e dos impactos produzidos pela extração e transformação dos recursos naturais. A natureza circundante às ocupações humanas se torna rapidamente antropizada, cursos hídricos alterados, e a produção industrial, agrícola e pecuária que se instalam transformam e impactam o ambiente (POMPÊO *et al.*, 2015).

Pelo fato dos recursos hídricos serem de importância primordial para o sustento humano, animal, e também servir de solvente e ingrediente de muitos processos industriais, as ocupações humanas se dão ao redor de corpos d'água, e estes, após a instalação humana, são também o receptáculo dos muitos resíduos produzidos (PAL *et al.*, 2014). Esgoto sanitário, compostos industriais, resíduos decorrentes da produção pecuária, agrotóxicos, entre outros, todos encontram o leito do rio e ali percorrem, se fixam, e alteram as condições dos organismos presentes na água (ARCHER *et al.*, 2017).

O ambiente aquático é diverso e possui muitos processos ecológicos complexos, como transferência de energia, equilíbrio químico e migração pela coluna d'água (WOODWARD, 2011). Uma comunidade aquática importante e encontrada globalmente é a comunidade zooplanctônica, formada por microcrustáceos, larvas de insetos, nematódeos, protozoários, ostrácodos e rotíferos (WETZEL; LIKENS, 2000). O zooplâncton é o elo de transferência de energia e na filtração e limpeza das águas, e sua composição é rica em diversidade. O estudo sobre esta comunidade é também um estudo sobre a qualidade das águas e a saúde do ecossistema aquático (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Brasil é um país privilegiado em relação aos recursos hídricos. É detentor de 12% dos recursos hídricos do mundo (ANA, 2017), distribuídos entre seus rios, lagos, reservatórios e aquíferos. Apesar do Brasil possuir a maior reserva hídrica mundial, a proporção das águas é diferencialmente distribuída nas regiões do país, com o Nordeste, a região com menor proporção, possuindo somente 8% deste valor total, e com a Amazônia detendo 70% (ANA, 2017).

A importância dos recursos hídricos brasileiros é sem precedentes, pois alimentam a principal fonte de energia elétrica brasileira, gerando cerca de 4755 megawatts (MW) em 2019 (ANEEL, 2019), berçário para incontáveis espécies de peixes, anfíbios, mamíferos, artrópodes, etc., meio de transporte para imensas frotas fluviais, além de ser necessária para a dessedentação humana, animal e a irrigação das plantas. Em suma, os recursos hídricos prestam serviços ecossistêmicos em diferentes níveis.

As sociedades humanas tendem a se formar às margens dos rios, de onde conseguem retirar o recurso da água para beber e para outros inúmeros afazeres. A disponibilidade de água potável é imprescindível para a qualidade da vida humana, sendo considerada, a partir da Resolução A/RES/64/292, um direito humano (ONU, 2010).

A importância da água e a segurança hídrica sempre foi crucial para a formação da sociedade, que se organizou para operacionalizar, legislar o uso destes recursos, promover a proteção e sobretudo a manutenção de sua quantidade e qualidade. A principal alteração antrópica para assegurar a segurança hídrica é a construção de reservatórios. Com cidades cada vez mais populosas e dependentes de maiores quantidade de recursos, inúmeros reservatórios foram criados pelo mundo. Nilsson *et al.* (2005) estima que mais da metade dos grandes rios mundiais estão fragmentados pela construção de barragens e Wu *et al.* (2019), em revisão sobre o impacto de barragens no ecossistema, escreve que foram construídos mais de 300 grandes reservatórios com média de volume de água de 15 milhões de m³, e uma enorme quantidade de reservatórios de pequeno porte. No Brasil, em 2016, cerca de 124 bilhões de m³ de água estavam em reservatórios (ANA, 2017). Grandes reservatórios sem planejamento ecológico foram sendo construídos durante o século XX, afetando a comunidade aquática e terrestre impedindo migração de peixes, mudando

as características físicas e químicas já estabelecidas no local e conseqüentemente alterando as características biológicas do local. Entre as décadas de 50 e 70, eram construídas cerca de 360 barragens ao ano, número este que diminuiu pela metade nas décadas vindouras, pela crescente preocupação com os danos ambientais e o esgotamento de recursos (FUNASA, 2014).

2.1 Histórico legal e manejo da qualidade dos recursos hídricos

Para se evitar a degradação dos recursos hídricos, normatizações legislativas foram sendo criadas, tanto mundial quanto nacionalmente. O uso dos recursos naturais resulta em inegável degradação de seu estado anterior, e sobre os recursos hídricos isto não é diferente. Apesar de que a degradação dos recursos hídricos fosse percebida a mais tempo, os conselhos iniciaram a produzir aparatos e instrumentos para a preservação e recuperação dos corpos hídricos de forma pronunciada no século XX (AITH; ROTHBARTH, 2015).

No Brasil, ainda em 1797, em carta régia, o governo de Portugal toma posse dos rios nascentes e encostas e destaca a necessidade de sua proteção. Em 1934, o Código das águas foi decretado por Getúlio Vargas (AMADO, 2014). O decreto 24.643 amparava legalmente a construção massiva de hidrelétricas pelo Brasil (CETESB, 2020), dando poderes de gerenciamento enormes para as empresas que se dispusessem a construir hidrelétricas, com capítulo específico para a energia hidráulica (BRASIL, 1934).

As décadas de 70 e 80 foram cruciais para o debate da água potável, com comissões internacionais debatendo disponibilidade e potabilidade da água (AITH; ROTHBARTH, 2015). A lei 6.938, da Política Nacional do Meio Ambiente, foi promulgada em 1981 (BRASIL, 1981).

Na década de 1990, após a Conferência Internacional sobre Água e Meio Ambiente realizada na Irlanda, o debate da necessidade de planos de gerenciamento dos recursos hídricos de cada país culminou com a promulgação da lei 9.433/97, a Lei de Gerenciamento Nacional dos Recursos Hídricos (BRASIL, 1997). A criação de Agências reguladoras como a ANA – Agência Nacional das Águas e comitês delimitando a área de atuação dentro de uma bacia integrou ao corpo

jurídico brasileiro uma noção biológica que ultrapassa os limites físicos estaduais. A consideração da bacia hidrográfica como unidade de gestão hídrica foi um avanço para a conservação das águas.

Os esforços legislativos também refletiram nas normativas dos órgãos reguladores, com o objetivo de aferir a qualidade da água e para impedir contínuo descaso com os recursos hídricos. A resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), por exemplo, fixou classes de água em parâmetros físicos e químicos, e direcionou instrumentos e tipos de uso para o qual cada classe de água poderia ser utilizada. Águas localizadas próximas a centros urbanos são historicamente de baixa qualidade, com elevados níveis de eutrofização e contaminação (ANA, 2017).

Se no quesito industrial as normatizações e certificados produzem efeitos, no âmbito populacional, de educação ambiental, ainda há dificuldades. A preservação dos recursos hídricos é esporadicamente ministrada, normalmente associada às catástrofes como enchentes e secas, mas pouco em relação a distribuição, uso, regulação e política de gerenciamento dos corpos hídricos (LAYRARGUES, 2012; OLIVEIRA, 2008).

O conhecimento sobre a qualidade da água é fundamental para a população, para o desenvolvimento econômico e para planejamento público. O pensamento socioambiental é muito mais debatido nos empreendimentos que querem utilizar os recursos hídricos atualmente. A própria instalação de novos reservatórios é precedida por estudos de viabilidade e impactos ecológicos (Tundisi et al, 2015).

2.2 Ecologia de reservatórios e impactos ambientais sobre os recursos hídricos

Reservatórios são construções artificiais que alteram o curso de água de corpos hídricos lótico, transformando-os em um intermediário entre lântico e lótico (TUNDISI, 1999). As características ecológicas dentro de um reservatório são únicas, visto que o tempo de residência, sedimento e composição do mesmo e características biológicas dependem da biogeografia da região (TUNDISI *et al.*, 2015), tipo de solo, e volume represado. Sá Junior (1994), por exemplo, afirma que o formato dendrítico do Reservatório de Furnas, em Minas Gerais, facilita a sua

eutrofização. Reservatórios com profundidades maiores são capazes de se estratificar em zonas verticais com diferentes temperaturas (ALLAN, 1995), a sua construção altera a quantidade de nutriente a jusante, de acordo com seu tamanho (JI, 2007; MAAVARA *et al.*, 2015).

Os processos físicos e químicos de um reservatório são distintos de corpos lênticos e lóticos naturais. Enquanto em rios os gradientes de variação ecológica, como biomassa, riqueza e temperatura ocorrem longitudinalmente e se relacionam com a biogeografia local, em lagos (e reservatórios) estes processos são verticais e temporais (DENT *et al.*, 2002). O processo de represamento de um corpo hídrico diminui a diversidade de espécies (WU *et al.*, 2019), aumenta a concentração de nutrientes na barragem, como o fósforo (MAAVARA *et al.*, 2015) e colabora para o processo de eutrofização.

No Brasil existem 290 bilhões de m³ de água represados (ANA, 2017). Os usos da água no Brasil são majoritariamente para a irrigação, abastecimento urbano e indústria. Estima-se que cerca de 291,5 m³.s⁻¹ da água utilizada em irrigação, 397m³.s⁻¹ da água utilizada em abastecimento urbano e 41,7 m³.s⁻¹ de água para uso animal retornem para os corpos hídricos, além da água pluvial (ANA, 2017). Estes volumes de água que retornam, porém, não possuem a mesma qualidade com a qual foram extraídas. Projetos de remediação *in loco* e nos dutos de esgoto antes do despejo em lagos foram criados e aprimorados para evitar a degradação contínua dos recursos hídricos.

Para além das mudanças decorrentes dos ciclos biogeoquímicos, a construção de represas atrai a ocupação humana, que conseqüentemente causa impactos aos recursos hídricos. Com a ocupação humana, os impactos sobre o reservatório artificial começam a se pronunciar. Os múltiplos usos de um reservatório, firmado no primeiro artigo da lei 9.433/97, considera que a construção dos reservatórios também proporcione outras atividades, *e.g.*: piscicultura, lazer, dessedentação animal, geração de energia elétrica (BRASIL, 1997).

Apesar dos esforços sobre a preservação das águas, há muito a que se fazer em território brasileiro. Há, ainda hoje, deficiência na prestação de serviço de saneamento e de abastecimento de água. Em pesquisa do IBGE em 2008, ficou constatado que 6,2% dos municípios brasileiros tratam a água para consumo de forma parcial, e que 6,6% dos municípios não possuem nenhum tipo de tratamento (IBGE, 2008).

O consumo de água sem tratamento adequado pode provocar inúmeros malefícios para a comunidade que circunda e utiliza o recurso hídrico. Desde parasitoses a intoxicações, como de *Giardia spp.* (CETESB, 2018), e com a toxicidade dos poluentes orgânicos persistentes (POP), oriundos do arsenal químico utilizado nas lavouras (MANSANO *et al.*, 2017 e despejados pelas indústrias (KHATRI; TYAGI, 2015), além dos medicamentos despejados pelo esgoto doméstico (FENT *et al.*, 2006).

Se uma cidade não possui tratamento de esgoto e descarta sobre o corpo hídrico dezenas de compostos com profundo impacto, e a próxima cidade não possui um sistema eficaz de tratamento de água, é possível concluir que os habitantes da comunidade a jusante sofrerão impactos na saúde pública (PRAT *et al.*, 1999; SABATER *et al.*, 2018). Por exemplo, mesmo em locais com tratamentos de esgoto, estudos já detectaram resquícios de hormônios sintéticos como 17 α -etinilestradiol (EE2) em filtros de carvão da água de abastecimento público (FURTADO; VON MÜHLEN, 2015).

Com o advento da lei 11.445/07 (BRASIL, 2007), amparada pelo artigo 6º. da Constituição Federal (BRASIL, 1988), foi imposto – ou reafirmado - ao estado o dever da coleta e tratamento de esgoto nos municípios brasileiros. Em 2019, 1.546 municípios brasileiros ainda não possuíam sistema de esgotamento sanitário, o do esgoto gerado no Brasil, somente 46,3% deste é tratado (BRASIL, 2019).

Tendo em vista estas constatações, a precariedade do sistema de abastecimento e saneamento representam fatores cruciais e de necessário estudo sobre os compostos que estão poluindo os corpos hídricos brasileiros e afetando a biota como um todo.

A industrialização e os avanços químicos possibilitaram a proliferação de compostos produzidos em grandes quantidades. Estes compostos podem contaminar os cursos hídricos, seja por deposição, lixiviação, ou por infiltração até o lençol freático e águas subterrâneas (HOLT, 2000). Willis (1982) demonstrou a presença de herbicidas em corpos hídricos e relacionou com a lixiviação de culturas agrícolas próximas. Outros estudos também demonstraram a contribuição da lixiviação de compostos estrogênicos (NICHOLS *et al.*, 1997) e ftalatos (CLARA *et al.*, 2010) para os corpos hídricos.

Muitos tributários pequenos, que desembocam dentro dos grande efluentes brasileiros não possuem proteção de mata ciliar (COSTA, 2017; LIMA JR., 2018; JAKIEVICIUS, 2011), como preconiza a lei ambiental de 12.651 de 2012 (BRASIL, 2012). A falta de mata ciliar provoca erosão do solo e o despejo deste sobre o leito do rio, causando assoreamento (BROETTO *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2015) e eutrofização pelo excesso de nutrientes (CUNHA *et al.*, 2010). Protegida desde a legislação ambiental de 1965, as matas ciliares são paisagens heterogêneas, mas vitais para a saúde do corpo hídrico (LAGO, 2012). O descaso público e a expansão da atividade agropecuária têm sistematicamente suprimido as matas ciliares (LAGO, 2012; COSTA, 2017) Além dos compostos orgânicos do solo, compostos utilizados na agricultura, como herbicidas e pesticidas também escorrem para o leito do rio por lixiviação (NICHOLS *et al.*, 1997). CETESB (2018) relatou que as mortandades de peixes que fiscalizou em 2017 foram causadas por contaminação por lixiviação de defensivos agrícolas, vazamentos de estação de tratamentos de água (ETA), e de acidentes com derramamento em estradas. A supressão da mata ciliar, segundo o relatório, agravou a situação de contaminação. Lovell & Sullivan (2006) demonstraram os benefícios da mata ciliar sobre o montante de poluentes sobre os rios, podendo diminuir até 95% do aporte de fósforo.

A poluição do corpo hídrico não vem somente de carreamento por lixiviação, mas também é diretamente lançado sobre o curso hídrico, em esgoto doméstico e resíduos industriais. Com o crescente aumento da população humana cresce também a demanda pelos recursos hídricos, juntamente com o impacto sobre estes com os despejos domésticos e industriais. Grande parte da poluição hídrica é proveniente destes efluentes e da agricultura (SONG *et al.*, 2010).

De origem urbana, os maiores contaminadores são as descargas domiciliares e industriais, que contaminam tanto os efluentes superficiais como os lençóis freáticos (KHATRI; TYAGI, 2015). Os impactos da agricultura sobre os rios são também bastante expressivos, seja pela atividade seja por má gestão dos processos realizados (KHATRI; TYAGI, 2015; VALIELA; BOWEN, 2002).

Os contaminantes presentes nesses despejos, como metais, agrotóxicos, antibióticos e hormônios, representam um risco à população, como já foi frisado, mas principalmente sobre a comunidade aquática, que está exposta ao meio e recebe passivamente todos os resíduos ali depositados. Muitos dos compostos químicos já fabricados pelo ser humano, estimados em mais de 90.000 (NICHOLS *et al.*, 1997), ainda não possuem dados suficientes sobre os seus impactos

ao meio ambiente. Os estudos ecológicos sobre os efeitos e permanência destes compostos na natureza devem ser fomentados. A pesquisa sobre os impactos de fármacos sobre a saúde dos corpos hídricos e das comunidades aquáticas é questão de saúde pública.

2.3 Poluentes e seus impactos nos ecossistemas aquáticos

2.3.1 Poluentes derivados de esgoto

Nos corpos hídricos, existe um complexo sistema de interação entre os seres vivos e o ambiente. Os corpos hídricos dulcícolas podem passar por processos, naturais ou antropogênicos, que alteram a sua qualidade mineral, pH, sua transparência, concentração de toxicantes, e todas estas características influenciam diretamente na qualidade de vida de qualquer ser vivo que necessita daquele recurso hídrico (KHATRI; TYAGI, 2015). A falta de um tratamento adequado dos resíduos industriais e sanitários é o principal fator de preocupação para com a saúde dos corpos hídricos brasileiros, que estão recebendo ininterruptamente descargas de compostos sobre os seus leitos.

O trabalho de Oliveira (2014) descreveu três rotas para o destino de fármacos despejados sobre os recursos hídricos: eles podem ser mineralizados por micro-organismos, metabolizados e degradados parcialmente ou serem persistentes no ambiente.

Compostos de maior interesse na saúde e de grandes concentrações nos corpos hídricos podem ser analisados através da sua cinética e meia vida. Sobretudo a fotólise parece ser uma via primordial na catalisação e degradação de compostos despejados nos corpos hídricos (BOREEN *et al.*, 2003), com compostos tendo meia vida de dias, meses ou anos (SCHERINGER *et al.*, 2012; ASHRAF, 2017). A degradação de um composto depende da temperatura, irradiação solar, grau de eutrofização do corpo hídrico e profundidade (EBELE *et al.*, 2017). Além disto, a biodisponibilidade de cada composto e sua interação com os organismos presentes no ambiente é diferencial, portanto, a análise de toxicidade de cada compostos é importante.

A destarte da grande quantidade de esgoto no Brasil que não é tratado, muitas das estações de tratamento atuais não são capazes de filtrar e eliminar todos os compostos que são despejados e chegam à estação de tratamento, com hormônios, analgésicos e anti-inflamatórios sendo detectados em amostras após a estação de tratamento de esgoto (AQUINO *et al.*, 2013). Estudos estão avançando métodos para conseguir retirar estes compostos, como por lodo ativado (BERNARDELLI *et al.*, 2015), atividade bacteriana (SUYAMUD *et al.*, 2018) e fitorremediação com o uso de macrófitas (ZHANG *et al.*, 2017).

Um composto exógeno considerado indicador de impacto de origem humana é a cafeína. O composto já foi encontrado em virtualmente todos os corpos hídricos impactados por ações antrópicas onde foi testada a sua presença. Nos Estados Unidos, valores médios de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína são esperados em corpos hídricos antropizados (KOLPIN *et al.*, 2002), e vêm sendo utilizada como padrão para extrapolar os valores de outros compostos também presentes no corpo hídrico (MONTAGNER *et al.*, 2014). Testes de toxicidade com a cafeína no cladóceros *Ceriodaphnia dubia* retornaram, porém, valores muito mais altos (ao redor de 50mg.L^{-1}) dos que os encontrados naturalmente em corpos hídricos (MOORE *et al.*, 2008). Vale destacar que fontes recorrentes de lançamento destes compostos, e lançamentos pontuais e em excesso podem causar efeitos ainda não elucidados em pesquisas.

Este despejo de poluentes possui efeitos sistêmicos, visto que podem influenciar as comunidades aquáticas e alterar o equilíbrio ecossistêmico. Em revisão de eficiência de tratamentos de esgoto na remoção de compostos farmacêuticos, Fent *et al.* (2006) demonstrou que a remoção é desigual, dependendo do país, estação do ano, da concentração, com valores desde 0% a 75 % de remoção de Diclofenaco, e concentrações de Ibuprofeno sendo diminuídas de $28 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $3 \mu\text{g.L}^{-1}$. Mais do que a remoção, a presença destes compostos em concentrações tão altas é fator de preocupação.

Duas outras classes de compostos que estão em contínuo crescimento e são reflexo da urbanização no mundo são os plastificantes, como o bisfenol-A, e substâncias entorpecentes. Em estudo realizado na Inglaterra (ARCHER *et al.*, 2017), substâncias como cafeína, codeína, bisfenol-a, fluoxetina e metabólitos de cocaína foram encontrados a montante e a jusante da estação de tratamento de esgoto.

Mesmo que a degradação de alguns compostos seja curta, como é o exemplo da cafeína, que se degrada em 1 dia e meio no meio aquático, a contínua deposição destes compostos sobre o leito hídrico constitui um valor crônico e constante e pode produzir efeitos de longo termo nos organismos aquáticos (MOORE *et al.*, 2008). Além disto, a assimilação destes compostos por organismos aquáticos afetará toda a cadeia trófica que se alimenta deste, biomagnificando os compostos. Em estudo também conduzido na Inglaterra, crustáceos foram encontrados com concentrações em ng.L^{-1} de cocaína, lidocaína, nicotina entre outros compostos (MILLER *et al.*, 2019). Na Austrália, o estudo de Richmond *et al.* (2018) demonstrou a possível transferência na cadeia trófica aquática para terrestre, com insetos adultos, base alimentar de organismos de borda de lagos, possuindo concentrações de antiepilépticos, antidepressivos e antibióticos.

Os compostos biodisponíveis nos corpos hídricos afetam toda a biodiversidade. Em peixes como *Danio rerio*, a exposição a diclofenaco altera a eclosão (GARRIC *et al.*, 2006). Em tilápia (*Oreochromis niloticus*), metais pesados provam danos testiculares (ABDEL-KHALEK, 2018). Em microcrustáceos, a exposição à cisplatina diminuiu a sobrevivência de *Daphnia pulex* e *Daphnia pulicaria* (GRZESIUKA *et al.*, 2019).

Compostos desreguladores endócrinos também são constantemente encontrados em corpos hídricos, derivados tanto de compostos artificiais, como o 17α -etinilestradiol, quanto da produção endógena, como estrógeno e estriol. Os compostos análogos à hormônios representam nova preocupação sobre a contaminação dos cursos hídricos, seja pelos organismos presentes na água (GOTO; HIROMI, 2003), seja pela ineficiência de se retirar todos os compostos com os tratamentos convencionais (REIS FILHO, 2008), seja pelo consumo destes compostos pela população no abastecimento de água (FURTADO; VON MÜHLEN, 2015).

Em condições ótimas a degradação de compostos hormonais por completo leva dias, período este maior em condições desfavoráveis (KOUMAKI *et al.*, 2015). Em estudo de Fonseca *et al.* (2011), hormônios estrógenos demoraram 126 dias para serem totalmente degradados. REIS FILHO (2008) também atenta para a combinação sinérgica entre os compostos, que pode aumentar os efeitos deletérios e aumentar a permanência destes contaminadores na água. O estudo de Cailleaud *et al.* (2011), demonstrou que copépodes submetidos à 17α -etinilestradiol (EE2), um hormônio esteroide sintético, apresentaram números de compostos estrogênico 4 vezes maior do que o grupo não submetido ao estrógeno EE2, portanto, provando que há assimilação e que a

concentração hormonal é desregulada exogenamente. Tal concentração elevada seguirá o curso da cadeia trófica, afetando seus predadores e assim por diante, configurando em biomagnificação do composto. EE2 também já demonstrou interferir em aspectos reprodutivos e de sobrevivência de *Daphnia magna* (CLUBBS; BROOKS, 2007). Outros disruptores endócrinos, como 17 β -estradiol (E2) e Bisfenol-A também já demonstraram alterar a fisiologia de microcrustáceos (BRENNAN, 2006). Em efluentes contaminados com esgoto, peixes machos possuem menor concentração de testosterona e maior de 17 β -estradiol (FOLMAR et al, 2001).

A quantidade de hormônios lançadas sobre as águas pelo esgoto é colossal. Segundo Adeel *et al.* (2017), naquele ano cerca de 30.000 kg de estrógenos naturais, Estrona, Estradiol e Estriol (E1, E2 e E3), foram descartados. Segundo o mesmo estudo, 700 kg do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) também sofreram o mesmo destino.

Poucas estratégias são direcionadas para a eliminação de compostos hormonais nas estações de tratamento de água (ETA) e de esgoto (ETE). Tanto ETEs quanto ETAs não estão equipadas suficientemente para tratar os compostos hormonais (FONSECA et al, 2011). Aquino *et al.* (2013) afirmam que:

“No caso dos hormônios naturais e sintéticos e dos xenoestrogênios, as concentrações encontradas nas matrizes ambientais brasileiras mostram-se semelhantes ou até três ordens de grandeza superiores às concentrações comumente relatadas na literatura internacional.” (AQUINO et al, 2013, p. 189).

No estudo de Tang *et al.* (2012), os pesquisadores encontraram a concentração de 17,6 ng.L⁻¹ de 17 β -estradiol. Uma reportagem da Universidade Federal de Campinas (Unicamp) relatou concentrações de 3 μ g.L⁻¹ de estradiol, 1,7 μ g.L⁻¹ de EE2 e 1,4 μ g.L⁻¹ de progesterona (LEVY, 2006). Ferguson *et al.* (2013) reportaram 29 μ g.L⁻¹ de estrógenos em efluentes de ETE australianos.

Em locais sem tratamento de esgoto, os valores de compostos despejados pelo esgoto podem ser muito maiores do que os aqui relatados. A população que faz uso direto do recurso hídrico, sem que este passe por tratamento antes de sua distribuição, também sofre risco de contaminação por estes compostos. O aumento da preocupação com os compostos despejados sobre os recursos hídricos vem produzindo diversos estudos com métodos de remediação e remoção de compostos não degradados pelo tratamento convencional: macrófitas reduziram a

concentração de bisfenol-A (ZHANG *et al.*, 2017), fotocatalise para remoção de 17α -etinilestradiol (MARTINS, 2017), e até oxidação eletroquímica por ultrassom (DIETRICH *et al.*, 2017).

As atividades industriais promovem um despejo de resíduos sobre os corpos hídricos que é heterogênea e depende da especificidade de cada empreendimento. Dos resíduos de processos industriais, Literathy (1996) os agrupou em 4 tipos: resíduos de alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e alta toxicidade; baixa DBO e alta toxicidade; biodegradáveis de alto DBO e termais (de temperaturas diferentes do corpo hídrico). Apesar de baixa DBO, os resíduos de metais são muito prejudiciais à biota aquática, por seu elevado nível de toxicidade. Muitos metais são lançados aos corpos hídricos nas águas residuais da indústria, como arsênio, cádmio, cobre, chumbo e prata (FUNASA, 2014).

Plastificantes também são compostos comuns nos resíduos industriais. Ashraf (2017) discorreu sobre os poluentes orgânicos persistentes (POP) e frisou que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, um tipo de POP, são comumente encontrados em regiões industriais. O estudo de Qi *et al.* (2011), examinando hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) em efluentes de uma estação de tratamento de esgoto na China, encontrou valores de até $138,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ dissolvidos na água. Neste mesmo estudo, os valores de HAPs no sedimento eram maiores, em média, do que os valores dissolvidos em água.

Como visto, resíduos industriais são complexos e demandam estudos aprofundados sobre os impactos do tipo particular de composto que lançam sobre o corpo hídrico. A necessidade de tratamento dos efluentes industriais foi dada com a promulgação da resolução CONAMA número 430/11 (BRASIL, 2011), onde também foi proibida o despejo de compostos POP sobre os recursos hídricos. Na resolução, foram incorporados conceitos de toxicidade como CL_{50} (Concentração letal 50%); e CENO (Concentração de Efeito Não-Observado), de onde valores mínimos para a sobrevivência da comunidade aquática são estabelecidos.

2.3.2 Poluentes derivados de lixiviação

Outra fonte de despejo de compostos sobre os corpos hídricos advém da lixiviação. O ciclo das chuvas promove a deposição contínua para os corpos hídricos, necessários para a sua manutenção, principalmente de compostos de fatores limitantes, como fósforo (P) e nitrogênio (N). Youlton *et al.* (2016) demonstraram que chuvas de mais de 5mm em 10 minutos, ou acima de 15mm de precipitação, desencadeiam lixiviação em solo de pastagem ou de monocultura como a cana-de-açúcar. Já que há enriquecimento do solo em praticamente todas as culturas agrícolas, o excesso de nutrientes no solo é carregado para o corpo hídrico mais próximo.

A aplicação de insumos agrícolas, principalmente desregulados e em demasia, resultará em lixiviação destes compostos para os cursos hídricos. Um estudo no Chile (CLIMENT *et al.*, 2018) quantificou pesticidas na superfície de rios e encontrou diversos em concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ até 14.707 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do pesticida Simazina em um dos pontos. (BORTOLUZZI *et al.*, 2007) identificaram, no Rio Grande do Sul, Brasil, concentrações médias de 0.09 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4.53 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de chlorpyrifos e imidacloprid, respectivamente. Em estudo de grande esforço amostral na Hungria (SZÉKÁCS *et al.*, 2015), acetocloro e atrazina foram encontrados em concentrações de até 10.000 ng.L^{-1} em água de torneira. Os pesticidas trifluralina, atrazina, lindano, diazinon, e metolacoloro também foram encontrados nas amostras analisadas. Até águas subterrâneas, por infiltração no solo, possuíam concentrações de glifosato na ordem de 500 a 1000 ng.L^{-1} .

A lixiviação é um fator importante na contribuição de resíduos para os lagos. Em lagos até 750 metros de distância de um estabelecimento de criação bovina, concentrações hormônios estrógenos de até 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram encontradas, e 17 α -etinilestradiol foi encontrado em concentrações entre 3 e 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LI *et al.*, 2012). O estudo de Nichols *et al.* (1997) mostrou que a aplicação de resíduos orgânicos de granja em pastagem provoca a lixiviação de 17 β estradiol, em valores proporcionais aos depositados no pasto. Concentrações de até 1,100 ng.L^{-1} de 17 β -estradiol em corpos d'água, provenientes de lixiviação em criação de gado, foram encontradas por Bartelt-Hunt *et al.* (2012).

A contaminação do corpo d'água por resíduos orgânicos derivados dos processos agropecuários são evidentes e representam grande potencial de dano. Enquanto o despejo de compostos estrogênicos domésticos foi estimado em 30.000 kg por ano, a estimativa da pecuária dos Estados Unidos e da União Europeia foi de 83.000 kg por ano (ADEEL *et al.*, 2017). A pecuária também aumenta a quantidade de compostos lixiviados para os corpos d'água, seja pelo

pisoteamento do gado, supressão vegetal e consequente erosão (MERTEN; MINELLA, 2013), seja pelos compostos derivados das excreções destes animais (LI *et al.*, 2015).

A lixiviação também ocorre em estradas pavimentadas, de onde plastificantes e derivados do petróleo são carreados pela chuva até corpos d'água ou para as ETEs. Clara *et al.* (2010) demonstrou concentrações entre 0.45 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de di(2-etil-benzil)ftalato derivados de lixiviação em estradas austríacas. Lixiviação em estradas pode advir tanto da composição asfáltica, quando dos herbicidas utilizados para impedir o crescimento de plantas ao redor da estrada. Huang *et al.* (2005) demonstrou concentrações de glifosato e diuron de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ até a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de oryzalin derivados de lixiviação em estradas

Com o aumento da medicalização das criações de gado, novos compostos estão sendo produzidos para atender demandas como a sincronização do cio em fêmeas e aumento da produção leiteira. Atenção para esta nova via de contaminação das águas deve ser promovida, visto que a atividade pecuária no Brasil tem aumentado e possui prognóstico de continuar crescendo.

As legislações do século XX, de fato, melhor controlaram os impactos gerados pela implantação da atividade industrial, a citar a lei ambiental 6.938/81 (BRASIL, 1981), aliada à constituição de 1988, que apregoou em seu artigo 225, caput, que “*todos têm direito a um meio ambiente equilibrado*” (BRASIL, 1988). A lei de crimes ambientais 9.605 de 1998 introduziu a possibilidade do meio ambiente ser um sujeito de direitos, e sofrer impactos que podem ser considerados crimes (BRASIL, 1998).

3 COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA

A comunidade zooplanctônica é classicamente formada por três grupos: O filo Rotifera, a ordem Copepoda e o grupo Cladocera, formado pelas ordens Ctenopoda e Anomopoda, e outros grupos que ocorrem esporadicamente no plâncton, como Ostracoda, protozoários e larvas de inseto (WETZEL; LIKENS, 2000).

A presença dos organismos zooplanctônicos nos corpos hídricos é ampla, com representantes copépodos deste a Antártica (WARD; SHREEVE, 1995) até a zona tropical, em lagos efêmeros (YEVDOKIMOV; YERMOKHIN, 2009), cavernas (FARASHI *et al.*, 2014) e rios. O zooplâncton é um importante elo de transferência de energia entre os produtores e os consumidores secundários (JONES; HENDERSON, 1987), diretamente influenciando em crescimento de peixes (MÖLLMANN *et al.*, 2005). Loureiro *et al.* (2011) demonstraram a influência da presença de criação de peixes em tanques-rede na biomassa de zooplâncton no reservatório de Itá, em Santa Catarina. Não somente *bottom-up*, como no exemplo anterior, mas também influências do zooplâncton sobre a diversidade de algas e a diminuição de algas tóxicas, como as cianofíceas, também já foi comprovada (EKVALL *et al.*, 2014).

A comunidade zooplanctônica não se distribui uniformemente dentro dos corpos hídricos, e a presença ou ausência de determinada espécie pode ser utilizada como bioindicador de certa característica da água. Companhias de distribuição de água utilizam, por exemplo, índices de qualidade de água derivados de análise da abundância de copépodos ciclopoide e calanoides (CETESB, 2018). A eutrofização e piora da qualidade da água também reflete em mudança estrutural da comunidade zooplanctônica. Rietzler *et al.* (2002) registraram a substituição do Copepoda Calanoida *Argyrodiaptomus furcatus* pelo Copepoda Calanoida *Notodiatomus iheringi* em águas eutrofizadas.

Além dos copépodos, os rotíferos são importantes no ecossistema aquático e na determinação da qualidade da água. Sendo um filo resistente às condições mais extremas de sobrevivência, os rotíferos são registrados em ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido (CHANG *et al.*, 2013), pH baixo (DENEKE, 2000), com turbidez elevada (POLLARD *et al.*, 1998), e ambientes eutróficos (ISMAIL; ADNAN, 2016). Em especial, os gêneros *Keratella* e *Brachionus* possuem muitos representantes característicos de águas eutróficas (PEDROZO; ROCHA, 2005).

O grupo Cladocera é de especial importância na determinação da qualidade da água, tanto por ser um grupo de organismos sensíveis a mínimas alterações físicas e químicas na água, quanto por habitarem zonas diferenciais dentro do corpo hídrico. Em estudo de Espíndola *et al.* (2000), no reservatório Tucuruí, observou-se heterogeneidade espacial na distribuição das espécies de Cladocera, com *Moina minuta*, *Ceriodaphnia cornuta cornuta* e *Diaphanosoma birgei* dominando

diferentes compartimentos do reservatório. Pedrozo; Rocha (2005) registraram os Cladocera *Bosmina longirostris* e *Moina micrura* em locais mais poluídos e concluíram que estes são Cladocera tolerantes à poluição orgânica.

De forma geral, os Cladocera possuem reprodução partenogênica, assexuada, e somente em situações de estresse reproduzem sexuadamente (SUHETT et al, 2015). Quando reproduzem sexuadamente, produzem ovos maiores, com maior quantidade de vitelo, estes denominados ovos de resistência (MUGRABE *et al.*, 2007). Estes ovos possuem longevidade muito maior do que os ovos partenogênicos, e estes permanecem no sedimento até perceberem condições favoráveis para a eclosão (RADZIKOWSKI, 2013). Ao estudar o sedimento de um lago, as camadas depositadas de ovos de dormência são um registro histórico dos impactos sofridos naquele corpo hídrico (SMIRNOV, 2017).

A comunidade zooplanctônica pode, portanto, ser dividida em comunidade ativa, a que está presente na coluna d'água e desempenhando suas funções ecossistêmicas, e a comunidade passiva, caracterizada como o banco de ovos no sedimento, que eclodirão em momento oportuno e contribuirão para a diversidade de espécies (ESKINAZI-SANT'ANNA; PACE, 2018). Panarelli *et al.* (2008) e Freiry *et al.* (2020) demonstraram diferenças entre as espécies presentes na comunidade ativa e na comunidade passiva.

A análise da comunidade zooplanctônica é uma boa alternativa para a aferição da qualidade da água por meio de bioindicadores. Órgãos governamentais já utilizam os microcrustáceos como parâmetro para medir a qualidade da água (CETESB, 2018). As diferentes sensibilidades das espécies de microcrustáceos é utilizada para, por exemplo, avaliar as condições de maior ou menor eutrofização do corpo hídrico (CHANG *et al.*, 2013).

3.1 O uso da comunidade zooplanctônica na qualidade e toxicidade da água

Sendo espécimes que possuem espectros ótimos para sobrevivência e reprodução, a análise da comunidade zooplanctônica não só descreve a diversidade local, mas também, por correlação, a qualidade da água (MATSUMURA-TUNDISI *et al.*, 1990; REN *et al.*, 2011). Bioindicadores do

zooplâncton são utilizados por agências reguladoras e companhias de tratamento de água para inferir qualidade da água (CETESB, 2018). Apesar de não alterar a estrutura da comunidade, a abundância e biomassa de zooplâncton em um corpo d'água demonstram, por exemplo, flutuações de população decorrentes de alguma variação física ou química, como despejo de nutrientes (GONZALEZ, 2000) e florescimento de cianobactérias (PAES *et al.*, 2016).

Espécies de Rotifera são consideradas abundantes em corpos d'água de baixa qualidade, por serem de reprodução rápida e tolerarem condições mais extremas (ISMAIL; ADNAN, 2016). Santos (2014) demonstrou que em reservatórios eutrofizados há dominância de Cyclopoida e de Rotifera. No estudo de Goździejewska e Tucholski (2011), uma lagoa que recebia constante água residuais tratadas apresentou grande densidade de indivíduos do filo Rotifera. A dragagem dos sedimentos de um lago diminuiu a quantidade de organismos deste filo e aumentou a quantidade de Crustacea (ZHANG *et al.*, 2010).

A qualidade da água não perpassa somente o aporte de nutrientes e a eutrofização, mas também a contaminação por compostos exógenos, derivados de atividades antrópicas. Os efeitos deletérios destes compostos são percebidos em diversos grupos aquáticos. Em copépodes do gênero *Bryocamptus* expostos a aldicarb, um agrotóxico, houve retardamento de seu desenvolvimento e muda (DI MARZIO *et al.*, 2013). Em cladóceros, Navis *et al.* (2013) demonstraram que os pesticidas fenoxycarb e carbaryl não só afetam a comunidade ativa, mas também a viabilidade dos ovos de resistência de *Daphnia magna*.

Tendo em vista a preservação ambiental, a manutenção da diversidade de espécies nos corpos hídricos e a qualidade da água, a análise da comunidade zooplanctônica e os testes de toxicidade são cruciais para tomadas de decisão, promover diretrizes e determinar urgências para manipulação do ambiente.

Um dos bioindicadores que vêm sendo historicamente utilizado para este propósito é o crustáceo *Daphnia magna*. O microcrustáceo é utilizado ao redor do mundo para testes ecotoxicológicos e verificação de compostos nocivos (KANG *et al.*, 2014). O estresse ambiental desencadeia mudanças genéticas, de reprodução e de sobrevivência (KATO *et al.*, 2011). Haeba *et al.* (2008) demonstrou a toxicidade de pesticidas e a indução de machos em concentrações sub-letais. A indução de machos em Cladocera ocorre quando os organismos percebem variações

deletérias na qualidade da água, na falta de alimento e quando expostos a contaminantes que alteram a sua fisiologia (SMIRNOV, 2017). Compostos hormonais como testosterona (BARBOSA et al, 2008), dietilstilbestrol e bisfenol-A também foram testados em *Daphnia magna* (BRENNAN et al, 2006), reduzindo a capacidade reprodutiva e causando mortalidade de metade dos indivíduos nos valores de 1,55 mg.L⁻¹ e 7,75 mg.L⁻¹, respectivamente.

Avaliar os níveis de toxicidade de compostos em organismos padronizados é importante para definir estratégias públicas de averiguação e controle dos compostos despejados na água. Há, porém, espécies endêmicas brasileiras, que possuem maior sensibilidade e respondem diferentemente à compostos exógenos, como herbicidas (MOREIRA *et al.*, 2014), e podem representar melhor os efeitos ecossistêmicos no ambiente de água doce afetado por estes compostos. Portanto, a análise toxicológica em espécimes que ocorrem naturalmente no ambiente estudado é importante para perceber o real impacto gerado pelos toxicantes. No Brasil, por exemplo, a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* é padronizada (ABNT, 2017) e é também utilizada como organismo-teste em ensaios de toxicidade. Estudos demonstrando valores diferenciais de toxicidade das espécies endêmicas, como o Cladocera *Ceriodaphnia sp.*, mesmo comparado à outras espécies de cladóceros já existem na literatura (VERSTEEG *et al.*, 1997; LAMEIRA, 2008; MOREIRA *et al.*, 2014).

3.2 O Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii* como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos da região tropical.

A espécie de zooplâncton *Ceriodaphnia silvestrii* DADAY, 1902 (Crustacea, Daphnidae), endêmica do Brasil e Argentina, e amplamente utilizada em estudos limnológicos e de qualidade da água. O microcrustáceo têm tamanho médio de 1 mm, fecundidade de 9,4 +- 4,17 ovos por fêmea e longevidade média de 30 dias (FONSECA, ROCHA, 2004).

No Brasil, o gênero *Ceriodaphnia sp.* (Crustacea, Cladocera) é empregado em análises toxicológicas a alguns anos (ALVES; COBO, 2013; POMPÊO et al, 2015), com ciclo de vida já publicado (FONSECA; ROCHA, 2004), ensaios toxicológicos padronizados (FONSECA, 1991;

OLIVEIRA NETO; MATSUMURA-TUNDISI, 2000; JACONETTI, 2005) e normatizações da ABNT para experimentos de toxicidade (ABNT, 2017).

Toxicidade de inúmeros compostos sobre *Ceriodaphnia silvestrii*: carbofuran com toxicidade aguda de $0,86 \mu\text{g L}^{-1}$ e diuron de $7436,40 \pm 697,50 \mu\text{g L}^{-1}$ (MANSANO, 2016); corante comercial Disperse Red 1 com CE_{50} de $0,78 \text{ mg.L}^{-1}$ (VACCHI, 2012); acetaminofeno (paracetamol) com CE_{50} de $40,3 \text{ mg.L}^{-1}$, propranolol de $3,17 \text{ mg.L}^{-1}$ e diclofenaco de $37,9 \text{ mg.L}^{-1}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2018); óxido de cobre com CE_{50} de $12,6 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ (MANSANO *et al.*, 2018); abamectina com EC_{50} de $1,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CASALI-PEREIRA *et al.*, 2015) e florfenicol com CE_{50} de $26,19 \text{ mg.L}^{-1}$ e Oxitetraciclina com CE_{50} de $17,08 \text{ mg.L}^{-1}$ (FREITAS *et al.*, 2018).

A análise toxicológica em *Ceriodaphnia silvestrii* é importante para compreender as reais dimensões dos compostos lançados sobre as águas brasileiras, pois são organismos encontrados endemicamente no país. Visto que, segundo a literatura científica até o momento, os valores de toxicidade em *C. silvestrii* tendem a ser menores do que no organismo internacional padrão, *Daphnia magna*, o uso de espécies exóticas para avaliações de toxicidade de poluentes é amplamente discutido, no entanto, a ausência de dados para espécies nativas, dificulta o fortalecimento de tais discussões,

4 OBJETIVO GERAL

Este estudo visou analisar os impactos antrópicos em um reservatório através da análise da composição e diversidade da comunidade zooplancônica em dois episódios de mortandade de peixes e correlacionando os aspectos físicos, químicos e biológicos e seus efeitos sobre a mortandade. Além disso, o estudo também visou analisar os efeitos de toxicidade aguda e crônica dos compostos Cloprostenol, utilizado na criação pecuária, 17α -etinilestradiol, composto sintético hormonal comumente encontrado em lançamentos de efluentes domésticos, e Estrona, hormônio natural comumente encontrado em lançamentos de efluentes domésticos, por meio de testes de toxicidade agudos e crônicos com o cladóceros padronizado pela ABNT (ABNT, 2017) *Ceriodaphnia silvestrii*. Para além da toxicidade destes compostos, que podem advir tanto da lixiviação em terrenos rurais quanto pelo esgoto sanitário, este estudo analisou os comportamentos de filtração de *Ceriodaphnia silvestrii* em exposições agudas e crônicas, a fim de postular sobre os efeitos destes compostos na alimentação e transferência de energia entre cadeias tróficas.

4.1 Objetivos específicos

- a) Analisar a estrutura da comunidade zooplancônica em episódio de mortandade de peixes no compartimento Sapucaí, Reservatório de Furnas, Minas Gerais;
- b) Discutir por meio de revisão da literatura e análises físicas, químicas e biológicas as condições que levaram aos dois eventos de mortandade no Reservatório de Furnas, Minas Gerais, Brasil;
- c) Determinar a toxicidade aguda e crônica do composto cloprostenol sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.
- d) Determinar a toxicidade aguda e crônica do composto 17α -etinilestradiol sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*;

- e) Determinar a toxicidade aguda e crônica do composto Estrona sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*;
- f) Analisar os impactos da exposição à diferentes concentrações dos compostos cloprostenol, 17 α -etinilestradiol e estrona no comportamento de filtração do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

5 CAPÍTULO 1 – Factors that lead to fish die-offs: a literature review and two case studies on a tropical reservoir in Brazil.

Adolfo P MATTOS JR^{(1),*}; Hugo M BATISTA⁽¹⁾; Celio WISNIEWSKI⁽¹⁾; Maria J SANTOS-WISNIEWSKI⁽¹⁾.

¹Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Naturais, Gabriel Monteiro da Silva street, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, +55 (35) 3701-9684.

Abstract

Fish die-offs often cause economic and social problems, and climate change is expected to increase the number of these events. As human occupation around water bodies is growing throughout the world, heavy burdens are put on water quality and consequently on the activities which depend on good-quality hydric resources. Anthropic activities generating wastewater coupled with poorly managed fishery activities overload the water body with nutrients, degrading water quality. This study analyzed the physical, chemical, and biological properties of the Sapucaí River compartment of Furnas reservoir on two different fish die-off events and discussed the causes that led to these massive deaths. Values of dissolved oxygen were low at both sites, ranging on average from 2 to 3 mgL⁻¹. Meteorological, physical, and chemical data showed that cold fronts are potential hazards in low-quality waters. In the zooplankton sampling it was found a high prevalence of Rotifera, mainly from the Brachionidae family. A systematic review was performed on freshwater fish die-off published articles. Weather conditions, geography, and water quality management are often neglected key points on these events. Better management of the water used for aquaculture and regular assessments of biological indicators, physical and chemical aspects are essential for the prevention of such events.

Keywords: *limnology, aquaculture, cold front, dissolved oxygen, zooplankton.*

Introduction

Fishery is responsible for a large share of the animal protein produced worldwide. 171 million tons of fish were harvested in 2016, with aquaculture contributing to 47% (FAO, 2018). Capture fishery yields remain stable for the last 30 years, therefore aquaculture is the main branch sustaining the increasing demand for fish (FAO, 2018). In Brazil, fishery is a trivial economical sector and, as for the last censuring, produced 1,240,813 tons of fish (IBGE, 2009). The worldwide trend for freshwater fish production has been on sharp increased since the 1990s, surpassing continental fish capture around 2007 (Viana, 2013). As Brazil has a significant percentage of the available freshwater in the world (ANA, 2017), fish production is expected to increase even more, and strategies to regulate water use to reduce degradation are in need.

To guarantee water resources in drought periods, several countries started damming their water bodies. Currently more than half of the world large rivers are fragmented because of this practice (Nilsson *et al.*, 2005). Since Brazilian law promotes and ensures that water bodies have multiple uses, hydroelectric power plants and fishery production have been implemented over these dammed resources. Since damming drastically changes a lotic environment into an intermediary between lentic and lotic (Timpe and Kaplan, 2017), the ecological processes in these water reservoirs are quite unique. Damming affects biodiversity (Wu *et al.*, 2019) and the regional characteristics such as soil and vegetation have long lasting impacts over the ecological processes operating on the water body (Tundisi *et al.*, 2015). The study of these processes is important to

measure how they differentiate, what impacts fish production can cause onto the ecological system, and thus propose guidelines of proper management of human impacts on them.

Furnas Reservoir, located at the southern part on the state of Minas Gerais, Brazil, is an important source of economic and environmental services for its surrounding population. Fish aquaculture activities are increasing, with many production sites on its many branches, albeit many lack proper management to ensure water quality (Santos *et al.*, 2009). Fish production in this region is mainly done through the construction of net cages, which are put in current water. Considering that Furnas multi-branched shape increases nutrient load and accelerates eutrophication processes (Sá Jr., 1994), water quality can be severely harmed. Overexploitation of hydric resources (Sabater *et al.*, 2018) coupled with seasonal variances and climate change can be related to the increasing frequency of fish die-offs (Till *et al.*, 2019). Literature is still scarce concerning causes and consequences of those events, especially on tropical regions.

The use of bioindicators such as zooplankton key species to assess water quality might help foresee quality decline before a catastrophic event such as massive fish deaths. Analysis of the zooplankton community correlate very well with physical and chemical properties of the water, as well as with the trophic state (Pedrozo and Rocha, 2005; Perbiche-Neves *et al.*, 2013; Sladecsek, 1983). Aside from that, the zooplankton community is crucial in many ecological functions, and its assessment can also predict an algal bloom, as seen in one study linking zooplankton biomass with top-down control of algal blooms (Mitra and Flynn, 2006). Algal blooms are commonly found prior or concomitantly with fish die-offs.

Anticipating the factors that lead to fish die-offs include proper ecosystem management and good knowledge about the processes occurring at the site of fish production. This study reviewed

articles discussing fish die-offs events and assessed physical and chemical variables, as well as zooplanktonic community aspects of two fish die-offs at a compartment of Furnas Reservoir, in order to postulate about possible causes that lead to fish die-offs.

Methods

Systematic review

Research entries “Fish die-off” and “(Freshwater fish) AND die-off” were conducted at Periódicos CAPES database (Periódicos CAPES, 2019), which comprises 130 scientific databases and more than 45000 scientific journals. First entry returned 22 results of peer-reviewed articles, and the second returned 430. After abstract reading, a total of 16 articles which dealt with fish die-off and possible causes of such event were selected, then read thoroughly.

Study sites

Built in 1963, the Furnas Reservoir, located at the Rio Grande Basin on the state of Minas Gerais (20° 40'S, 46° 19'W), is one of the largest reservoirs in Brazil, with a volume of 22,950 km³ and maximum depth of 90 meters (Figueredo and Giani, 2005). It has a dendritic shape and is constituted of many tributaries of the Sapucaí and Grande rivers. Study sites are georeferenced at figure 1. The sites had historically received raw sewage, which only started to be partially treated from 2010 onwards. Intensive fish production is omnipresent on Furnas reservoir, not different at the study sites, where fish were reared on net cages.

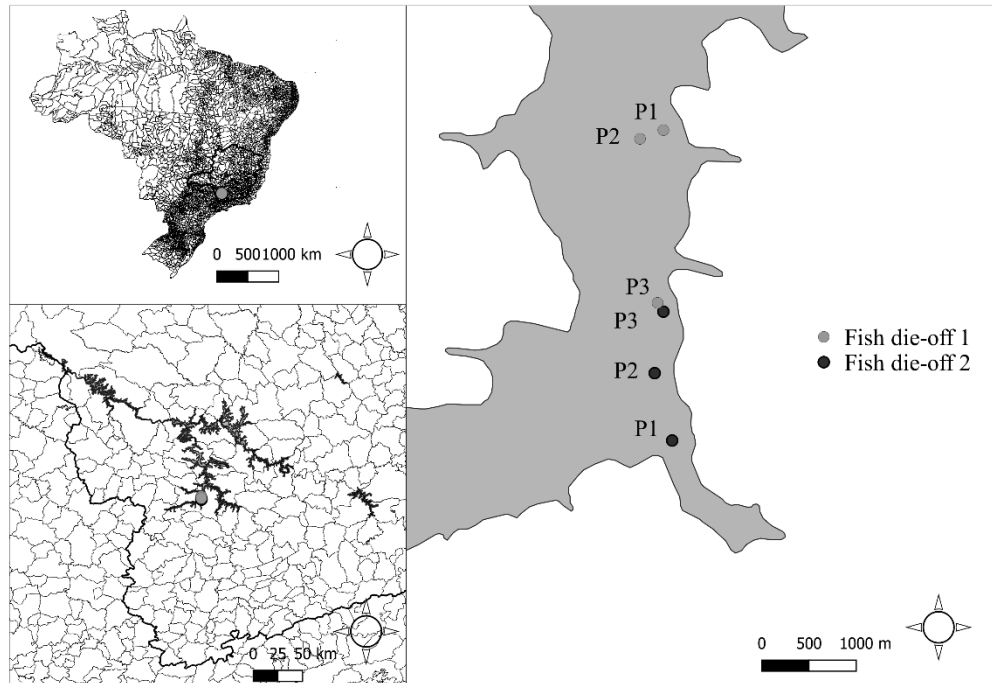


Fig 1: Fish die-offs area, on Sapucaí's compartment of Furnas Reservoir, Brazil (21°22' S 46°00' W). For fish die-off 1, P1 (21°21'25" S 46°00'01" W) and P2 (21°21'28" S; 46°00'09" W) surrounded the caged nets (littoral and pelagic zones) and Point P3 (21°23'11" S; 45°59'58" W) was taken from another fish culture with no die-offs. For fish die-off 2, samples were taken in a gradient from a wastewater disposal site to the fish die-off. P1 (21°22'27" S; 46°00'01" W), P2 (21°22'48" S; 46°00'03" W) and P3 (21°23'11" S; 45°59'58" W).

Fish die-off 1 event

On May 2nd, 2016, a fish die-off event occurred at (21°21'25" S 46°00'01" W). Sampling was performed at the afternoon. Points 1 and 2 were taken at the surroundings of the fish cages, and P3 at a control fish rearing site.

Fish die-off 2 event

In September 19th, 2017, another fish die-off event occurred, at (21°22'27" S; 46°00'01" W). Sampling was performed on a gradient from a treated sewage release site (P1) to the fish die-off site (P3). Sampling was performed at afternoon.

Physical, chemical and weather analyses

Physical and chemical data were collected with Horiba U-50. Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$), dissolved oxygen (DO) (mg L^{-1}), water turbidity (NTU), total dissolved solids (TDS), pH and temperature data were taken. A Secchi disk was used to measure transparency and photic layer was assessed by multiplying transparency by 2.7 (Margalef, 1983). Lower temperature and wind speed were collected from Machado climatological station (21° 40' 48" S 45° 56' 24" W), with the height of 873.35 meters above sea level, which is the nearest to the sites studied, obtained at the governmental database Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Biological analysis

Zooplankton samples were collected with a 68 μm mesh plankton net, dragging vertically, then fixed with formaldehyde 4% and stored. Organisms were identified in Zeiss microscopes (x1000) and stereoscopes (x50) with specialized bibliography (Berner, 1985; Edmondson, 1959; Elmoor-Loureiro, 1997; Koste, 1978; Olivier, 1962; Paggi, 1973, 1978; Rocha and Matsumura-Tundisi, 1976; Segers, 1995; Segers *et al.*, 1993; Smirnov, 1974, 1996). To assess Rotifera community, a homogenized 1 mL of each sample was inserted on a Sedgewick-Rafter, while Cladocera and Copepoda organisms were counted on acrylic slides, with sub-sampling for rarer ones.

Graphs were created on R Studio Core Team with codes adapted from (Burchell, 2016), and Microsoft Excel 360. Maps were created on QGIS 3.10.1.

Results

Water column depth ranged from 0.5 to 10.3 meters and most of the sampled sites had their photic layer equal as their depth (table 1). Conductivity was close to the Reservoir average (about $60\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) on fish die-off 1 event (FDO1), while fish die-off 2 event (FDO2) had much higher conductivity. Values of dissolved oxygen (DO) were low in both events (table 1). The values found (between 2 mg L^{-1} and 3 mg L^{-1}) were low and not recommended for the maintenance of fish production.

Table 1 Physical and chemical data from fish die-off events. Fish die-off 1 P1 and P2 were at the fish die-off site, and P3 a control site. For fish die-off 2, a gradient from a wastewater disposal site to the fish die-off site.

| | Fish die-off 1 | | | Fish die-off 2 | | |
|--|----------------|------|------|----------------|-------|-------|
| Physical characteristics | P1 | P2 | P3 | P1 | P2 | P3 |
| Depth (m) | 1.1 | 10.3 | 1.4 | 0.5 | 3.0 | 5.0 |
| Photic layer (m) | 1.1 | 3.78 | 1.4 | - | - | - |
| Water temperature (°C) | 25.14 | 25.3 | 25.4 | 23.74 | 22.40 | 22.44 |
| pH | 5.82 | 5.98 | 5.88 | 7.34 | 6.30 | 6.73 |
| Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) | 54.6 | 53 | 49 | 488 | 127 | 109 |
| Turbidity (NTU) | 6.23 | 5.95 | 6 | 53.00 | 16.40 | 5.25 |
| DO (mg L^{-1}) | 2.36 | 2.79 | 5.57 | 5.13 | 3.02 | 3.76 |

| | | | | | | |
|--------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| TDS (g L ⁻¹) | 0.035 | 0.0345 | 0.032 | 0.314 | 0.082 | 0.071 |
|--------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|

Weather data of the sampled sites showed a drastic drop of air temperature from May 1st to May 2nd, prior to FDO1 (figure 2), but no significant changes on FDO2 (figure 3). Weather data (minimum temperature, maximum temperature, average wind speed) were gathered with a span of more than 1 week to show fluctuations and better demonstrate their changes.

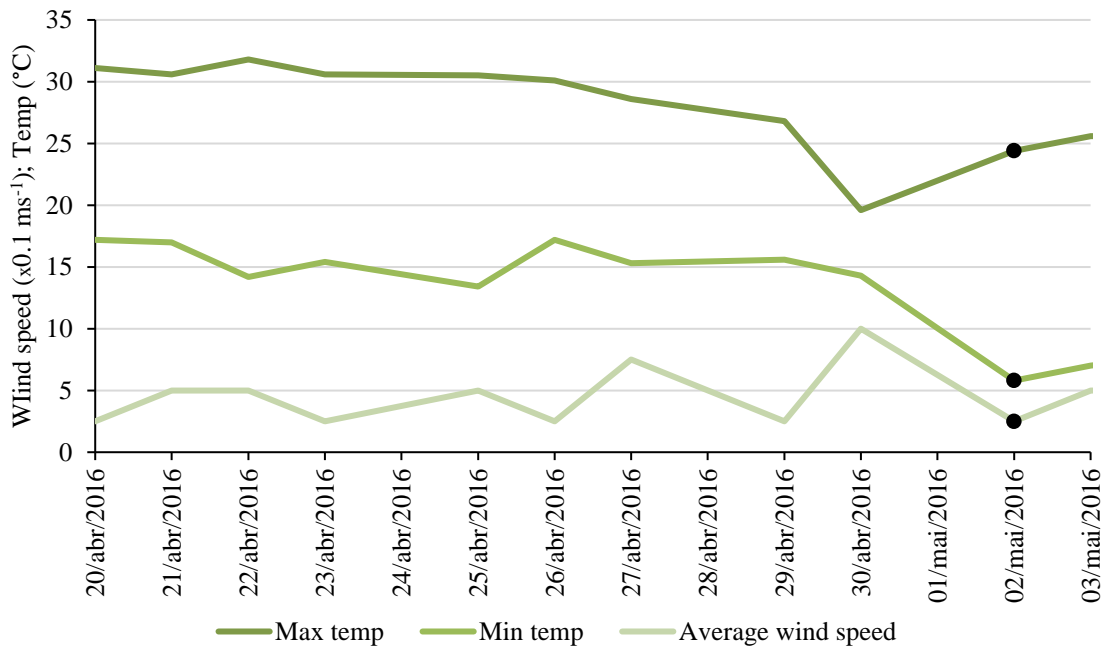


Fig 2: Maximum and minimum temperature (°C) and average wind speed (x0.1 m s⁻¹) recorded at Machado station between April 20th, 2016 and May 3rd, 2016. Fish die-off 1 event occurred at May 2nd early morning.

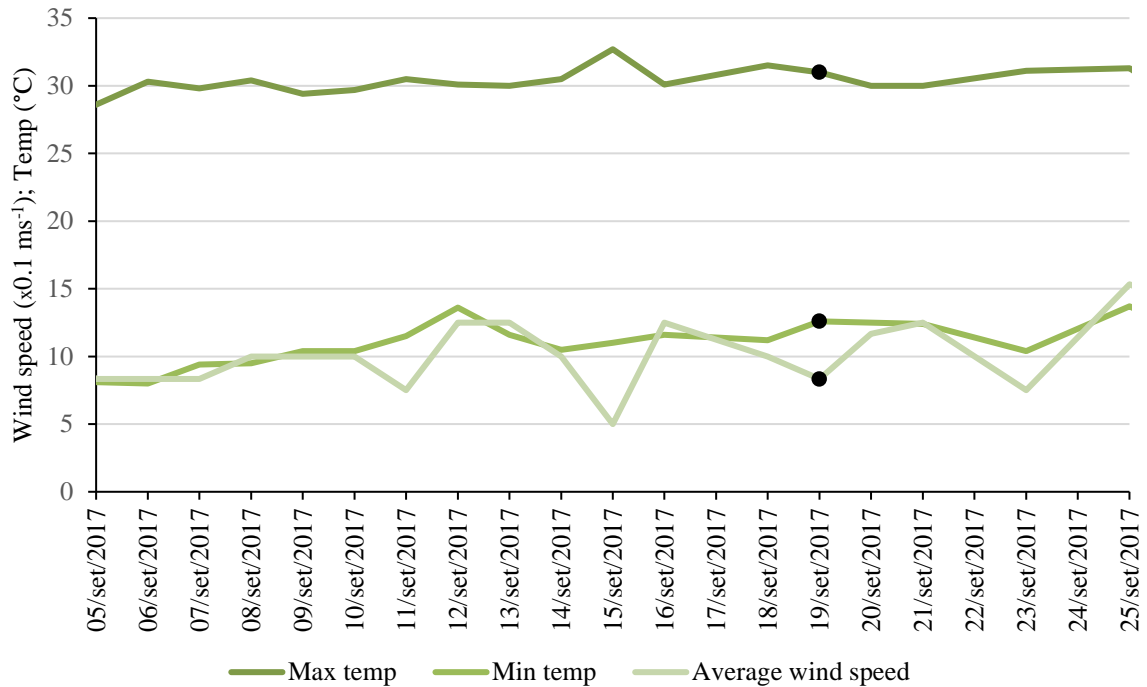


Fig 3: Maximum and minimum temperature (°C) and average wind speed ($\times 0.1 \text{ m s}^{-1}$) recorded at Machado station between September 5th, 2017 and September 25th, 2017. Fish die-off 2 event occurred at September 19th early morning.

It was observed 29 taxa for the zooplankton community on both FDO1 and FDO2 (table 2), with Rotifera being the most abundant. Specimens of *Notodiatomus iheringi* and *Thermocyclops decipiens* were found on FDO1. On FDO2, 9 Cladocera and 2 Copepoda representants were identified (table 2).

Table 2 List of species collected at fish die-off 1 site (FDO1) and fish die-off 2 site (FDO2).

| Species/site | FDO1 | | FDO2 | | |
|--|------|----|------|----|----|
| | P1 | P2 | P1 | P2 | P3 |
| Cladocera | | | | | |
| <i>Alona</i> sp. | | | x | | |
| <i>Bosmina longirostris</i> (O. F. Muller, 1785) | x | x | x | x | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| <i>Ceriodaphnia cornuta</i> Sars, 1886 | | x | x | x | x |
| <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday, 1902 | x | x | x | x | x |
| <i>Chydorus pubescens</i> Sars, 1901 | | | x | x | x |
| <i>Daphnia</i> sp. | x | | | | |
| <i>Diaphanosoma birgei</i> Korineck, 1981 | x | x | | | x |
| <i>Diaphanosoma spinulosum</i> Herbest, 1967 | x | x | x | x | x |
| <i>Ilyocrius spinifer</i> Herrick, 1882 | | x | | | |
| <i>Moina</i> sp. | | | x | | |
| <i>Simocephalus serrulatus</i> (Koch, 1841) | x | | | | |
| Copepoda | | | | | |
| Calanoida | | | x | x | x |
| Calanoida nauplii | | | x | x | x |
| <i>Notodiptomus iheringi</i> (Wright, 1935) | x | x | | | |
| Cyclopoida | x | x | x | x | x |
| Cyclopoida nauplii | | | x | x | x |
| <i>Thermocyclops decipiens</i> (Kiefer, 1929) | x | x | | | |
| Harpacticoida | | x | | | |
| Rotifera | | | | | |
| <i>Asplanchna sieboldii</i> (Leydig, 1854) | x | | x | x | x |
| <i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas, 1776 | x | x | x | | |
| <i>Brachionus caudatus</i> Barrois & Daday, 1894 | | | x | | |
| <i>Brachionus dolabratus</i> Harring, 1915 | | | x | x | x |
| <i>Brachionus falcatus</i> (Zacarias, 1898) | x | | x | x | |
| <i>Brachionus mirus</i> (Daday, 1905) | x | x | x | x | x |
| <i>Collotheca</i> sp. | x | | | | |
| <i>Conochilus coenobasis</i> (Skorikov, 1914) | x | x | x | x | x |
| <i>Conochilus unicornis</i> (Rousselet, 1892) | x | x | | | |
| <i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenber, 1832 | | x | | | |
| <i>Filinea longiseta</i> (Ehrenberg 1834) | | | x | x | |
| <i>Filinia opoliensis</i> (Zacarias, 1898) | | | x | x | x |
| <i>Hexarthra intermedia</i> Wiszniewski, 1929 | | x | x | x | x |
| <i>Kellicotia bostoniensis</i> (Rousselete, 1908) | x | x | x | x | x |
| <i>Keratella americana</i> (Carlin, 1943) | x | x | x | | |
| <i>Keratella cochlearis</i> (Gosse, 1851) | x | x | | x | x |
| <i>Keratella cochlearis tekta</i> (Gosse, 1851) | | | | | x |

| | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| <i>Keratella lenzi</i> (Hauer, 1953) | x | x | x | x | x |
| <i>Keratella tropica</i> (Apstein, 1907) | x | | x | x | x |
| <i>Lecane</i> sp. | x | x | | | |
| <i>Plationus patulus</i> (Müller, 1953) | x | x | x | x | x |
| <i>Polyarthra vulgaris</i> Carlin, 1943 | | | x | x | x |
| <i>Ptygura libera</i> Meyers, 1934 | x | | | | x |

Systematic review presented factors that presumably led to fish die-off events which were diverse. Factors range from environmental policy failures to infectious diseases (table 3). The articles and notes shown at the table or analyzed a fish die-off event or discussed fish die-off events and the causes that led to them.

Table 3 Reasons stated by 16 studies selected by systematic review for fish die-off research. (NF = not found)

| Articles | Region | Fish-farming? | Location | Causes of fish die-off |
|------------------------------|-----------|---------------|------------------------------------|--|
| Adams <i>et al.</i> , 1985 | Temperate | No | Watts Bar Reservoir, Tennessee, US | Starvation |
| Service, 2003. | Temperate | Yes | Klamath lake, The United States | Low water supply |
| Mhlanga <i>et al.</i> , 2006 | Tropical | Yes | Artificial Lake chivero, Zimbabwe | Hypoxic; pH neutral; high temperature; hypertrophic; algae bloom |
| Purcell and Murray, 2008. | Temperate | No | Lake Michigan, The United States | <i>R. salmoninarum</i> infection |
| Huss <i>et al.</i> , 2008 | Temperate | No | Lake abborrtjarn, Sweden | Low temperature; starvation |
| Dagit <i>et al.</i> , 2009 | Temperate | No | Malibu Creek, The United States | DO 10 mg; high temperature; eutrophic; fish appeared yellow; damming |

| | | | | |
|--|-------------|-----|--|---|
| Mellink and Riojas-López, 2009 | Tropical | NF | Laguna Cuyutlán, Mexico | Hypoxic; red-algae bloom |
| Garver <i>et al.</i> , 2010 | Subtropical | No | Lake scugog, Canada | Koi herpesvirus infection |
| "Massive die-off of fish", 2010 | Tropical | Yes | Lake Naivasha, Kenya | Hypoxic; precedent heavy storm; eutrophic |
| Huchzermeyer, 2012. | Tropical | Yes | Olifants River, South Africa | Pansteatitis |
| Slaninova <i>et al.</i> , 2014. | Temperate | No | Pansky and Klucenicky pond, Czech Republic | Hypoxic; eutrophic; acid; cyanophycean bloom; aluminum and iron toxicity |
| Huchzermeyer <i>et al.</i> , 2017. | Tropical | No | Olifants River, South Africa | Eutrophic; pansteatitis |
| Boromisza <i>et al.</i> , 2018 | Temperate | No | Artificial lake, Zalakaros, Hungary | DO 19.82 mg; basic; conductivity 3840; cold fronts; eutrophic; possible turnover; cyanophycean and green-algae bloom; chlorine toxicity; overpopulation |
| Normile, 2019 | Subtropical | Yes | Darling River, Australia | Low water supply |
| "Plants on the Moon, US emissions", 2019 | Subtropical | Yes | Darling River, Australia | Severe weather; cyanophycean bloom |
| Till <i>et al.</i> , 2019 | Temperate | NF | Wiscosin, US | High temperature |

Discussion

Furnas Reservoir is dendritically shaped and constituted of many tributaries from the Sapucaí and Grande rivers. Its shape and the surrounding activities make it prone to eutrophication processes (Sá Jr., 1994).

The conductivity results found in FDO1 and FDO2 were different, with FDO2 having much higher conductivity. That's probably due to its proximity to the sewage disposal site and a smaller

inflow of water (table 1). As the events took place in different seasons, this might have affected the conductivity as well. FDO1 took place on May 1st, the end of rainy season, with higher air and water temperatures, while FDO2 took place on September 19th, the end of the dry season. As the reservoir was built for electrical generation purposes, dry seasons usually have much lower volumes due to the combination of drought and increased energy needs.

Both FDO1 and FDO2, at the time of the events, had low water quality and mismanaged fish ration feeding contributed to the water quality depletion. The production of fish in net cages without proper management may lead to many water quality problems. Figueredo and Giani (2005) performed a study analyzing the phytoplankton community in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms at the Furnas reservoir and found that ammonia and chlorophyll-*a* values were higher at fish farming sites, as well as reduced transparency. Santos *et al.* (2009) alerted to the increasing number of net cages and organic particulates excess from rations. Precipitation of these particulates build up at the floor and enhance methane production, therefore decreasing DO in the bottom layer. Fish production management is lacking at Furnas Reservoir, as stated by Araújo *et al.* (2017). The lack of data gathering is concerning.

The type of fish rations used on feeding is also of high concern. On interviewing fish farmers, it was found that many use cheaper rations that rapidly sinks to the bottom (Personal communication, 2017). These carbohydrates increase biochemical oxygen demand, dropping DO levels sharply.

Methane flux in water bodies is predominant in inland water, contributing with an average of 30% of all methane emissions (Silva, 2018). Bubble methane flux, albeit less frequently emitted, is episodic and contributes more for the overall methane emission from inland water, reaching up

to 90% of the CH₄ emission (Silva, 2018). Bastviken *et al.* (2004) have shown that, in stratified water bodies, methane can build up into the anoxic layer and be released in huge amounts at overturning events. It also states that shallow waters, below the 4 meters, have high methane ebullition rates and that pressure changes, induced by waves, could induce methane bubble releases.

Cold fronts are a common feature on Brazilian southern and southeastern winters, coming mostly from Antarctica (Alvares *et al.*, 2013; Foss *et al.*, 2017). FDO1 has a clear cold front event, where mean air temperature dropped and a major wind oscillation contributed to water anoxia, through water convection. Increased wind cools down water surface inducing ascending water movements, bringing up low oxygen water layers. In FDO2, it is not clear that cold fronts played a role, as only a small oscillation in the wind speed and mean air temperature is seen (figure 3). Although not clear, a small increase in the wind speed is enough to produce water convection movements in such small water depth, as shown by Araújo *et al.* (2017) in the Furnas Reservoir.

Other studies also claimed that turnover events are the cause of fish die-offs (Kawakami *et al.*, 2011; Mhlanga *et al.*, 2006). Low DO levels are commonly found in fish die-off events (Turner, 2010), however others found higher DO levels (Kawakami *et al.*, 2011) and blamed fish die-off on weather changes and turnover events. At places prone to water quality depletion, control should be a priority. A dendritic reservoir as Furnas, geographically skewed towards eutrophication, (Sá Jr., 1994) must have stricter guidelines assessing water quality and prevent DO depletion and thus biota extinction.

When comparing the present data with previous data from the site, DO values are lower. (Silva, 2015) registered values in 2014 ranging from 7.29 to 8.94 mg L⁻¹. Considering the values

registered in the afternoon and that differences on a day reach values higher than 1.0 mg L^{-1} (Silva, 2015), it is safe to assume that the DO concentration at dawn was near zero. Silva *et al.* (2018) also found DO values as low as 0.75 mg L^{-1} on early morning at this area. It seems that water quality is worsening at this location.

Dissolved oxygen concentrations below 4 mg L^{-1} are unsuitable for several fish species (Pinto *et al.*, 2010). Despite that, Abdel-Tawwab *et al.* (2015) showed no significance of DO low levels (around 1 mg L^{-1}) on Nile tilapia survival, albeit overall health and growth of these fish decreased. Thus, other factors such as ammonia build up and cyanobacterian-related toxicity might add up to a fish die-off, as Mhlanga *et al.* (2006) states. Melo *et al.* (2017) performed a study at Furnas and showed that eutrophication processes were causing morphological abnormalities on zooplankton. López-Cortés *et al.* (2015) reported a fish die-off in a diatom bloom.

Rotifera was prevalent in all assessments, which corroborates the hypoxia and eutrophic water scenario. As less tolerant groups start to decrease in density, community assemblage starts to shift to species more resistant to low oxygen levels, as observed by Chang *et al.* (2013), where water hypoxia had no effect on Rotifera.

FDO1 had many representatives of polluted environments, for instance *Ptygura* sp. and the *Brachionus* genus (Sladeczek, 1983) (table 2). The cyclopoid *Thermocyclops decipiens*, found on FDO1, is also indicator of eutrophic waters (Landa *et al.*, 2007). Rietzler *et al.* (2002) found that the calanoid *Notodiaptomus iheringi* replaces *Argyrodiaptomus furcatus* on eutrophic waters, and Leitão *et al.* (2018) found that *N. iheringi* thrives even in cyanobacterial blooms.

On FDO2, DO measures show a gradient of poor-quality water, from the wastewater disposal to the fish die-off site. *Bosmina longirostris*, *B. caudatus* and *B. calyciflorus* are considered

pollution-resistant (Pedrozo and Rocha, 2005) and were found on the wastewater disposal, but absent on fish die-off site. Despite FDO2 having better water conditions, its low DO and rotifer presence suggests a low-quality water scenario, nonetheless. Measures taken at the afternoon were not able to demonstrate high TDS at the fish die-off site, however low DO levels are a register of anoxic build up on the floor. As stated by Bastviken *et al.* (2004), shallow waters are more prone to turnover, methane ebullition and decrease on quality.

Previous studies about fish-die off reasons stated that climate change, smaller water inflow and algae blooms worsens water quality, leading to massive death of aquatic species. As fish die-off events were mostly found hypoxic, a constant assessment of water quality identifying a DO caution threshold would be beneficial preventing such events.

Conclusion

Many factors can add up and lead to a fish die-off, some naturally driven and others human-induced. On FDO1, poor quality water was worsened by a cold front, mixing the water columns and reducing DO levels to below fish survivability threshold. On FDO2, water conditions were also poor, but unusual load of sewage from the wastewater treatment and surrounding activities might have caused high biochemical oxygen demand (BOD) and sudden drop of DO levels. Fish excrement and excess fish rations at the bottom induces higher BOD levels and depletion of DO. Constant water quality assessment must be carried out in order to prevent these events, and management of fish excrement and fish rations excess are thoroughly advised. Poor water quality followed by sudden climatic events is likely to lead to fish die-off events. In places where

eutrophication processes are increasing a policy of constant assessment of DO levels must be performed.

Acknowledgements

We thank CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for sponsoring this study.

References

Abdel-Tawwab M, Hagraas AE, Elbaghdady HAM, Monier MN. 2015. Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquacult Int* 23(5): 1261-1274.

Agência Nacional de Águas (ANA). 2017. *Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2017: relatório pleno*. Brasil: Agência Nacional de Águas. <http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/relatorio-conjuntura-2017.pdf/view>.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM. 2013. Modeling monthly mean air temperature for Brazil. *Theor Appl Climatol* 113: 407-427.

Araújo CAS, Sampaio FG, Alcântara E, Curtarelli MP, Ogashawara I, Stech JL. 2017. Effects of atmospheric cold fronts on stratification and water quality of a tropical reservoir: implications for aquaculture. *Aquacult Env Interac* 9:385-403.

- Bastviken D, Cole J, Pace M, Tranvik L. 2004. Methane emissions from lakes: dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochem Cy* 18: 1-12.
- Berner DB. 1985. Morphological differentiation among species in the *Ceriodaphnia cornuta* complex (Crustacea, Cladocera). *Verh - Int Ver Theor Angew Limnol* 22: 3099-3103.
- Burchell J. 2016. *Creating plots in R using ggplot2 - part 4: stacked bar plots*. <http://t-redactyl.io/blog/2016/01/creating-plots-in-r-using-ggplot2-part-4-stacked-bar-plots.html>.
- Chang KH, Imai H, Ayukawa K, Sugahara S, Nakano S, Seike Y. 2013. Impact of improved bottom hypoxia on zooplankton community in shallow eutrophic lake. *Knowl Manag Aquat Ec* 408(3).
- Edmondson WT. 1959. *Freshwater Biology*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1248 p.
- Elmoor-Loureiro LMA. 1997. *Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil*, Universa, Brasília, 156 p.
- Figueredo CC, Giani A. 2005. Ecological interactions between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil). *Freshw Biol* 50: 1391-1403.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. United Nations. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>.
- Foss M, Chou SC, Seluchi ME. 2017. Interaction of cold fronts with the Brazilian Plateau: a climatological analysis. *Int J Climatol* 37: 3644–3659.

Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa (IBGE). 2009. *Indicadores de desenvolvimento sustentável*. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa. <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1108>.

Kawakami T, Weragoda SK, Attanayake MAMSL, Sakamoto M, Tafu M, Honoki H, Serikawa Y. 2011. Fish die-off and water quality in Kandy Lake, a world heritage site in Sri Lanka. *Journal of Ecotechnology Research* 16(2): 39-45.

Koste W. 1978. Rotatoria die radertiere mitteleuropas, Uberordnung Monogononta, Gebriider Borntrager, Berlin, 637 p.

Landa GG, Barbosa FAR, Rietzler AC, Maia-Barbosa PM. 2007. *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929) (Copepoda, Cyclopoida) as indicator of water quality in the state of Minas Gerais, Brazil. *Braz arch biol technol* 50(4): 695-705.

Leitão E, Ger KA, Panosso R. 2018. Selective grazing by a tropical copepod (*Notodiaptomus iheringi*) facilitates microcystis dominance. *Front Microbiol* 9(301).

López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez EJ, Band-Schmidt CJ, Gárate-Lizárraga I, Hernández-Sandoval FE, Bustillos-Guzmán JJ. 2015. Mass fish die-off during a diatom bloom in the Bahía de La Paz, Gulf of California. *Hidrobiologica* 25(1): 39-48.

Margalef, R. 1983. Limnología, 2nd ed., Omega, Barcelona, 1010 p.

Melo RRR, Coelho PN, Santos-Wisniewski MJ, Wisniewski C, Magalhães CS. 2017. Morphological abnormalities in cladocerans related to eutrophication of a tropical reservoir. *J Limnol* 76(1): 94-102.

- Mhlanga L, Day J, Chimbari M, Siziba N, Cronberg G. 2006. Observations on limnological conditions associated with a fish kill of *Oreochromis niloticus* in Lake Chivero following collapse of an algal bloom. *Afr J Ecol* 44: 199-208.
- Mitra A, Flynn KJ. 2006. Promotion of harmful algal blooms by zooplankton predatory activity. *Biol Lett* 2: 194-197.
- Nilsson C, Reidy CA, Dynesius M, Revenga C. 2005. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. *Science* 308: 405-408.
- Olivier SR. 1962. Los cladoceros argentinos con claves de las especies, notas biológicas y distribución geográfica. *Rev Mus La Plata* 7: 173-269.
- Paggi JC. 1973. Acerca de algunas especies de la familia Moinidae (Crustacea, Cladocera) de la república Argentina. *Physis* 85: 269-277.
- Paggi JC. 1978. Revision de las especies argentinas del género *Diaphanosoma* Fisher (Crustacea, Cladocera). *Acta Zool Lilloana* 33: 43-65.
- Pedrozo CS, Rocha O. 2005. Zooplankton and water quality of lakes of the northern coast of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Acta Limnol Bras* 17(4): 445-464.
- Perbiche-Neves G, Fileto C, Laço-Portinho J, Troguer A, Serafim-Júnior M. 2013. Relations among planktonic rotifers, cyclopoid copepods, and water quality in two Brazilian reservoirs. *Lat Am J Aquat Res* 41(1): 138-149.

Pinto AL, Oliveira GH, Pereira GA. 2010. Avaliação da eficiência da utilização do oxigênio dissolvido como principal indicador da qualidade das águas superficiais da bacia do córrego Bom Jardim, Brasilândia/MS. *Geomae* 1(1): 69-82.

Rietzler AC, Matsumura-Tundisi T, Tundisi JG. 2002. Life cycle, feeding and adaptive strategy implications on the co-occurrence of *Argyrodiaptomus furcatus* and *Notodiptomus iheringi* in Lobo-Broa reservoir (SP, Brazil). *Braz J Biol* 62: 93-105.

Rocha O, Matsumura-Tundisi T. 1976. Atlas do zooplankton (Represa do Broa, Sao Carlos), UFSCar, São Carlos, 68 p.

Sá jr. WP. 1994. Production of planktonic biomass for feed of alevins at Furnas hydrobiology and hatchery station. In: Pinto-Coelho RM, Giani A, Von Sperling E., ed. Ecology and Human Impact on Lakes and Reservoirs in Minas Gerais with Special Reference to Future Development and Management Strategies, Segrac, Belo Horizonte, 133-139.

Sabater S, Bregoli F, Acuña V, Barceló D, Elozegi A, Ginebreda A, Marcé R, Muñoz I, Sabater-Liesa L, Ferreira V. 2018. Effects of human-driven water stress on river ecosystems: a meta-analysis. *Sci Rep* 8(11462).

Santos RM, Rocha GS, Rocha O, Santos-Wisniewski MJ. 2009. Influence of net cage fish cultures on the diversity of the zooplankton community in the Furnas hydroelectric reservoir, Areado, MG, Brazil. *Aquac Res* 40: 753-761.

Segers H. 1995. Rotifera: the Lecanidae (Monogonta). In: Dumont HJF, ed. Guides to the Identification of the Microinvertebrate of the Continental Waters of the World, SPB Academic, Netherlands, 1-266.

- Segers H, Murugan G, Dumont HJ. 1993. On the taxonomy of the Brachionidae description of *Plationus* n. gen. (Rotifera, Monogonta). *Hydrobiologia* 268: 1-8.
- Silva ES, Rocha O, Santos-Wisniewski MJ. 2018. Diel vertical migration of Cladocera in a compartment of a tropical reservoir. *Acta Limnol Bras* 30(304).
- Silva LC. 2015. A comunidade zooplanctônica de rios amazônicos na área de influência da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio do Madeira, RO: diferentes abordagens no monitoramento. (*Doctorate Thesis*), Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil. 321p.
- Silva MG, Packer AP, Sampaio FG, Marani L, Mariano EVC, Pazianotto RAA, Ferreira WJ, Alvalá PC. 2018. Impact of intensive fish farming on methane emission in a tropical hydropower reservoir. *Clim Change* 150: 195-210.
- Sladeczek V. 1983. Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia* 100: 169-201.
- Smirnov NN. 1974. Chydoridae, Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 644 p.
- Smirnov NN. 1996. Cladocera: The Chydorinae and Sayciinae (Chydoridae) of the world. In: Dumont HJF, ed. *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, SPB Academic, Amsterdam, 1-197.
- Till A, Rypel AL, Bray A, Fey SB. 2019. Fish die-offs are concurrent with thermal extremes in north temperate lakes. *Nat Clim Chang* 9: 637-641.
- Timpe K, Kaplan D. 2017. The changing hydrology of a dammed Amazon. *Sci Adv* 3(e1700611).

Tundisi JG, Matsumura-Tundisi T, Tundisi JEM. 2015. Environmental Impact Assessment of reservoir construction: new perspectives for restoration economy, and development: the Belo Monte Power Plant case study. *Braz J Biol* 75(3 suppl.): S10-S15.

Turner D. 2010. Massive die-off of fish at Lake Naivasha, Kenya. *Oryx* 44(3): 321-322.

Viana JP. 2013. Recursos pesqueiros do Brasil: situação dos estoques, da gestão, e sugestões para o futuro. boletim regional, urbano e ambiental. *IPEA* 7.

Wu H, Chen J, Xu J, Zeng G, Sang L, Liu Q, Zhengjie Y, Dai J, Yin D, Liang J, Ye S. 2019. Effects of dam construction on biodiversity: A review. *J Clean Prod* 221: 480-489.

6 CAPÍTULO 2 - Artificial hormone Cloprostenol toxicity in *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902: effects on size, filtering rates and egg production.

Adolfo Paulo de Mattos Júnior*^a; Maria José dos Santos-Wisniewski^a

^aUniversidade Federal de Alfenas, rua Gabriel Monteiro da Silva, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, 37.130-000, Brazil.

ABSTRACT

The increasing urbanization and development of compounds posed great concern over the environmental quality of waters. Assessment of endocrinal altering compounds is important since their effects on aquatic organisms and community structure can reflect in great environmental disturbances. We conducted acute and chronic toxicity assays of the synthetical hormone cloprostenol in *Ceriodaphnia silvestrii*, with LC50 (acute) of $0.41 \pm 0.08 \text{ mg.L}^{-1}$ and LC50 (chronic) of $0.618 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$. Despite LC50 numbers being higher than naturally found concentrations, below-toxicity values also shown effects on the organism and can impact community structure. Egg production increased in lower cloprostenol concentrations (0.2 and 0.4 mg.L^{-1}), as well as filtering rates, while body lengths tended to be smaller. We hypothesized endocrine pathways that cloprostenol may be disrupting. Cloprostenol affects survival and reproduction of *Ceriodaphnia silvestrii* specimens, thus impacting community structure.

Key-words: Freshwater toxicology; Aquatic invertebrates; Runoff; Behavioral toxicology; Emerging pollutants; Endocrine disrupting compounds.

INTRODUCTION

Freshwater quality has received increasing attention since researchers linked anthropic actions over water bodies with releases of growing numbers of pollutants (Rasheed et al. 2019). Contaminants reaching water resources are incorporated by organisms and thus enter the food chain (Deribe et al. 2011), altering both organism's physiology (Laing et al. 2016) and the ecosystem, *e.g.* increasing the number of primary producers (Fleeger et al. 2003). Many compounds are found on waters surrounded by human occupied areas, affecting fish (Folmar et al. 2001), bivalves (Moore et al. 2018), insects (Richmond et al. 2018) and zooplankton (Navis et al. 2013). In biodiversity hotspots such as the ones in tropical regions, compound toxicity might affect biota in unprecedented rates. Especially to endocrine disrupting compounds (EDC), Ismail et al. (2017) have already extensively reviewed and warned about the ecosystemic effect of such compounds.

Veterinarian advances on livestock management introduced many compounds into farmlands and associated with the widespread riparian clearing and pasture settlements (Merten & Minella 2013), water surrounded by such establishments are expected to receive part of those compounds through run-offs. They are the product of precipitated water loaded with nutrients and any other compounds that are on soil surfaces and are carried to water bodies. The increased burden of hydric resources and soil use by human activity is suppressing riparian vegetation, and studies have already found that when vegetation surrounding a water body is suppressed, run-off load volume entering the water body increases (Zhang et al. 2019). Run-offs are not only increasing nutrient load onto water bodies, leading to eutrophication, but also contaminating with xenocompounds and farmed animal's excrements (Li et al. 2015). North American farm studies found synthetical hormones such as 17α -ethynilestradiol on its surrounding waters (Li et al. 2012). Bartelt-Hunt et al. (2012) also found the natural hormone 17β -ethynilestradiol surrounding swine farms and attributed that to run-offs. In a country as profoundly impacted by cattle as Brazil is, and

its ongoing increase in deforestation for pasture (Merten & Minella 2013), the impact of run-offs, principally from agricultural territories that lack proper riparian forest, must be surveilled.

Zooplankton is an important group for ecotoxicological studies. Because of its reproductive ability and sensibility to variations on physical and chemical conditions (ABNT 2016), Cladocera group is often used as a bioindicator (ABNT 2016; ABNT 2017). The most common Cladocera species that is used for these screenings is *Daphnia magna*, as seen in the references herein. The standardization of new cladoceran species, especially those with geographical relevance, has been promoted to ensure that toxicity essays reflects the impacts a compound might have in endemic species and in certain areas. In that sense, *Ceriodaphnia silvestrii* (Fonseca 1991, Oliveira Neto & Botta-Paschoal 1998, Oliveira Neto & Matsumura-Tundisi 2000) and *Ceriodaphnia cornuta* (Ribeiro 2011) are examples of more geographically restricted species that are used in more specific toxicological studies.

Vertebrate hormones – and synthetical - have already shown levels of toxicity on zooplanktonic species (Clubbs & Brooks 2007; Barbosa et al. 2008). Vertebrate hormones exposure changes reproductive characteristics, egg laying, sex ratios, growth and molting on *Daphnia magna* (Kashian & Dodson 2004), and many other taxa are also harmed by their presence (LeBlanc 2007).

The cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* is an endemic microcrustacean, pelagic, filtering herbivore, that inhabits the Latin-American region (Fonseca & Rocha 2004). Examples of toxicological tests with the organism were made by Oliveira et al. (2018) for the anti-inflammatory compound diclofenac, with LC50 (lethal concentration 50) of 37.9 mg/L, by Moreira et al. (2014) for atrazine with LC50 of 14.30 mg/L, compounds thought to interfere in the physiological

hormonal pathways of the microcrustacean. Even sub-lethal doses can impact the water ecosystem, changing filtering rates and thus the primary production net biomass. The ability for filtering algae is directly linked with algae concentration, temperature, water hardness, as shown for *Ceriodaphnia dubia* (Soucek 2007). Xenobiotics are also shown to alter filtering rates in many cladocerans, decreasing heart rate and oxygen consumption (Smirnov 2017).

Toxicological analyses of compounds found in water bodies are necessary for the proper management and definition of interventional programs aimed at mitigating the damages and preserving water bodies. Thus, the present study aims at assessing the acute and chronic toxicology of the compound cloprostenol, a synthetical hormone analog to the endogenous compound Prostaglandin F_{2α}, and its effects on body's size and filtering rate of *Ceriodaphnia silvestrii*.

METHODS

Species

Ceriodaphnia silvestrii was collected at Furnas reservoir (21°21'24" S; 46°00'03" W), Minas Gerais, Brazil, and acclimated for 4 generations before the experiment. Specimens were kept on reconstituted water, 40-48 mg CaCO₃.L⁻¹ hardness, aerated and replaced every 2 days. Specimens were fed with 10⁵ cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* alga enriched with yeast (5 g.L⁻¹) and Tetramin® fish ration (5 g.L⁻¹) on 1:1 proportion. Specimens were kept on 25 ± 1 °C in 12:12 h light/dark cycles (ABNT, 2016).

Compound

Sodium cloprostenol was purchased from common agricultural shops. From the starting concentration of the product, 25 mg of cloprostenol in a 100ml vial, an aliquot of 16 mL was taken and diluted on reconstituted water to reach the following concentrations: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg.L⁻¹ to the acute toxicity and 6 mL was taken and diluted to reach 0, 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, and 1.5 mg.L⁻¹ for the chronic toxicity.

Sensitivity test

Sensitivity tests were conducted with NaCl, for 48 h, according to ABNT guidelines (2016). Dilutions 0, 0.1, 0.25, 0.6 and 1.5 g.L⁻¹ were based on Jaconetti (2005).

Acute toxicology test

After preliminary assessments, aliquots of 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg.L⁻¹ cloprostenol concentrations were chosen. Neonates were placed on 50 mL cups containing reconstituted water and dissolved oxygen of at least 3 mg/L, neutral pH, and kept for 48 h at dark in 25±1 °C.

Chronic toxicology test

After assessing LC50 on acute test (48 hours) for cloprostenol in *Ceriodaphnia silvestrii*, aliquots of 0, 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, and 1.5 mg/L cloprostenol, diluted in 50mL reconstituted water with 2x10⁵ cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae, neutral pH and dissolved oxygen of at least 3 mg/L, following ABNT guidelines (2017). Organisms were kept in 12:12 light/dark periods for 7 days on 25 ± 1°C, with water replacement at every two days which enabled neonate brood counting at days 2, 4, 6 and 7 of the experiment.

Post-exposition filtering rate tests

Filtering rate tests consisted of the counting of algae before and after a given time, based on Peters equation (Peters 1984). Algae were counted on a Neubauer's chamber. Organisms were kept on 25 ± 1 °C at light. We performed filtering tests on acutely exposed organisms (48-hour toxicity test) and neonates from the chronic test (7-day toxicity test) to assess long-term effects of the exposure.

Three organisms derived from the 48-hour toxicity test were placed on 30 mL cups with 10^5 and 10^6 cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae and left feeding for 4 hours. Initial and final algae counting was performed to assess the filtering rate.

Three neonates derived from 7-day toxicity test specimens were placed on 30 mL disposable cups with 10^5 and 10^6 cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae and left feeding for 4 hours. Counting of initial and final algae concentration was performed to assess filtering rates.

Body Length measurement

Body length (μm) of F1 adults derived from the chronic toxicity test was measured in two axis: anteroposterior, from tail to head, and dorsoventral, mid-part diameter. Measurements were performed by microscopical capture (Zeiss microscope) and run on the software Axiovision®.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by one-way ANOVA, two-way ANOVA and multiple t-tests. Statistical analysis and graphs were performed on Prisma® software and are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Acute toxicity test for cloprostenol is seen in figure 1. LC50 (48 hours) value was 0.41 mg.L⁻¹. For the chronic toxicity test, LC50 (7 days) exposure to cloprostenol was 0.618 mg.L⁻¹ (figure 2). Average neonate production was 18,1 per specimen on control group.

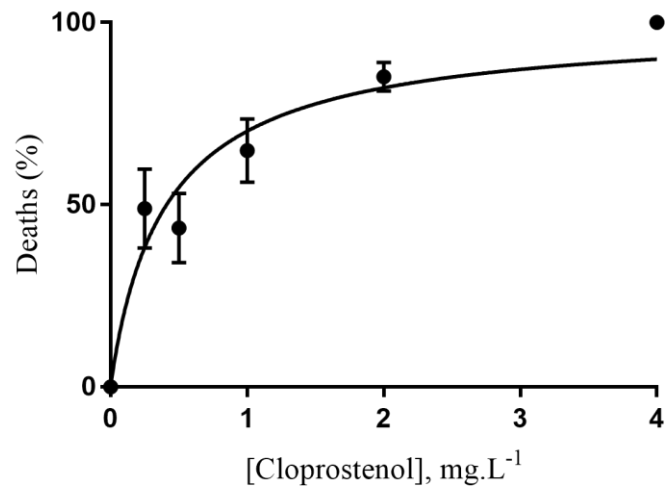


Figure 1: *Ceriodaphnia silvestrii* mortality after acute exposure to increasing concentrations of cloprostenol. n= 10. LC50 (48 hours) = 0.41 ± 0.08 mg.L⁻¹.

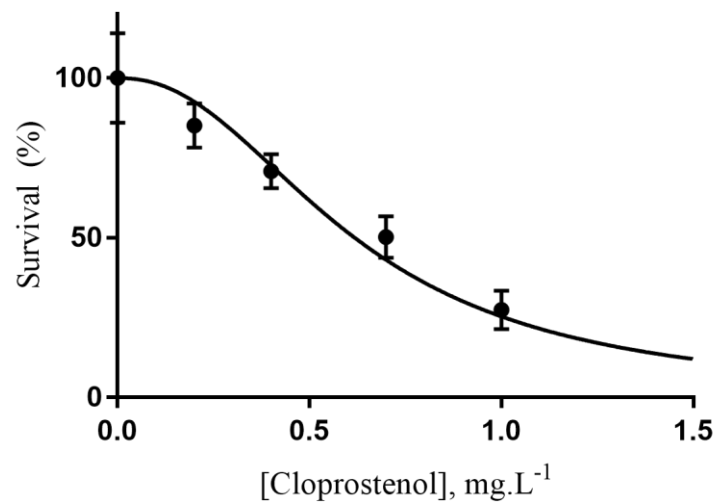


Figure 2: *Ceriodaphnia silvestrii* survival (%) after chronic exposure (7 days) to increasing concentrations of cloprostenol. $n=10$, $p<0.0001$. $LC50 = 0.618 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$.

Counting of neonates every 2 days is shown at figure 3. Comparing the reproduction rate of the specimens to the control, it is seen that the concentrations of 0.2 mg.L^{-1} and 0.4 mg.L^{-1} increased neonate production on the first 48 hours, then decreasing (figure 4). Neonate production was severely impaired from 0.4 mg.L^{-1} onwards, as shown on figures 3, 4, and table 1.

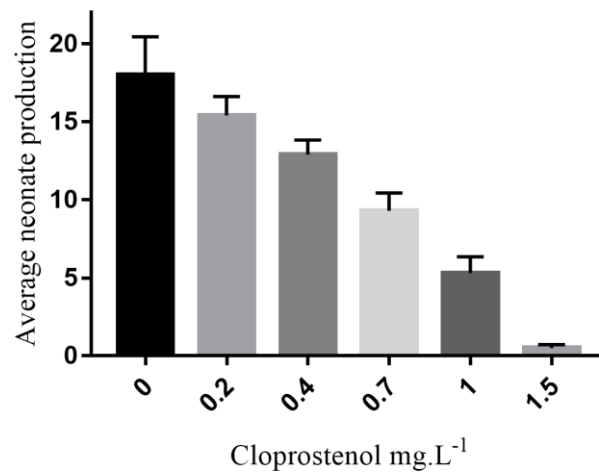


Figure 3: Average neonate production for *Ceriodaphnia silvestrii* chronically exposed to increasing concentrations of cloprostenol.

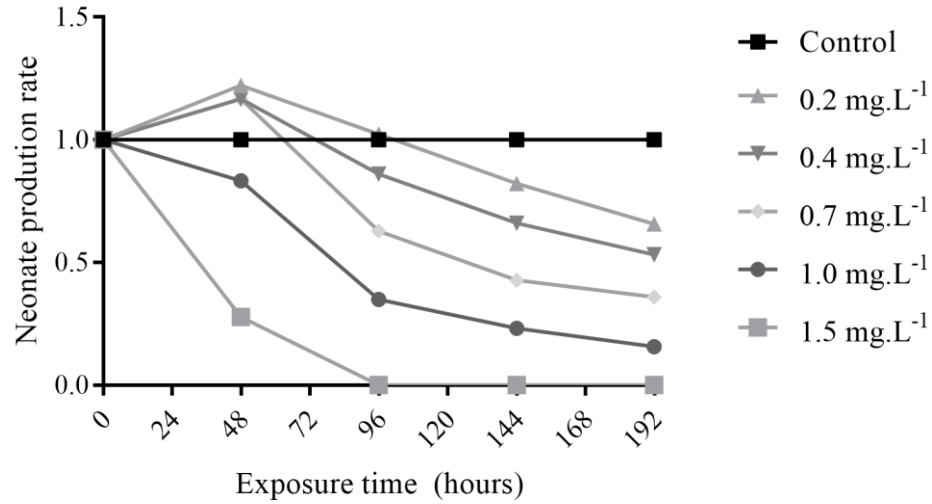


Figure 4: Ratio of neonate production, compared with the control, of *Ceriodaphnia silvestrii* chronically exposed to increasing concentrations of cloprostamol.

Table 1: Statistically significant concentrations for decreased reproduction on *Ceriodaphnia silvestrii* specimens by time of exposure.

| Exposure time (h) | Effective concentration | T-test p values |
|-------------------|-------------------------|-----------------|
| 48 | 1.5 mg.L ⁻¹ | 0,0023 |
| 96 | 1.0 mg.L ⁻¹ | 0,0018 |
| 144 | 0.7 mg.L ⁻¹ | 0,0228 |
| 192 | 0.4 mg.L ⁻¹ | 0,0202 |

Filtering tests on acutely exposed organisms showed an increasing trend for filtering rates. Differences were significant for cloprostamol concentration (two-way ANOVA $p=0.0336$) but not for algae concentration (figure 5).

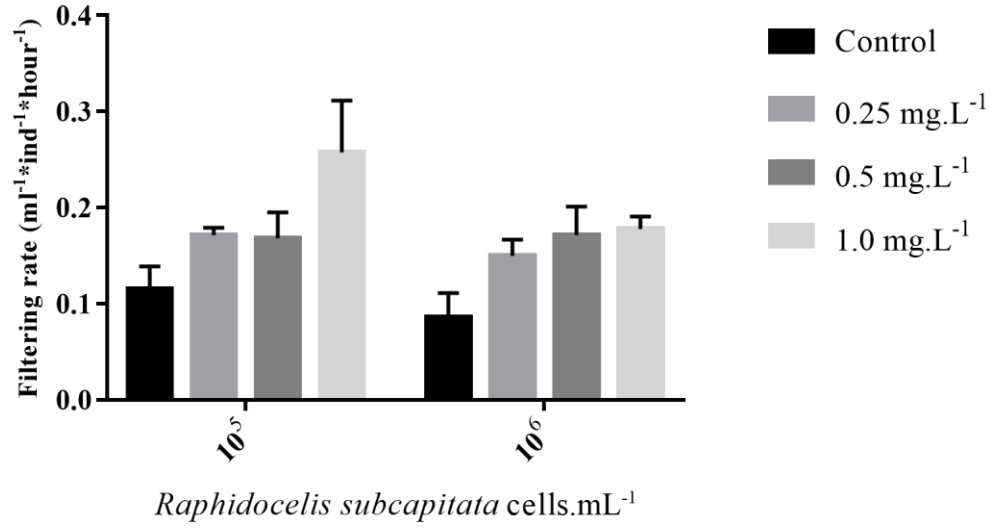


Figure 5: Filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* post-exposed for 48 hours to increasing concentrations of cloprostenol.

Filtering rates of neonates from the chronic exposure showed no statistical significance for cloprostenol or algae concentration, even though a higher consumption concentration-wise was seen (figure 6).

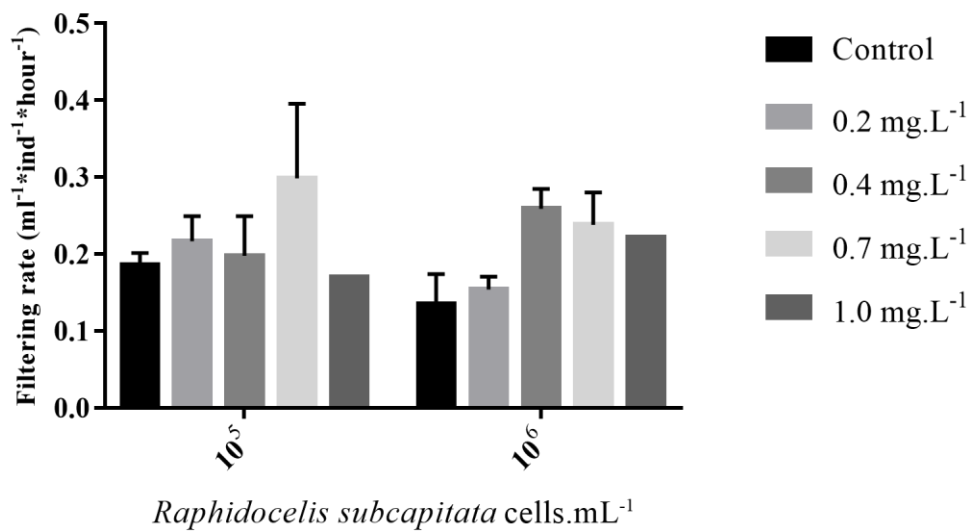


Figure 6: Filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* newborns exposed to increasing concentrations of cloprostenol.

Length of the body of F1 adults derived from chronically exposed specimens showed no statistical difference across the concentrations in which they survived, albeit a smaller body length trend was observed (figure 7).

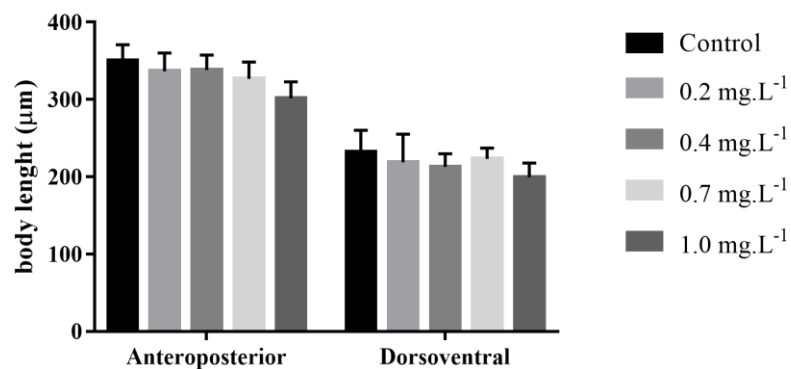


Figure 7: Body length (μm) of F1 adults derived from chronically exposed *Ceriodaphnia silvestrii* specimens to increasing concentrations of cloprostenol.

DISCUSSION

Most of toxicity screenings for *Ceriodaphnia silvestrii* are performed with pesticides and anti-inflammatories (Mansano 2016; Oliveira et al 2018). From our knowledge, this is the first toxicity study with cloprostenol for *Ceriodaphnia silvestrii*. Hormone and endocrine disrupting chemicals, however, are increasingly being studied and knowledge about their mechanisms of action and persistence on nature is growing (Peng et al. 2018).

Compounds discharged by water surrounding livestock productions are met with lower regulations and fewer studies. Adeel et al. (2017) has alerted to the potential of endocrine compounds discharge in livestock production. While natural estrogen discharges annually reach numbers of 30,000 kilograms, livestock estrogen discharge in the United States and European Union solely reach numbers of 83,000 kilograms per year.

The values of LC50 for chronic were higher than those for the acute toxicity, hence rather the concentration instead of the repeated exposure is the leading factor on toxicity and consequent mortality. Interestingly, lower values did not affect mortality, but changed reproduction rates, increasing egg numbers at 0.2 mg.L⁻¹ cloprostenol. From 0.4 mg.L⁻¹ cloprostenol onwards, the reproduction is decreased. At 1.5 mg.L⁻¹ cloprostenol, the highest chronically measured concentration, toxicity test was capable of reducing neonate production and cause 100% mortality at 96 h.

Castro et al. (2014) found LC50 values of 1.63 mg.L⁻¹ 17 α -ethynilestradiol for *Daphnia similis*. For *Daphnia magna*, LC50 values of 2.87 mg.L⁻¹ 17 β -ethynilestradiol and 1.55 mg.L⁻¹ diethylstilbestrol were found by Brennan et al. (2006). Baldwin et al. (1995) demonstrated that 0.5 mg.L⁻¹ diethylstilbestrol decrease molting frequency and impair steroid production for *Daphnia magna*. Pesticides such as carbofuran showed LC50 values of 0.86 μ g.L⁻¹ (Mansano 2016) and 3.17 mg.L⁻¹ propranolol for *Ceriodaphnia silvestrii* (Oliveira et al. 2018).

Interestingly, 0.2 mg.L⁻¹ and 0.4mgL⁻¹ cloprostenol concentrations exposure increased offspring production in the first 48 h, which led to ponder if exposure to this compound can affect reproductive and energy allocation pathways. Filtering tests on acutely exposed specimens showed an increase on filtering rates and a trend to an increased filtering rate for chronically exposed

offspring. For mammals, the most studied for cloprostenol toxicity, the exposure to cloprostenol increases RNA expression of endothelial pathways (Girsh et al. 2007). In cattle heifers, the administration of Prostaglandin F_{2α} first increase progesterone 5 minutes after injection, then decreasing (Ginther et al. 2009). Plewes et al. (2018) have shown how feeding can compensate for these hormonal disruptions in the bovine. This may infer that the specimens are compensating the hormonal changes via algal nutrient intake, or cloprostenol could be blocking the prostaglandin pathway, and specimens were feeding more to overcome such blockage.

Filtering behavior can be changed by physical and chemical components and has been studied since the last century. Smirnov (2017) discusses that many compounds, such as by nicotine, epinephrine, strychnine, and carbon dioxide can reduce *Daphnia magna* thoracic limbs movement, this reduction is also correlated with filtering capacity, which then is decreased. Araujo et al. (2019) showed that lead and mancozeb, a fungicide, decreases filtering rates of *Daphnia magna* and *Daphnia similis*. Smirnov (2017) also discusses how pesticides (e.g. glyphosate) and emergent contaminants decrease filtering rates.

We have found that exposure to cloprostenol increased filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* at the acute level, and chronically exposed organisms had, overall, a higher filtering rate, although not statistically significant. Interestingly, Könemann et al. (2019) found that filtering rates of the mollusk *Gammarus pulex* also increased downstream from a Wastewater Treatment Plant (WWTP). As it is expected to be found many endocrine disruptors downstream a WWTP plant, this change in behavior might have been caused by such compounds. As cloprostenol is a Prostaglandin F_{2α} analog, a compound endogenously present and necessary on the production of Cladoceran hormones (Heckmann et al. 2008), a sudden addition of cloprostenol might have boosted their endocrine system and topped all their endocrine regulative signalers. If that is the

case, we should have expected an increase on reproductive rates. Our results point in that direction for lower concentrations, which is not true for higher concentrations. High cloprostenol concentrations could be potentially blocking endocrine signaling and disrupting developmental stages of these specimens.

Despite that, body length of F1 adults derived from chronically exposed specimens was not significantly different, albeit showing a decreasing trend. A smaller body size could be the effect of energy allocation to reproduction, since even though specimens were feeding more as cloprostenol concentration increased, body size was not following the same trend. We suggest future studies analyzing the effects of xenohormones on Cladocera hormonal pathway and theorize an endocrine pathway in which cloprostenol might be affecting.

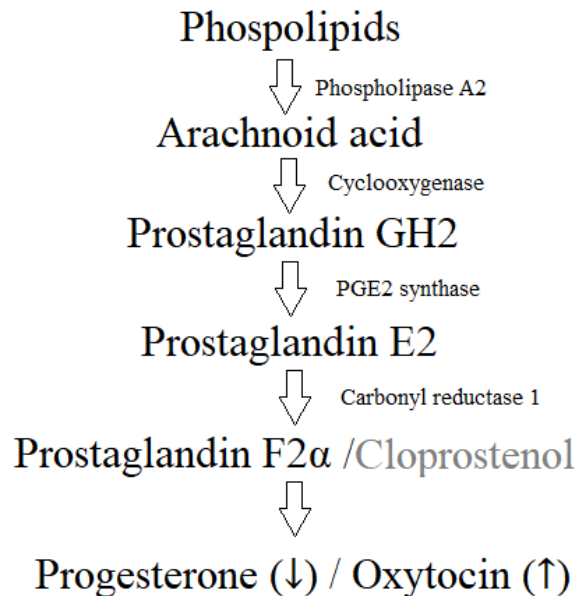


Figure 8: Hypothetical hormonal signaling pathway disruption by cloprostenol. Pathway information derived from LeBlanc 2007; Heckmann et al. 2008 and Girsh et al. 2007.

The building blocks for endocrine signaling on daphniids is taken from algae (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016). Phospholipids on the algae membrane cell are taken over by the microcrustaceans that biotransform them. Bailey & Northcote (1976) showed that, in the green algae *Hydrodictyon africanum*, the main phospholipids found were phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and diphosphatidylglycerol, respectively. Liang et al. (2008) have shown that progesterone can decrease mRNA expression of Prostaglandin F_{2α}. We hypothesized that, as the species is desensitized and cloprostenol does not yield the same strong response of the original Prostaglandin F_{2α}, organisms then start to feed on more algae to compensate that lack of signaling. Oxytocin has been shown to induce feeding behaviors and food-arousal in invertebrates (Lockard et al. 2016; Odekunle & Elphick 2020).

CONCLUSIONS

Medicinal and endocrine altering compounds released into water streams are capable of disrupting ecosystemic processes and impact the aquatic biota. Cloprostenol, used as a veterinarian medicine for swine and cow reproductive control showed toxic effects over the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, affecting its survival and reproduction. Sub-lethal levels altered filtering rates and changed neonate brood numbers. Cloprostenol was found to be chronically toxic at 0.618 mg/L⁻¹ and acutely toxic at 0.41 mg.L⁻¹ and, albeit not statistically significant, a trend for smaller adult body's size was seen for F1 specimens derived from chronically exposed *C. silvestrii* specimens, as well as an increase in the brood number of *C. silvestrii* exposed to lower

concentrations of the compound. Filtering behavior increased after exposure to cloprostenol, what potentially affects clearing rate of waters and energy transfer between lower and higher trophic animals.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Grant code 001.

DISCLAIMER

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

ABNT – Brazilian Association for Technical Standards. 2016. Aquatic ecotoxicology – acute toxicity – test method with *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR12713).

ABNT – Brazilian Association for Technical Standards. 2017. Aquatic ecotoxicology – chronic toxicity – test method with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR13373).

Adeel M, Song X, Wang Y, Francis D, Yang Y. 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environment international* 99:107-119.

Araujo GS, Pinheiro C, Pestana JLT, Soares AMVM, Abessa DMS, Loureiro S. 2019. Toxicity of lead and mancozeb differs in two monophyletic *Daphnia* species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 178:230-238.

Bailey DS, Northcote DH. 1976. Phospholipid composition of the plasma membrane of the green alga, *Hydrodictyon africanum*. *The Biochemical Journal* 156(2): 295-300.

Baldwin WS, Milam DL, LeBlanc GA. 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(6): 945-952.

Barbosa IR, Nogueira AJA, Soares AMVM. 2008. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 71(3): 757-764.

Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Kranz WL, Mader TL, Shapiro CA, Donk SJV, Shelton DP, Tarkalson DD, Zhang TC. 2012. Effect of growth promotants on the occurrence of endogenous and synthetic steroid hormones on feedlot soils and in runoff from beef cattle feeding operations. *Environmental science & technology* 46(3):1352-1360.

Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM. 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64(1):49-55.

Castro FJD, Santos DRD, Buongermino CR, Cortez FS, Pereira CD, Choeri RB, Cesar A. 2014. Ecotoxicological assessment of four pharmaceuticals compounds through acute toxicity tests. *O Mundo da Saúde* 38(1): 51-55.

Clubbs RL, Brooks BW. 2007. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67:385-398.

- Deribe E, Rosseland BO, Borgstrøm R, Salbu B, Gebremariam Z, Dadebo E, Norli HR, Eklo OM. 2011. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: the influence of lipid content and trophic position. *Science of the total environment* 410:136-145.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317:207-233.
- Folmar LC, Denslow ND, Kroll K, Orlando EF, Enblom J, Marcino J, Metcalfe C., Guillette Jr LJ. 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40(3):392-398.
- Fonseca AL. 1991. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestrii* (Crustacea: Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em teste de toxicidade aquática com efluentes industriais. Master's thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.
- Fonseca AL, Rocha O. 2004. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). *Acta Limnol. Bras.* 16(4): 319-328.
- Garric J, Ferrari B, Fraysse B, Mons R, Vollat B. 2006. Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. *Environ Risque Sante* 5(4):290-295.
- Ginther OJ, Araujo RR, Palhao MP, Rodrigues BL, Beg MA. 2009. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2alpha for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biology of reproduction* 80(4):641-648.

Girsh E, Plaks V, Gilad AA, Nevo N, Schechtman E, Neeman M, Dekel N. 2007. Cloprostenol, a prostaglandin F_{2α} analog, induces hypoxia in rat placenta: BOLD contrast MRI. *NMR Biomed.* 20:28-39.

Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131:5-17.

Heckmann L, Sibly RM, Timmermans MJTN, Callaghan A. 2008. Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. *Frontiers in Zoology* 5(1):11.

Ismail NAH, Wee SY, Aris AZ. 2017. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. *Chemosphere* 188:375-388.

Jaconetti PCM. 2005. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Master's thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

Kashian DR, Dodson SI. 2004. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5):1282–1288.

Könemann S, Müller Y, Tschentscher D, Krauss M, Inostroza PA, Brückner I, Pinnekamp J, Schiwy S, Hollert H. 2019. Combination of In Situ Feeding Rate Experiments and Chemical Body Burden Analysis to Assess the Influence of Micropollutants in Wastewater on *Gammarus pulex*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16(5):883.

Laing LV, Viana J, Dempster EL, Trznadel M, Trunkfield LA, Uren Webster TM, Van Aerle R, Paull GC, Wilson RJ, Mill J, Santos EM. 2016. Bisphenol A causes reproductive toxicity,

decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics* 11(7):526-538.

LeBlanc GA. 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16:61-81.

Li YX, Han W, Yang M, Feng CH, Lu XF, Zhang FS. 2012. Migration of natural estrogens around a concentrated dairy-feeding operation. *Environ Monit Assess* 184(8):5035-5041.

Li YX, Gao S, Liu S, Liu B, Zhang X, Gao M, Cheng L, Hu B. 2015. Excretion of manure-borne estrogens and androgens and their potential risk estimation in the Yangtze River Basin. *Journal of Environmental Sciences* 37:110-117.

Liang Z, Sooranna SR, Engineer N, Tattersall M, Khanjani S, Bennett PR, Myatt L, Johnson MR. 2008. Prostaglandin F2-alpha receptor regulation in human uterine myocytes. *Molecular human reproduction*, 14(4):215-223.

Lockard MA, Ebert MS, Bargmann CI. 2016. Oxytocin mediated behavior in invertebrates: an evolutionary perspective. *Developmental Neurobiology* 77(2):128-142.

Mansano AS. 2016. Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico. PhD thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Martin-Creuzburg D, Merkel P. 2016. Sterols of freshwater microalgae: potential implications for zooplankton nutrition. *Journal of Plankton Research* 38(4):865-877.

Merten GH, Minella JPG. 2013. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios. *International Soil and Water Conservation Research* 1(3):37-48.

Moore MN, Wedderburn RJ, Clarke KR, McFadzen IRB, Lowe DM, Readman JW. 2018. Emergent synergistic lysosomal toxicity of chemical mixtures in molluscan blood cells (hemocytes). *Environmental Pollution* 235:1006-1014.

Moreira RA, Mansano ADS, Silva LCD, Rocha O. 2014. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. *Acta Limnologica Brasiliensia* 26(1):1-8.

Navis S, Waterkeyn A, Voet T, De Meester L., Brendonck L. 2013. Pesticide exposure impacts not only hatching of dormant eggs, but also hatchling survival and performance in the water flea *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22(5):803-814.

Odekunle, EA, Elphick MR. 2020. Comparative and evolutionary physiology of vasopressin/oxytocin-type neuropeptide signaling in invertebrates. *Frontiers in Endocrinology* 11(225).

Oliveira LLD, Nunes B, Antunes SC, Campitelli-Ramos R, Rocha O. 2018. Acute and chronic effects of three pharmaceutical drugs on the tropical freshwater cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Water, Air, & Soil Pollution* 229(4):116.

Oliveira Neto AL, Botta-Paschoal CMR. 1998. Utilização da espécie de cladóceros autóctone *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday, 1902) como organismo-teste em bioensaios de toxicidade. V Simpósio Brasileiro de Ecotoxicologia, Itajai, Santa Catarina, Brazil, 1998.

Oliveira Neto AL, Matsumura-Tundisi T. 2000. Toxicidade de alguns metais pesados ('CD', 'CR', e 'PB') em organismos planctônicos lacustres de região subtropical. 2000. PhD thesis.

Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil.

- Peng X, Zheng K, Liu J, Fan Y, Tang C, Xiong S. 2018. Body size–dependent bioaccumulation, tissue distribution, and trophic and maternal transfer of phenolic endocrine-disrupting contaminants in a freshwater ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(7):1811-1823.
- Peters RH. 1984. Methods for the study of feeding, grazing, and assimilation by zooplankton. p. 336–412, In Downing JA, Rigler FH, eds, *A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*, 2nd ed, Blackwell Scientific publications, Oxford, United Kingdom, chapter 9.
- Plewes MR, Cedillo JC, Burns PD, Graham PE, Bruemmer JE, Engle, TE. 2018. Effect of fish meal supplementation on luteal sensitivity to intrauterine infusions of prostaglandin F2 α in the bovine. *Biology of reproduction* 98(4):543-557.
- Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Adeel M., Iqbal HM. 2019. Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment international* 122:52-66.
- Ribeiro MM. 2011. O potencial de *Ceriodaphnia cornuta* Sars (1885) fa rigaudi como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos: uma comparação congênere. Master's thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Richmond EK, Rosi EJ, Walters DM, Fick J, Hamilton SK, Brodin T, Sundelin A, Grace MR. 2018. A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. *Nature communications* 9(1):1-9.

Smirnov, N. N. 2017. *Physiology of Cladocera*, 2nd ed, Academic Press, London, United Kingdom.

Soucek DJ. 2007. Bioenergetic effects of sodium sulfate on the freshwater crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology* 16:317-325.

Zhang Y, Zhao Q, Cao Z, Ding S. 2019. Inhibiting Effects of Vegetation on the Characteristics of Runoff and Sediment Yield on Riparian Slope along the Lower Yellow River. *Sustainability* 11(13):3685.

7 CAPÍTULO 3 – Life history traits and toxicity of endocrine compounds 17 α -ethynilestradiol and Estrone on *Ceriodaphnia silvestrii* Daday 1902

Adolfo Paulo de Mattos Junior¹, Maria Jose dos Santos-Wisniewski¹

¹Universidade Federal de Alfenas, rua Gabriel Monteiro da Silva, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, 37.130-000, Brazil.

Abstract

Hormonal release into water bodies is increasing to the extent that anthropic activities are expanding, and the amounts of compounds that can disrupt ecosystems are growing extensively. Our study analyzed the toxicity of two endocrine disrupting compounds, Estrone and 17 α -ethynilestradiol on survival, reproduction, and development of the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. For 17 α -ethynilestradiol, we have found a LC₅₀ acute toxicity of 0.23 ± 0.03 mg.L⁻¹ and a LC₅₀ chronic toxicity of 0.89 ± 0.26 mg.L⁻¹, and for estrone our experiments returned an acute toxicity LC₅₀ of 0.71 ± 0.07 mg.L⁻¹ and chronic toxicity LC₅₀ of 0.543 ± 0.17 mg.L⁻¹. Egg production was impacted with different concentrations of such compounds, suggesting that these endocrine disruptors act upon the reproductive physiological axis of the cladoceran. Time for primipary was also affected by the exposure to these compounds, resulting in earlier primipary.

Key-words: Zooplankton, Freshwater, Hormone, Water quality.

Introduction

Emergent contaminants are found in water worldwide (Rasheed et al. 2019) and are of increasing concern for public and ecological health. Most of these contaminants are pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors (Gogoi et al. 2018). They are a by-product of anthropic impacts generated by human occupation. They can reach water bodies through sewage disposal where, even with sewage treatment, microcontaminants are minimally

reduced (Wojnarowicz 2014). Public health agents have been largely concerned about the effects of those compounds on aquatic life and human consumption of these potentially deregulated and intoxicated specimens (Schnitzler et al. 2011).

Endocrine disruptors, so called because of its effects on endocrine pathways, are getting attention since their source range is wide. Bisphenol-A, a plasticizer, pesticides, and medicines for hormonal control and reposition, such as 17 α -ethynilestradiol (Smirnov 2017) are some examples of these disruptors. Toxicity studies on *Daphnia magna* found that LC₅₀ (Lethal concentration 50) values of 7.75 mg.L⁻¹ for Bisphenol-A (Brennan et al. 2006). Moreira et al. (2014) found LC₅₀ of 14.3 mg.L⁻¹ for atrazine, and Clubbs & Brooks (2007) 2,590.4 μ g.L⁻¹ for 17 α -ethynilestradiol on *Daphnia magna*. Pesticides such as carbofuran and propranolol showed LC₅₀ values of 0.86 μ g.L⁻¹ (Mansano 2016) and 3.17 mg.L⁻¹ (Oliveira et al. 2018), respectively, for *Ceriodaphnia silvestrii*.

The presence of synthetical and natural hormones in water bodies have been described in sewage release sites and wastewater treatment plants (Kumar et al 2008; Orlando & Ellestad 2014). Releases of such compounds reach water bodies and disperse through the water stream, with Reis Filho (2008) and Peteffi et al. (2019) demonstrating that endocrine disrupting compounds such as estrone (E1) and 17 α -ethynilestradiol (EE2) are found in water bodies, in urban areas specially (Belfroid et al. 1999, Heberer 2002, Mouatassim-Souali et al. 2003, Sousa et al. 2010). Despite the advances in water treatment technology, clearance of hormones in water is still a difficult task to accomplish. Even when properly developed, water treatment technology will not be ubiquitous, and less developed areas will lag without the proper development. Waters surrounding Wastewater Treatment Plants (WWTPs) have higher amounts of endocrine compounds due to the continuous discharges and low clearance. Teixeira (2016) found estrone (E1), estriol, 17 β -ethynilestradiol (E2) and 17 α -ethynilestradiol (EE2) at mg levels at a sewage plant.

Hormonal presence in water bodies have been linked to biota impacts. Clubbs and Brooks (2007) studied the effects of endocrine disruptors EE2 and faslodex in *Daphnia magna*, demonstrating the effects of below-toxicity levels in endocrine signaling. Testosterone, another endocrine compound, decreases the production of resting eggs in *Brachionus calyciflorus* (Tian et al. 2017). EE2 at ng levels have been shown to decrease body length and induce premature reproduction *Daphnia magna* (Dietrich et al., 2010). E1 has been found to induce metabolic

changes in the oligochaetan *Eisenia fetida* (McKelvie et al., 2011) and to be incorporated by *Daphnia magna* while in the aqueous medium (Gomes et al., 2004).

Zooplankton species are commonly used for toxicity screenings, many being standardized. Brazilian Standard Agency has already standardized the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, an endemic South American zooplankton, for both acute and chronic toxicity screens (ABNT 2016, ABNT 2017). Since species have different thresholds for toxicity, studies with different species help elucidate the impacts of xenobiotics in the biota more effectively. Besides *Daphnia magna*, other zooplankton species are currently used for toxicity essays, such as *Ceriodaphnia dubia* (Lameira, 2008), *Ceriodaphnia silvestrii* (Fonseca, 1991, Freitas et al., 2018), and *Daphnia similis* (Castro et al., 2014).

Toxicity studies with endemic species such as the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* aids for a better comprehension of impacts regionally. This study aims to assess toxicity levels of two endocrine compounds commonly found in anthropically impacted water bodies, the synthetic birth control 17 α -ethynilestradiol (EE2) and the natural hormone Estrone (E1), in the survival, development and reproduction of *Ceriodaphnia silvestrii*.

Methods

Species

Ceriodaphnia silvestrii were collected from Furnas reservoir, Minas Gerais, and acclimated for 10 generations. Organisms were maintained on 1L reconstituted water, hardness of 40-48 mg CaCO₃ L⁻¹ beakers, and aerated and replaced every 2 days, with temperature of 25 \pm 1 °C in 12:12 light/dark cycles, fed with 10⁵ cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae enriched with yeast (5 g.L⁻¹) and Tetramin® fish ration (5 g.L⁻¹) on 1:1 proportion.

Compounds

17 α -ethynilestradiol (CAS 57-63-6) powder, 98% purity, was purchased from Sigma-Aldrich® and kept on room temperature, diluted on 20 mL of 100% acetone, yielding a concentration of 5 g.L⁻¹. Estrone (CAS 53-16-7) powder, 98% purity, was purchased from Sigma-

Aldrich® and kept on room temperature, diluted in 8.5 mL of 100% acetone, with a final concentration of 11.5 g.L⁻¹.

Sensitivity test

Sensitivity tests were conducted with NaCl, for 48 hours, following ABNT guidelines (2016). The chosen dilutions, 0, 0.1, 0.25, 0.6 and 1.5 g.L⁻¹, were based on Jaconetti (2005) study.

17 α -ethynilestradiol acute test

After preliminary tests to define working concentrations and positive control for the solvent, aliquots of 0, 0.3, 0.6, 1, 2, and 3 mg.L⁻¹ were diluted on 50 mL of reconstituted water. Ten neonates per cup were kept for 48 hours at dark in 25 ± 1 °C, following ABNT guidelines (ABNT, 2016).

17 α -ethynilestradiol chronic test

After assessing LC₅₀ on acute test (48 h) for 17 α -ethynilestradiol in *Ceriodahphnia silvestrii*, aliquots of 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg.L⁻¹ were diluted in 50 mL reconstituted water with 2 x 10⁵ cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae concentration, following ABNT guidelines (2017). Organisms were kept for 7 days in 12:12 light/dark cycles in 25 ± 1 °C, with water replacement at every 2 days which enabled brood counting at days 2, 4, 6 and 7 of the experiment.

Estrone acute test

After preliminary tests to define working concentrations, aliquots of 0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.59, and 3.18 mg.L⁻¹ were diluted on 50 mL of reconstituted water. 10 neonates per cup were kept for 48 hours at dark in 25±1 °C, following ABNT guidelines (ABNT, 2016).

Estrone chronic test

After assessing LC₅₀ on acute test (48 hours) for estrone, aliquots of 0, 0.09, 0.19, 0.38, 0.95, and 1.9 mg.L⁻¹ were diluted in 50 mL reconstituted water with 2 x 10⁵ cells.mL⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae concentration, following ABNT guidelines (2017). Organisms

were kept for 7 days in 12:12 light/dark cycles in 25 ± 1 °C. with water replacement at every 2 days, which enabled counting of broods at the days 2, 4, 6 and 7 of the experiment.

Age of first reproduction test

To assess developmental disruptions on *Ceriodaphnia silvestrii*, five neonates were assembled in disposable cups containing 30 mL reconstituted water, hardness of 40-48 mg $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, with 10^5 cells. mL^{-1} *Raphidocelis subcapitata* algae and two concentrations of each compound: 1.6 mg. L^{-1} and 3.2 mg. L^{-1} for E1, 0.5 mg. L^{-1} and 1 mg. L^{-1} for EE2. Time until first reproduction was assessed by optical visualization through Zeiss Stereoscope at each 4 hours.

Results

Sensibility tests with NaCl returned LC_{50} of 1.063 g. L^{-1} ($n=14$, $p= 0.0008$). Acute toxicity with EE2 found LC_{50} of 0.23 mg. L^{-1} , as seen in figure 1. Figure 2 shows neonate production average, which was significantly different between concentrations (one-way ANOVA $p=0.0036$) and chronic toxicity of *C. silvestrii* exposed to EE2. LC_{50} of EE2 chronic toxicity found was 0.89 mg. L^{-1} . For E1, acute toxicity LC_{50} found was 0.71 mg. L^{-1} (figure 3). Average neonate production was significantly different between the concentrations (one-way ANOVA, $p<0.0001$) and chronic toxicity LC_{50} found was 0.543 mg. L^{-1} (figure 4).

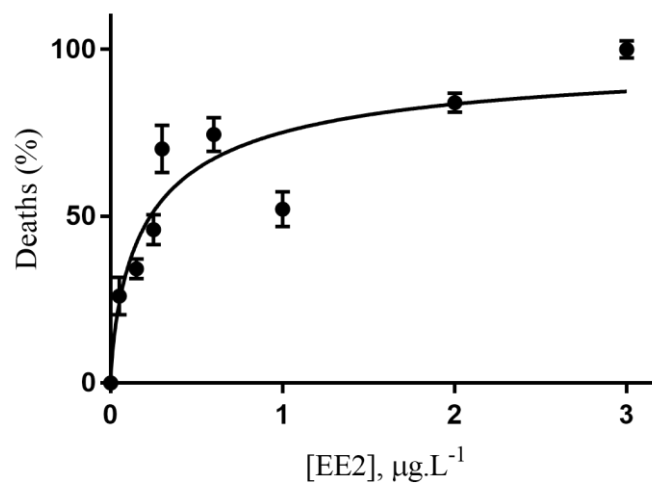


Figure 1: Mortality of *Ceriodaphnia silvestrii* acutely exposed to increasing concentrations of 17 α -ethynylestradiol. $LC_{50} = 0.23 \pm 0.03 \text{ mg.L}^{-1}$.

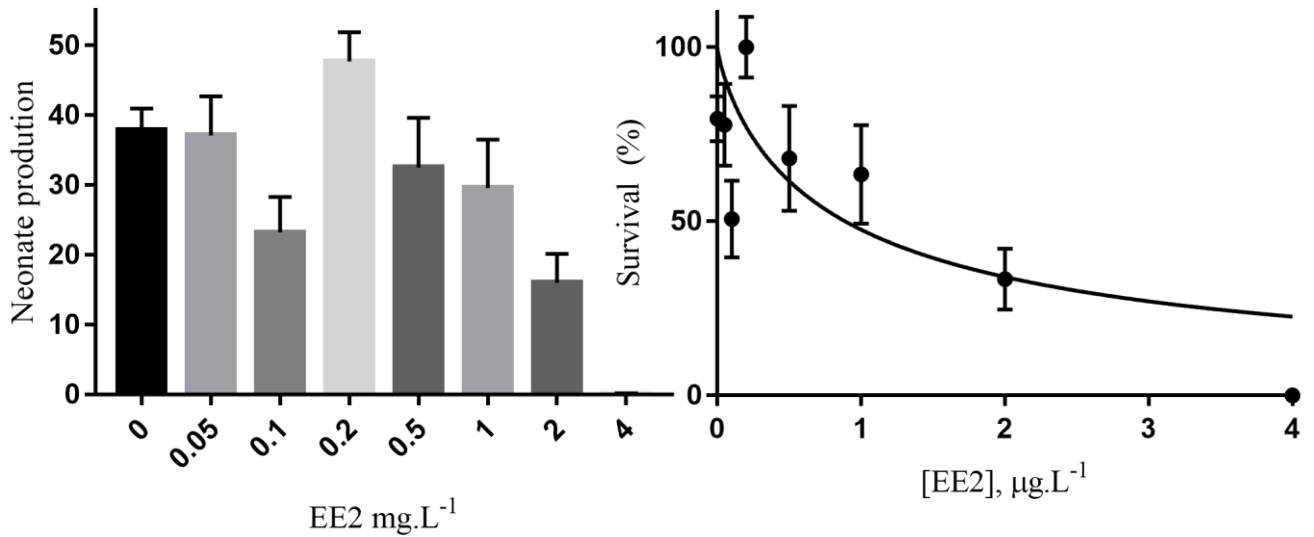


Figure 2: Neonate average brood number and survival (%) of *Ceriodaphnia silvestrii* chronically exposed to increasing concentrations of 17 α -ethynylestradiol. $LC_{50} = 0.89 \pm 0.26 \text{ mg.L}^{-1}$.

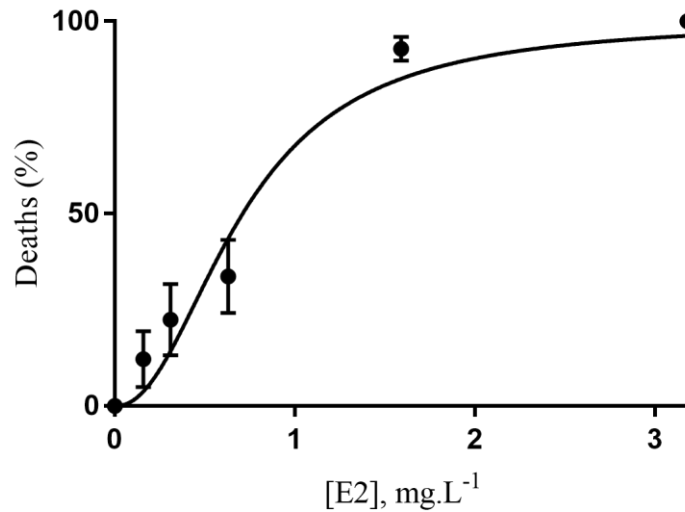


Figure 3: Mortality (%) of *Ceriodaphnia silvestrii* acutely exposed to increasing concentrations of estrone. $LC_{50} = 0.71 \pm 0.07 \text{ mg.L}^{-1}$.

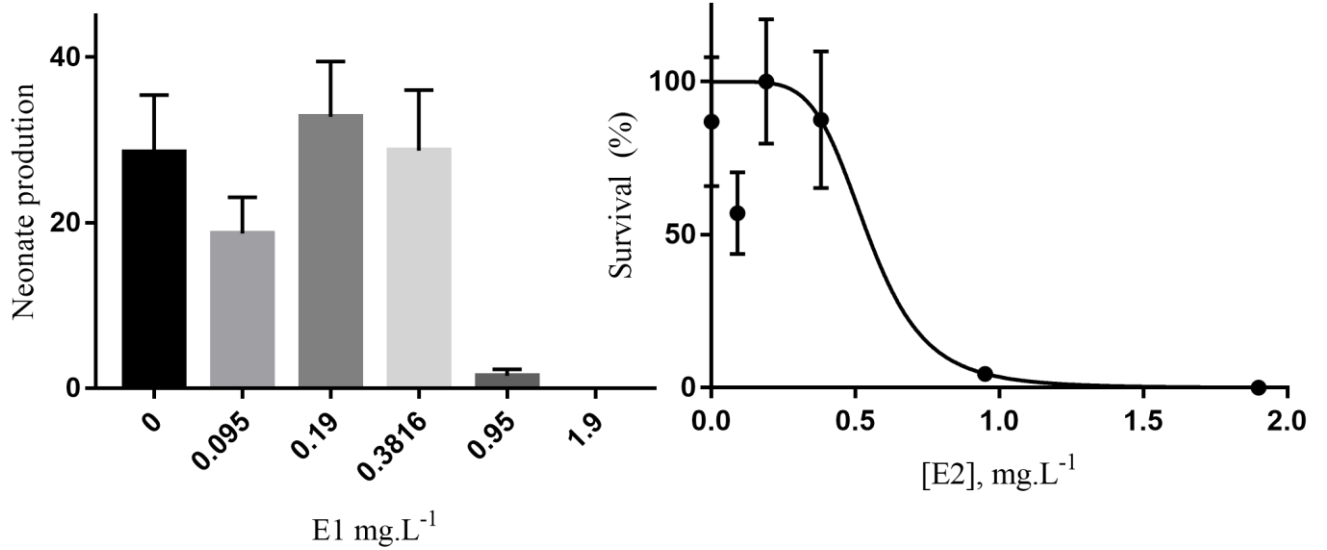


Figure 4: Neonate average brood number and survival (%) of *Ceriodaphnia silvestrii* chronically exposed to increasing concentrations of estrone. $LC_{50} = 0.543 \pm 0.17$ mg.L⁻¹.

Figure 5 shows age of first reproduction in hours for specimens exposed to the endocrine disrupting compounds E1 and EE2. *C. silvestrii* exposed to the compounds had premature reproduction compared to control (RM one-way ANOVA, $n=5$, $p=0.0107$).

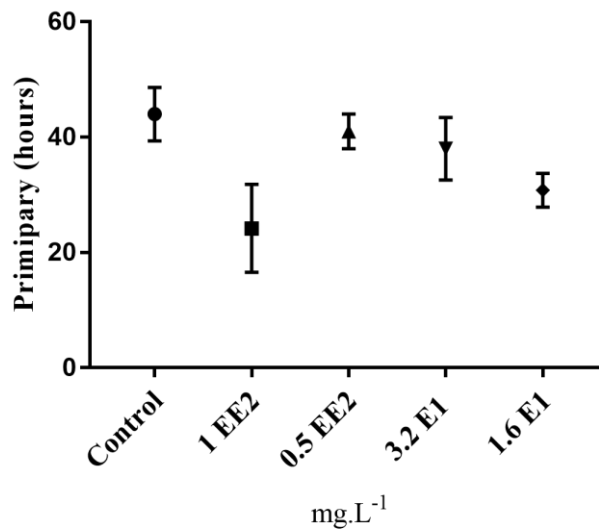


Figure 6: Age of first reproduction in hours for *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to two different concentrations of E1 and EE2.

Discussion

Toxicity levels of 17 α -ethynilestradiol found in this study are lower than those commonly reported for *Daphnia magna*, for example, Clubbs and Brooks (2007) found to be 2.59 mg.L⁻¹ for EE2. This seems to be in line with previous literature which states that *C. silvestrii* has lower tolerance levels to xenobiotics (Versteeg et al., 1997). Castro et al. (2014) found LC₅₀ values of 1.63 mg.L⁻¹ 17 α -ethynilestradiol for *Daphnia similis*, also higher than the toxicity found in this study (0.89 mg.L⁻¹). For *Daphnia magna*, LC₅₀ values of 2.87 mg.L⁻¹ 17 β -ethynilestradiol and 1.55 mg.L⁻¹ diethylstilbestrol were observed by Brennan et al. (2006). Moreira et al. (2014) found that *C. silvestrii* is more sensitive than *D. magna* to the herbicide atrazine.

Interestingly, toxicity for EE2, both acute and chronic, showed a sigmoidal structure, in which lower concentrations evoked deleterious responses, a mid-concentration increased likelihood of survival, and then a decrease again. This fact points to the existence of regulatory pathways in *Ceriodaphnia silvestrii* that compensate or block such compounds. Giraudo et al. (2017) have demonstrated that genes that regulate ecdysteroid pathways were upregulated following exposure to molting disrupting compounds, benzotriazoles. Baldwin et al. (1995) demonstrated that 0.5 mg.L⁻¹ diethylstilbestrol decreased molting frequency and fecundity of *D. magna*. At our study, E1 and EE2 induced premature reproduction, and higher concentrations decreased brood numbers.

Previous studies on the reproductive effects of exposure to EE2 did not report differences in reproduction in lower concentration levels (0.005 to 0.5 mg/L⁻¹) for *Ceriodaphnia dubia* (Jukosky et al., 2008), even though contrasting results showing decrease reproduction at 22 ng.L⁻¹ is also cited (Reis Filho, 2008). Clubbs and Brooks (2007) demonstrated that vitellogenin levels and ecdysteroid levels are disrupted and increased by the exposure to EE2 in *Daphnia magna*, which reflected in a lower reproduction yield for the organisms. We have also observed in our study differences in the reproduction in the concentrations that Clubbs and Brooks (2007) tested, but lower concentrations yielded a higher egg production. Endocrine responses and feedback loops to the levels of xenohormones might explain the sigmoidal aspect of the reproduction graph, as well as the presence of algae. Kovacevic et al. (2019) observed that the amount of organic matter in water lessened the impacts of EE2 in *Daphnia magna*. Something similar might have happened in our study.

Zooplankton toxicity studies to E1, when compared to EE2, are seldom reported. As estrone is a natural hormone that can be excreted by humans and aquatic organisms, it is expected that evolutionary counterbalancing physiological responses arose, contrasting with an artificial hormone recently developed. E1 exposure can change metabolic responses on *Eisenia fetida* (McKelvie et al., 2011) and be incorporated by *Daphnia magna* (Gomes et al., 2004). Our results demonstrated that E1 affects reproduction, survivorship, and age of first reproduction in *C. silvestrii*.

Chronic toxicity enabled a distinct reproductive profile for E1. Rather than a linear regression, as it was seen on acute toxicity, chronic exposure at lower levels increased reproduction. Since chronic tests differentiate from acute by the presence of food, algal feeding in the chronic test can be responsible for differential response. As stated before, Kovacevic et al. (2019) found that organic matter plays a role onto EE2 toxicity in *Daphnia magna*. As algae cellular membranes have many phospholipids that can act endocrinally (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016), they might interfere increasing or decreasing hormonal responses of these specimens.

To further develop our hypothesis regarding hormonal deregulations caused by E1 and EE2, a test for age of first reproduction time was performed, in which both concentrations and compounds produced differential time onsets. Heckmann et al. (2008) found that, in the presence of ibuprofen, *Daphnia magna* fecundity is reduced and that high concentration brood releases were underdeveloped. Our results showed that brood production was severely decreased at higher concentrations of E1 and EE2. Not solely the exposure to xenohormones, but also the concentration seems to affect reproductive development. Dietrich et al. (2010) found that diclofenac and carbamazepine delayed reproduction, while EE2 and metoprolol decreased body length at first reproduction. A mix of all these drugs increased body length at first reproduction and reduced age of reproduction (Dietrich et al., 2010). It has been proved that xenohormones can alter reproductive pathways, as seen in Zou (2005), where diethylstilbestrol induced chitobiase, a molting-regulatory enzyme. From our preliminary experiment, E1 and specially EE2 can anticipate reproductive stages in *C. silvestrii*, thus changing brood sizes and community structure.

Conclusions

Exposure to Estrone (E1) and 17 α -ethynilestradiol (EE2) can disrupt survival, reproduction, and onset of first reproduction in *Ceriodaphnia silvestrii* specimens. Albeit toxic concentrations used in this study are not commonly found in water streams, water resources close to sewage discharge sites might be severely impacted by xenohormones, since they are poorly removed in water treatment processes. Neonate brood numbers seems to be firstly induced in lower concentration levels of both E1 and EE2, which will impact biomass production, community structure, competitiveness, and filtering rates in the water body. Higher concentrations decrease survival and neonate broods in both E1 and EE2 exposure. Premature reproduction age for *Ceriodaphnia silvestrii* led by the exposure to xenohormones can also impact community structure and population dynamics of the aquatic biota.

Acknowledgment

This work was sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Grant code 001.

References

- ABNT – Brazilian Association for Technical Standards. 2016. Aquatic ecotoxicology – acute toxicity – test method with *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR12713).
- ABNT – Brazilian Association for Technical Standards. 2017. Aquatic ecotoxicology – chronic toxicity – test method with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR13373).
- Baldwin WS, Milam DL, LeBlanc GA. 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(6): 945-952.
- Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*, 225(1-2):101-108.

- Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM. 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64(1):49-55.
- Castro FJD, Santos DRD, Buongiorno CR, Cortez FS, Pereira CD, Choeri RB, Cesar A. 2014. Ecotoxicological assessment of four pharmaceuticals compounds through acute toxicity tests. *O Mundo da Saúde* 38(1): 51-55.
- Clubbs RL, Brooks BW. 2007. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67:385-398.
- Dietrich S, Ploessl F, Bracher F, Laforsch C. 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere* 79:60-66.
- Fonseca AL. 1991. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestrii* (Crustacea: Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em teste de toxicidade aquática com efluentes industriais. Master's thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.
- Freitas EC, Rocha O, Espíndola ELG. 2018. Effects of forfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotoxicol Environ Saf* 162:663-672.
- Giraud M, Douville M, Cottin G, Houde M. 2017. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine disrupting potential and molting effects. *PLoS ONE* 12(2):e0171763.
- Gogoi A, Mazumder P, Tyagi VK, Chaminda GT, An AK, Kumar M. 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. *Groundwater for Sustainable Development* 6:169-180.
- Gomes RL, Deacon HE, Lai KM, Birkett JW, Scrimshaw MD, Lester JN. 2004. An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(1):105-108.

- Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131:5-17.
- Heckmann L, Sibly RM, Timmermans MJTN, Callaghan A. 2008. Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. *Frontiers in Zoology* 5(1):11.
- Jaconetti PCM. 2005. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Master's thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Jukosky JA, Watzin MC, Leiter JC. 2008. Elevated concentrations of ethinylestradiol, 17 β -estradiol, and medroxyprogesterone have little effect on reproduction and survival of *Ceriodaphnia dubia*. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:230-235.
- Kovacevic V, Simpson AJ, Simpson MJ. 2019. The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -ethinylestradiol and perfluorooctane sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170:468-478.
- Kumar V, Chakraborty A, Viswanath G, Roy P. 2008. Androgenic endocrine disruptors in wastewater treatment plant effluents in India: Their influence on reproductive processes and systemic toxicity in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 226:60-73.
- Lameira V. 2008. Estudos dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). Master's thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Mansano AS. 2016. Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico. PhD thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.
- Martin-Creuzburg D, Merkel P. 2016. Sterols of freshwater microalgae: potential implications for zooplankton nutrition. *Journal of Plankton Research* 38(4):865-877.

McKelvie JR, Wolfe DM, Celejewski MA, Alaei M, Simpson AJ, Simpson MJ. 2011. Metabolic responses of *Eisenia fetida* after sub-lethal exposure to organic contaminants with different toxic modes of action. *Environmental Pollution* 159:3620-3626.

Moreira RA, Mansano ADS, Silva LCD, Rocha O. 2014. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. *Acta Limnologica Brasiliensia* 26(1):1-8.

Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak SL, Perdiz D, Cargouet M, Levi Y. 2003. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. *J Sep Sci* 26(1-2):105-111.

Oliveira LLD, Nunes B, Antunes SC, Campitelli-Ramos R, Rocha O. 2018. Acute and chronic effects of three pharmaceutical drugs on the tropical freshwater cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Water, Air, & Soil Pollution* 229(4):116.

Orlando EF, Ellestad LE. 2014. Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 203:241-249.

Petteffi GP, Fleck JD, Kael IM, Rosa DC, Antunes MV, Linden R. 2019. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River - Basin Rio Grande do Sul - Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 79(4):712-721.

Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Adeel M., Iqbal HM. 2019. Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment international* 122:52-66.

Reis Filho RW. 2008 Hormônios estrógenos no rio do Monjolinho, São Carlos - SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais. PhD thesis. Universidade De São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Schnitzler JG, Thomé JP, Lepage M, Das K. 2011. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Science of the Total Environment* 409(19):3680-3686.

- Smirnov, N. N. 2017. *Physiology of Cladocera*, 2nd ed, Academic Press, London, United Kingdom.
- Sousa A, Schonenberger R, Jonkers N, Suter MJF, Tanabe S, Barroso CM. 2010. Chemical and biological characterization of estrogenicity in effluents from wwtps in Ria de Aveiro (NW Portugal). *Arch Environ Contam Toxicol* 58:1-8.
- Teixeira RB. 2016. Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de tratamento de esgoto por lodos ativados. Master's thesis. Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, Brazil.
- Tian J, Liu L, Han Y, Yang Y, Jin S, Yang J. 2017. Effects of testosterone and flutamide on reproduction in *Brachionus calyciflorus*. *Scientific reports* 7(6569).
- Versteeg DJ, Stalmans M, Dyer SD, Janssen C. 1997. Ceriodaphnia and Daphnia: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere* 34(4):869-892.
- Wojnarowicz P, Yang W, Zhou H, Parker WJ, Helbing CC. 2014. Changes in hormone and stress-inducing activities of municipal wastewater in a conventional activated sludge wastewater treatment plant. *Water research* 66:265-272.
- Zou E. 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* 45(1):33-38.

8 CAPÍTULO 4 - Xenohormones cloprostenol, estrone and 17 α -etinilestradiol alters filtering rates of the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* DADAY 1902.

**XENOHORMONES CLOPROSTENOL, ESTRONE AND
17 α -ETINILESTRADIOL ALTERS FILTERING RATES OF THE TROPICAL
CLADOCERAN *Ceriodaphnia silvestrii* DADAY 1902**

Adolfo Paulo de Mattos Júnior*¹, Maria José dos Santos Wisniewski².

¹Mestrando em Ciências ambientais, Universidade Federal de Alfenas, adolfopmattos@gmail.com

²Profª. Drª. Universidade Federal de Alfenas, Universidade Federal de Alfenas, czw@uol.com.br

RESUMO Contaminantes emergentes presentes em corpos d'água estão sendo estudados por seu efeito no ecossistema aquático. Disruptores endócrinos são um conjunto de compostos que podem afetar a sobrevivência, a reprodução e a filtração de espécimes zooplanctônicos quando expostos a estes xenocompostos. Este estudo analisou as taxas de filtração de espécimes de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos a concentrações crescentes de cloprostenol, 17 α -etinilestradiol e estrona, e demonstrou que cloprostenol diminuiu as taxas de filtração em todas as concentrações testadas ($p= 0.0254$), estrona aumentou as taxas de filtração proporcionalmente à concentração testada ($p= 0.0075$), e 17 α -etinilestradiol não demonstrou diferença significativa na taxa de filtração nas concentrações testadas. Estes resultados comprovam que xenocompostos em concentrações não-letais impactam a herbivoria, assim afetando o tamanho populacional das algas e a transferência de energia no ecossistema.

Palavras-Chaves: Contaminantes emergentes; Eutrofização; Herbivoria; Zooplâncton.

ABSTRACT Emergent contaminants found in water bodies are being studied for its effects on the biota and the ecosystem. Endocrine disrupting compounds are a subset that can affect survivability, reproduction and filtering of zooplankton specimens when exposed to these xenocompounds. This study assessed filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* specimens exposed to increasing concentration of cloprostenol, 17 α -ethynilestradiol and estrone, and found that cloprostenol decreased filtering rates at all concentrations assessed ($p= 0.0254$), estrone increased filtering in a concentration-wise manner ($p= 0.0075$), and 17 α -ethynilestradiol showed no differences in filtering rates. These results demonstrated that xenocompounds in below-survivability concentrations can affect clearance rates, thus affecting algal population sizes and energy transfer in the ecosystem.

Key words: Algal clearance; Emerging contaminants; Eutrophication; Zooplankton.

INTRODUCTION

Water quality and management has been a pivotal public issue of the 21st century, since climate change might disrupt water security and because of degrading qualities of water which are anthropized (VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010). Most of the problems that arise from water bodies surrounded by human activities are linked to eutrophication, water depletion and xenobiotics discharged into the water resource (SABATER *et al.*, 2018). To reduce and repair such impacts over water bodies, efforts in water treatment technology development (BARTOLOMEU *et al.*, 2018), biocontrol (SOTO; MENA, 1999) and manual interference (PRAT *et al.*, 1999) have been put in practice.

Freshwater environments are complex ecosystems that thrive on physical, chemical, and biological components to maintain its characteristics (EDITION, 2011). Disruption in any of these aspects can impact the aquatic ecosystem, changing community structure, biomass production, transparency, to name a few. Eutrophication, for example, which is an increase on nutrient concentration and algae blooms in the water (GLIBERT, 2017) is a consequence of disruption of these aspects. Hanazato (2001) has shown that, when exposed to pesticides, zooplankton species

have disrupted energy transfer rates and community structure is also modified.

From aquatic communities that are found in the water, one of the most important for the water ecosystem equilibrium is the zooplanktonic community. Comprised of rotifers, copepods, cladocerans, nematodes, protozoans, insect larvae and ostracodes (WETZEL; LIKENS, 2000), this community is central for nutrient cycles and energy transferences (JONES; HENDERSON, 1987). Changes in the zooplankton community structure are expected to be found in interfered water ecosystems, and many taxa has been used as bioindicators of eutrophic environments and low-quality water (SLADECEK, 1983; PERBICHE-NEVES *et al.*, 2013).

Zooplankton is vital for proper nutrient cycling and food-chain control (BANSE, 1995). Assessment of the zooplankton community structure and key species are often used to assess ecological health of the water environment (SLADECEK, 1983). One of such bioindicators is the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. Herbivore, pelagic and filtering zooplankton, widespread on Latin-American countries (FONSECA; ROCHA, 2004), *C. silvestrii* is currently used on ecotoxicological screenings (MANSANO *et al.*, 2018). The use of local

indicators is trivial for understanding the impacts that can arise locally, and *C. silvestrii* is one of such indicators.

Compounds released into water stream greatly affect water ecosystems and is thoroughly studied (RASHEED *et al.*, 2019). It is known that many xenobiotics can interfere with fish (GARRIC *et al.*, 2006) amphibians (BRODEUR *et al.*, 2009) and zooplankton (CLUBBS; BROOKS, 2007). Sewage disposal has been loading water environments with many medicines and other such compounds without a real concern about the changes and impacts they might have on the aquatic biota. Many studies have also shown the presence of contaminants in urban wastewater (BELFROID *et al.*, 1999; MOUATASSIM-SOUALI *et al.*, 2003; ARCHANA *et al.*, 2017; PETEFFI *et al.*, 2019)

Run-offs are other source of water contamination. Run-offs are the product of precipitated water loaded with nutrients and any other compounds that are on soil surfaces that are carried to water bodies (HUANG *et al.*, 2005). The increased burden on water resources and soil by human activity is suppressing riparian vegetation (MERTEN; MINELLA, 2013) and studies have already found that when vegetation surrounding a water body is suppressed, run-off load volume entering the aquatic system increases (ZHANG *et*

al., 2019). Run-offs are not only increasing nutrient load onto water bodies, leading to eutrophication, but also contaminating with xenocompounds, such as heavy metals (REDDY *et al.*, 2014), herbicides (HUANG *et al.*, 2005) and farmed animal's excrements (LI *et al.*, 2015). Bartelt-Hunt *et al.* (2012) found hormonal compounds into water streams close to swine farms and Li *et al.* (2012) found 17 α -ethynilestradiol on rural water bodies. With advances in farming technology and the creation of pharmaceutical medicines to use in veterinarian approaches, discharges on endocrine disrupting compounds will presumably become more and more common. Adeel *et al.* (2017) stated that, solely by the United States and European Union, 83,000 kilograms of estrogen are discharged by livestock activities each year.

Therefore, since hormonal treatment compounds can reach water bodies through sewage discharge or run-offs and interact with the organisms living within, this study aims to analyze the effects of the exposure to three xenohormones: Cloprostenol, a prostaglandinF2 α analog; Estrone, a natural hormone; and 17 α -ethynilestradiol, an artificial contraceptive hormone, on the filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii*.

METHODS

Organisms

Ceriodaphnia silvestrii specimens were collected from Furnas Reservoir and acclimated on reconstituted water, hardness 48 mg CaCO₃.L⁻¹, fed with 10⁵ cells.L⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae, enriched with yeast (5 g.L⁻¹) and Tetramin® fish ration (5 g.L⁻¹) on 1:1 proportion. Organisms were maintained at 25± 1°C in 12:12h light-dark cycles.

Compounds

Liquid sodium cloprostenol was purchased from agricultural shops. From the stock concentration, 25mg, aliquots of 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 and 1.5 mg.L⁻¹ were taken and distributed accordingly. Estrone (CAS 53-16-7), purity 98%, was purchased from Sigma-Aldrich®, kept at room temperature. The stock concentration (1g) was diluted in 8.5 mL of 100% acetone, and aliquots of 0.3, 0.6 and 0.9 mg.L⁻¹ were taken for the experiment. 17 α -ethynylestradiol (CAS 57-63-6), 98% purity, was purchased from Sigma-Aldrich® and kept at room temperature. The stock concentration, 100mg, was diluted in 20 mL of 100% acetone, and aliquots of 50, 150 and 150 μ g.L⁻¹ were taken for the experiment.

Filtering test

Filtering test was based on Peters (1984) equation, in which filtering rate is the natural log difference between final and initial concentration, times volume, times the number of individuals times duration of the experiment in hours. Algae initial and final numbers were counted on Neubauer's chamber. *C. silvestrii* adults were taken from the stock, left unfed, and placed on plastic cups containing 30mL of reconstituted water, hardness 48 mg CaCO₃.L⁻¹, 25 °C, with 10⁵cells.L⁻¹ *Raphidocelis subcapitata* algae and the test concentrations of the three compounds. Specimens were left filtering for 4 hours.

Statistics

Statistical tests (Anova one-way) and graphs were made on Prisma 7 ® software, and results are expressed as mean ± standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

The effects of xenocompounds in cladoceran filtering is an important asset for ecological implications, especially regarding community structure, energy transfer, and bottom-up/top-down control (HANAZATO, 2001). Ekvall *et al.* (2014) have states that zooplankton grazing actively controls cyanobacterial biomass, a mechanism that has implications in

eutrophication processes and water quality. Since our results showed that xenocompounds affect filtering behavior, the presence of such compounds can impact algal biomass.

Most of the classical studies are focused on salt and metal effects on survivability and filtering behaviors of cladocerans (SOUCEK, 2007). Rodgher *et al.* (2008) sees the uptake and decrease on filtering of *C. silvestrii* exposed to copper. Smirnov (2017) discusses later studies tackling the effects of pesticides such as glyphosate decreasing filtering rates. Novel toxicology dealing with emerging contaminants and endocrine disrupting compounds such as the compounds in this study is also increasing scientific bibliography on the effects of hormonal disrupting chemicals in zooplanktonic behavior (DODSON; HAZANATO, 1995; KÄLLQVIST *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2019).

Algal filtering, which constitutes the main feeding source for filter feeder such as *C. silvestrii*, promote the intake of algal cell membranes. This uptake of algal cells containing phospholipids such as phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol (BAILEY; NORTHCOTE, 1976), that enter hormonal signaling pathways in Cladocera, can play a role in the mechanisms of each

xenocompound and cladoceran behaviors towards its filtering rates. For lindane, for example, filtering rates have decreased (GLIWICZ; SIENIAWSKA, 1986). For 2,4,2',4' - tetrabromodiphenyl ether, no filtering change was observed (KÄLLQVIST *et al.*, 2006). For mancozeb, feeding rate was also suppressed (ARAUJO *et al.*, 2019).

Filtering rates were affected differently for each compound. Sodium cloprostenol reduced filtering rates, regardless of the concentration assessed ($p=0.0254$), as seen on figure 1. For estrone, filtering rates were increased concentration-wise ($p=0.0075$) (Figure 2). For the concentrations we used, no statistical differences were seen in the filtering rates of *C. silvestrii* exposed to 17 α -ethynilestradiol (Figure 3).

Studies of compounds toxicology in zooplanktonic specimens often assay for filtering behavior changes (GLIWICZ; SIENIAWSKA, 1986; ALLEN *et al.*, 2010). As some algae are also classified as toxic, such as *Microcystis aeruginosa*, studies correlating both toxicity and filtering of toxic algae is also found in scientific literature (PETER; LAMPERT, 1989; DEMOTT, 1999; PÉREZ-MORALES *et al.*, 2014). Our results found disruption on feeding behavior for two of the compounds (cloprostenol and estrone)

at the concentrations assessed. For cloprostenol (Figure1), filtering rates decreased, a trend commonly seen with the addition of xenocompounds (GLIWICZ; SIENIAWSKA, 1986; ARAUJO *et al.*, 2019). The sudden physiological disruption that a new compound can induce might explain behavioral differences. As cloprostenol is a Prostaglandin F2 α analog, vital in crustacean's reproduction hormonal signaling (LEBLANC, 2007), exposure to such compound might induce changes in molting behavior and energy intake.

Interestingly, at higher concentrations of cloprostenol, filtering rates reach a *plateau* and halts its downward trend (Figure 1). Toxicology assays performed by our lab (personal communication, 2020) showed that such concentrations of cloprostenol increased filtering rates in chronically exposed *C. silvestrii* specimens, thus demonstrating that the response for the xenocompound is concentration dependent and is possibly hormonally regulated.

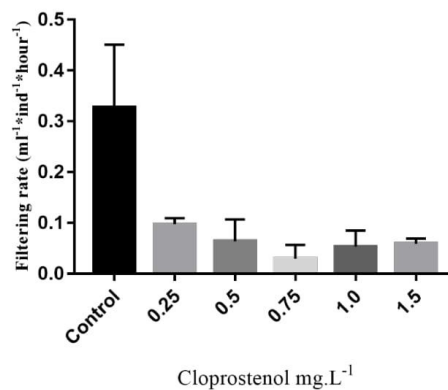


Figure 1- Filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* adult specimens exposed to different concentrations of cloprostenol (Anova one-way p=0.0254, n= 18).

Estrone has shown an increased filtering rate that was concentration-wise (Figure 2), which is not a common result for xenocompound effects on filtering rates. As estrone is a natural hormone and has shown to be uptake by zooplankton (GOMES *et*

al., 2004), its incorporation can disrupt hormonal signaling and induce sooner reproductive stages. To produce eggs and increase body size, a higher feeding rate is expected. Studies tackling the effects higher concentrations of Estrone in filtering rates

are encouraged. Chronic toxicity assays performed by our lab (personal communication, 2020) showed that neonate production increases in these

concentrations. Higher energy uptakes for sooner reproduction may explain the higher filtering rates found in this study.

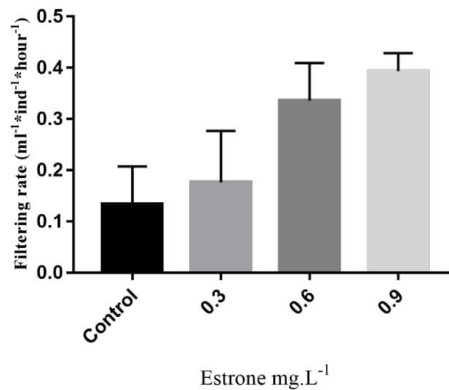


Figure 2- Filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* adult specimens exposed to different concentrations of estrone (Anova one-way $p=0.0075$, $n=12$).

Toxicity and disruptions are dependent of the concentration of the exposure. Figure 3 shows that the experimental concentrations for 17 α -ethynilestradiol did not affect filtering rates. Other compounds were shown to not affect filtering rates (KÄLLQVIST *et al.*, 2006), and a potential adaptational behavior might have occurred for the specimens tested. Demott (1999) found that, after an initial

decrease on filtering, later experiments retrieved normal filtering rates for *Daphnia magna* specimens, evidencing that regulatory and adaptational filtering behaviors can be triggered in a short time span. It can also be that 17 α -ethynilestradiol filtering disruption occurs at higher concentrations or later in time than we assessed. Further studies with higher 17 α -ethynilestradiol concentrations are needed.

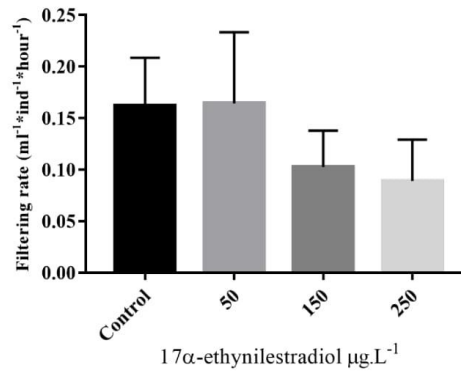


Figure 2- Filtering rates of *Ceriodaphnia silvestrii* adult specimens exposed to different concentrations of estrone (Anova one-way $p=0.0075$, $n=12$).

CONCLUSIONS

Xenocompounds can disrupt filtering behaviors of cladocerans, as seen with the endocrine disruptors of this study. Interestingly, different compounds affect filtering behavior differently. Thus, the ecosystemic impact deriving from the presence of such compounds on water bodies will depend on the mix found *in loco*. Sodium cloprostenol decreased filtering rates in all the concentrations tests, demonstrating that its presence inhibits this behavior. Estrone, on the other hand, showed a concentration-wise filtering rate increase, demonstrating that its effects are

dependent on the concentration of the exposure. For the concentrations we used on 17α-ethynilestradiol filtering tests, no statistical difference was seen. Xenobiotics, therefore, can impact ecological energy transfer and clearance rates by disrupting filtering behaviors of *C. silvestrii* specimens.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Grant code 001.

REFERENCES

- ADEEL, M. et al. Environmental impacts of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environment International**, vol. 99, p. 107-119, 2017.
- ALLEN, H.J. et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environmental**

JÚNIOR, A. P. M. & WISNIEWSKI, M. J. S.

Regnellea Scientia 7(1): 29-40, 2021

Toxicology and Chemistry, vol. 29, n.12, p.2742-2750, 2010.

Photochemical and Photobiological Sciences, vol. 17, p. 1573-1598, 2018.

ARAÚJO, G.S. et al. Toxicity of lead and mancozeb differs in two monophyletic *Daphnia* species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 178, p.230-238, 2019.

BELFROID, A. C. et al. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, vol. 225, p. 101-108, 1999.

ARCHANA, G.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Ecotoxicological risk assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). **Environmental Monitoring and Assessment**, vol. 189, n. 446, 2017.

BRODEUR, J.C. et al. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. **Aquatic Toxicology**, vol. 91, n. 2, p.161-170, 2009.

BAILEY, D. S.; NORTHCOTE, D. H. Phospholipid Composition of the Plasma Membrane of the Green Alga, *Hydrodictyon africanum*. **The Biochemical Journal**, vol. 156, n. 2, p. 295-300, 1976.

CLUBBS, R. L.; BROOKS, B. W. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 67, p. 385-398, 2007.

BANSE, K. Zooplankton: pivotal role in the control of ocean production: I. Biomass and production. **ICES Journal of marine Science**, vol. 52, n.3-4, p.265-277, 1995.

DEMOTT, W. Foraging strategies and growth inhibition in five daphnids feeding on mixtures of a toxic cyanobacterium and a green alga. **Freshwater Biology**, vol. 42, p. 263-274, 1999.

BARTELT-HUNT, S. L. et al. Effect of Growth Promotants on the Occurrence of Endogenous and Synthetic Steroid Hormones on Feedlot Soils and in Runoff from Beef Cattle Feeding Operations. **Environmental Science & Technology**, vol. 46, p. 1352-1360, 2012.

DODSON, S.; HANAZATO, T. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. **Environmental Health Perspectives**, vol. 103(suppl 4), p.7-11, 1995.

BARTOLOMEU, M. et al. Wastewater chemical contaminants: remediation by advanced oxidation processes.

EDITION, F. **Guidelines for drinking-water quality**. WHO chronicle, vol. 38, ed. 4, 541 p. 2011.

EKVALL, M. K.; URRUTIA-CORDERO, P.; HANSSON, L. Linking cascading effects of fish predation and zooplankton grazing to reduced cyanobacterial biomass and toxin levels following biomanipulation. **Plos One**, vol. 9, n. 1, 2014.

FONSECA, A. L; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 16, n. 4, p. 319-328, 2004.

GARRIC, J. et al. Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. **Environnement, Risques & Santé**, vol. 5, n. 4, 2006.

GLIBERT, P.M. Eutrophication, harmful algae and biodiversity - challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 124, n. 2, p.591-606, 2017.

GLIWICZ, M. Z.; SIENIAWSKA, A. Filtering activity of *Daphnia* in low concentrations of a pesticide. **Limnology and Oceanography**, vol. 31, n.5, p. 1132-1138, 1986.

GOMES, R. L. et al. An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 23, n. 1, p. 105-108, 2004.

HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, vol. 112, n. 1, p.1-10, 2001.

HUANG, X et al. Toxicity of herbicides in highway runoff. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 24, n. 9, p. 2336-2340, 2005.

JONES, R.; HENDERSON, E. W. The dynamics of energy transfer in marine food chains. **South African Journal of Marine Science**, vol. 5, n. 1, p. 447-465, 1987.

KÄLLQVIST, T.; GRUNG, M.; TOLLEFSEN, K.E. Chronic toxicity of 2,4,2',4' - tetrabromodiphenyl ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, vol. 25, n. 6, p.1657-1662, 2006.

LEBLANC, G. A. Crustacean endocrine toxicology: a review. **Ecotoxicology**, vol. 16, p. 61-81, 2007.

LI, Y. et al. Migration of natural estrogens around a concentrated dairy-feeding operation. **Environmental Monitoring and Assessment**, vol. 184, p. 5035-5041, 2012.

LI, Y. et al. Excretion of manure-borne estrogens and androgens and their potential risk estimation in the Yangtze River Basin. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 37, p. 110-117, 2015.

- MANSANO, A. S. et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. **Environmental Pollution**, vol. 243, p. 723-733, 2018.
- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. G. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios. **International Soil and Water Conservation Research**, vol. 1, n. 3, p. 37-48, 2013.
- MOUATASSIM-SOUALI, A. et al. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. **Journal of Separation Science**, vol. 26, p. 105-111, 2003.
- PERBICHE-NEVES, G. et al. 2013. Relations among planktonic rotifers, cyclopoid copepods, and water quality in two Brazilian reservoirs. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n. 1, p. 138-149, 2013.
- PÉREZ-MORALES, A.; SARMA, S.S.S.; NANDINI, S. Feeding and filtration rates of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed toxic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Journal of Environmental Biology**, vol. 35, n. 6, p.1013-1020, 2014.
- PETEFFI, G. P. et al. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River - Basin Rio Grande do Sul - Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 79, n. 4, p. 712-721, 2019.
- PETER, H.; LAMPERT, W. The effect of *Daphnia* body size on filtering rate inhibition in the presence of a filamentous cyanobacterium. **Limnology and Oceanography**, vol. 34, n. 6, p. 1084-1089, 1989.
- PRAT, N. et al. Effect of dumping and cleaning activities on the aquatic ecosystems of the Guadiamar River following a toxic flood. **The Science of the Total Environment**, vol. 242, p. 231-248, 1999.
- RASHEED, T. et al. Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification and treatment. **Environment International**, vol. 122, p. 52-66, 2019.
- REDDY, K. R.; XIE, T.; DASTGHEIBI, S. Removal of heavy metals from urban stormwater runoff using different filter materials. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 2, p. 282-292, 2014.
- RODGHER, S. et al. Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology**, vol. 17, n. 8, p.826-833, 2008.
- SABATER, S. et al. Effects of human-driven water stress on river ecosystems: a meta-analysis. **Scientific Reports**, vol. 8, n. 11462, 2018.

Regnella Scientia 7(1): 29-40, 2021

JÚNIOR, A. P. M. & WISNIEWSKI, M. J. S.

SLADECEK, V. Rotifers as indicators of water quality. **Hydrobiologia**, vol. 100, p. 169-201, 1983.

crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. **Ecotoxicology**, vol. 16, p. 317-325, 2007.

SMIRNOV, N. N. **Physiology of Cladocera**. 2nd edition. London: Academic Press. 2017.

VÖRÖSMARTY, C.J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, vol. 467, n. 7315, p.555-561, 2010.

SOTO, D.; MENA, G. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. **Aquaculture**, vol. 171, n. 1-2, p.65-81, 1999.

WETZEL, R.; LIKENS, G. **Limnological analyses**. 3a. ed. New York: Springer. 429 p. 2000.

SOUCEK, D. J. Bioenergetic effects of sodium sulfate on the freshwater

ZHANG, Y. et al. Inhibiting effects of vegetation on the characteristics of runoff and sediment yield on riparian slope along the lower yellow river. **Sustainability**, vol. 11, n. 3685, 2019.

9 CONCLUSÕES GERAIS

- Neste estudo conclui-se que a influência do processo de eutrofização na mortalidade de peixes foi relevante, principalmente no episódio de 2017. A diminuição do volume do reservatório, aliada ao despejo de esgoto e eutrofização provocam, juntamente com fatores climáticos, mudanças nas variáveis físicas e químicas da água que culminam em depleção do oxigênio dissolvido, abundância de organismos resistentes a um ambiente de baixa qualidade de água, e mortalidade de peixes criados em tanques-rede.

- O cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, presente nos pontos de coleta e comumente registrado em amostra do reservatório de Furnas, foram afetados quando expostos a compostos desreguladores endócrinos que estão presentes em esgoto e que podem ser lixiviados para a água, alterando sua reprodução e filtração. A exposição ao composto Cloprostenol provocou a imobilidade de 50% dos indivíduos na concentração de 0,41 mg.L⁻¹ em exposição aguda e de 0,618 mg.L⁻¹ em exposição crônica. A reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii* diminuiu a partir de 0,4 mg.L⁻¹.

- A exposição ao composto 17 α -etinilestradiol causou a mortalidade de *C. silvestrii*, com 50% dos indivíduos na concentração de 0,23 mg.L⁻¹ Em exposição aguda e de 0,89 mg.L⁻¹ em exposição crônica.

- A exposição ao composto estrona também causou a mortalidade dos espécimes de *C. silvestrii*, com 50% dos indivíduos na concentração de 0,71 mg.L⁻¹ Em exposição aguda e de 0,543 mg.L⁻¹ em exposição crônica.

- A exposição aos compostos cloprostenol, 17 α -etinilestradiol e estrona alterou a taxa de filtração de *C. silvestrii*. As exposições provocaram tanto o aumento quanto diminuição da filtração de algas *Raphidocelis subcapitata*, dependendo da concentração, o composto utilizado e do tempo de exposição.

- Pelo exposto, é possível perceber que estes compostos influenciaram, portanto, na estrutura da comunidade zooplancônica e potencialmente na composição da comunidade aquática, podendo causar alterações na abundância das algas e na oferta de alimento para as camadas tróficas superiores.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. [Constituição (1988)]. Constituição da República Federativa do Brasil, 1988. Brasília, DF: Senado Federal, 1988. 292 p. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em janeiro de 2020.
- BRASIL, Sanções Penais de condutas lesivas ao meio ambiente (1998). Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm>. Acesso em janeiro de 2020.
- _____. Histórico da legislação hídrica no Brasil. CETESB – Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/informacoes-basicas/tpos-de-agua/historico-da-legislacao-hidrica-no-brasil/>>. Acesso em fevereiro de 2020.
- ABDEL-KHALEK, A. A. Chronic Exposure to Water of Lake Qaroun Induced Metal-Related Testicular Damage and Endocrine Disruption in Male Fish. *Biological Trace Element Research*, v. 185, n. 1, p. 197-204, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Aquatic ecotoxicology – acute toxicity – test method with daphnia spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR12713), 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Aquatic ecotoxicology – chronic toxicity – test method with Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR13373). 2017.
- ADEEL, M. et al. Environmental impacts of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107-119, 2017.
- AITH, F. M. A.; ROTHBARTH, R. O estatuto jurídico das águas no Brasil. **Estudos avançados**, v. 29, n. 84, 2015.
- ALLAN, J. D. **Stream Ecology. Structure and function of running Waters**. New York: Chapman; Hall. 388 p. 1995.
- ALVES, T.; COBO, V. J. Bioindicador *Ceriodaphnia dubia* aplicado na avaliação ecotoxicológica da água da bacia hidrográfica do rio Uma. **Rev Ambient Água**, v. 8, p. 168-182, 2013.
- AMADO, F. **Direito ambiental esquematizado**. 5. ed. São Paulo: Método. 2014
- ANA. Agência Nacional de Águas (2017). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2017: relatório pleno. Disponível em: <<http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/relatorio-conjuntura-2017.pdf/view>>. Acesso em fevereiro de 2020.
- ANEEL. Agência Nacional de Energia Elétrica. Disponível em: <https://www.aneel.gov.br/sala-de-imprensa-exibicao/-asset_publisher/XGPXSqdMFHrE/content/brasil-alcanca-170-mil-megawatts-de-capacidade-instalada-em->

2019/656877?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fwww.aneel.gov.br%2Fsala-de-imprensa-exibicao%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_XGPXSqdMFHrE%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_sate%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-2%26p_p_col_count%3D3>. Acesso em Janeiro de 2020.

AQUINO, S.F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.

ARCHER, E. *et al.* The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. **Chemosphere**, v. 174, 437-446, 2017.

ASHRAF, M. A. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 24, p. 4223-4227, 2017.

BARBOSA, I. R.; NOGUEIRA, A. J. A, SOARES, A. M. V. M. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 71, n. 3, p. 757-764, 2008.

BARTELT-HUNT, S. L. *et al.* Effect of Growth Promotants on the Occurrence of Endogenous and Synthetic Steroid Hormones on Feedlot Soils and in Runoff from Beef Cattle Feeding Operations. **Environ Sci Technol**, v. 46, p. 1352-1360, 2012.

BERNARDELLI, J. K. B. *et al.* Removal of estrogens by activated sludge under different conditions using batch experiments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 421-432, 2015.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; McNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. **Aquatic Sciences**, v. 65, p. 320-341, 2003.

BORTOLUZZI, E. C. *et al.* Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1872-1876, 2007.

BRASIL, Código das Águas (1934). Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D24643.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL, Diretrizes Nacionais para o Saneamento Básico (2007). Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/111445.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS /Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Funasa, 112 p. 2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 24º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos** – 2018. Brasília: SNS/MDR, 2019. 180 p.

BRASIL, Política Nacional de Recursos Hídricos (1997). Disponível em: <
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9433.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL, Política Nacional do Meio Ambiente (1981). Disponível em: <
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L6938.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

BRASIL, Proteção da vegetação nativa (2012). Disponível em: <
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

BRENNAN, S. J. *et al.* Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 64, p. 49-55, 2006.

BROETTO, T. *et al.* Relationships between agriculture, riparian vegetation, and surface water quality in watersheds. **Rev Bras Cienc Solo**, v. 41, p. 1-13, 2017.

CAILLEAUD, K. *et al.* Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study. **Environ Sci Pollut Res**, v. 18, p. 226-236, 2011.

CASALI-PEREIRA, M. P. *et al.* Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to theneotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558-564, 2015.

CETESB (São Paulo). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. Coordenação geral Maria Helena R.B. Martins; Coordenação técnica Nelson Menegon Jr., Marta Condé Lamparelli, Fábio Netto Moreno; Coordenação cartográfica Carmen Lúcia V. Midaglia; Equipe técnica Cláudio Roberto Palombo ... [*et al.*]; Colaboradores Gisela de Assis Martini ... [*et al.*]. – São Paulo: CETESB, 2018.

CHANG, K. *et al.* Impact of improved bottom hypoxia on zooplankton community in shallow eutrophic lake. **Knowledge and Management of Aquatic ecosystems**, v. 408, n. 3, 2013.

CLARA, M. *et al.* Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 78, p. 1078-1084, 2010.

CLIMENT, M. J. *et al.* Determination of pesticides in river surface waters of central Chile using spe-gc-ms multi-residue method. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 63, n. 2, 2018.

CLUBBS, R. L.; BROOKS, B. W. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 385-398, 2007.

CONAMA 357 (2005). Disponível em: <
<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em janeiro de 2020.

CONAMA 430 (2011). Disponível em: <
<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em janeiro de 2020.

COSTA, J. G. I. **Análise ambiental do médio curso do rio Curimataú, Tacima/PB/Brasil**. 2017. 53f. Monografia. Departamento de Geografia, Universidade Estadual da Paraíba, Guarabira, 2017.

CUNHA, D. G F.; BOTTINO, F.; CALIJURI, M. C. Land use influence on eutrophication-related water variables: case study of tropical rivers with different degrees of anthropogenic interference. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 1, p. 35-45, 2010.

DENEKE, R. Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values ≤ 3 . **Hydrobiologia**, v. 433, p. 167-172, 2000.

DENT, C. L.; CUMMING, G. S.; CARPENTER, S. R. Multiple states in river and lake ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1421, p. 635-645, 2002.

DI MARZIO, W. D. *et al.* Developmental endpoints of chronic exposure to suspected endocrine-disrupting chemicals on benthic and hyporheic freshwater copepods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 86-92, 2013.

DIETRICH, M. *et al.* Degradation of endocrine disruptor bisphenol A by ultrasound-assisted electrochemical oxidation in water. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 39, p. 741-749, 2017.

EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, 1-16, 2017.

EKVALL, M. K.; URRUTIA-CORDERO, P.; HANSSON, L. Linking cascading effects of fish predation and zooplankton grazing to reduced cyanobacterial biomass and toxin levels following biomanipulation. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.

ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; PACE, M. L. The potential of the zooplankton resting-stage bank to restore communities in permanent and temporary waterbodies. **J. Plankton Res.**, v. 40, n. 4, p. 458-470, 2018.

ESPÍNDOLA, E. L. G. *et al.* Spatial heterogeneity of the Tucuruí reservor (State of Pará, Amazonia, Brazil) and the distribution of zooplanktonic species. **Rev. Brasil. Biol.**, 60, n. 2, p. 179-194, 2000.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 3. ed., 826 p., 2011.

FARASHI, A. *et al.* Plankton composition and environmental parameters in the habitat of the Iranian cave barb (*Iranocypris typhlops*) in Iran. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 37, n. 1, p. 13-21, 2014.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquat Toxicol**, v. 76, p. 122-159, 2006.

FERGUSON, E. M. *et al.* Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. **Water research**, v. 47, p. 1604-1615, 2013.

FOLMAR, L. C. *et al.* Altered Serum Sex Steroids and Vitellogenin Induction in Walleye (*Stizostedion vitreum*) Collected Near a Metropolitan Sewage Treatment Plant. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 40, p. 392-398, 2001.

- FONSECA, A. L. A **biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestrii* (Crustacea: Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em teste de toxicidade aquática com efluentes industriais**. 1991. 210f. Dissertação de Mestrado, CCB-UFSCar, São Carlos, 1991.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnol. Bras.**, v. 16, n. 4, p. 319-328, 2004.
- FONSECA, A. P.; LIMA, D. L. D.; ESTEVES, V. I. Degradation by Solar Radiation of Estrogenic Hormones Monitored by UV-Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. **Water Air Soil Pollut**, v. 215, p. 441-447, 2011.
- FREIRY, R. F. *et al.* Community structure and concordance patterns among zooplankton life stages in subtropical temporary ponds. **Aquat Ecol.**, vol 54, p. 257-270, 2020.
- FREITAS, E. C.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of forfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 162, p. 663-672, 2018.
- FURTADO, C. M.; VON MÜHLEN, C. Endocrine disruptors in water filters used in the Rio dos Sinos Basin region, Southern Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 2 (suppl.), p. S85-S90, 2015.
- GARRIC, J. *et al.* Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. **Environ Risque Sante**, v. 5, n. 4, 2006.
- GONZALEZ, E. J. Nutrient enrichment and zooplankton effects on the phytoplankton community in microcosms from El Andino reservoir (Venezuela). **Hydrobiologia**, v. 434, p. 81-96, 2000.
- GOTO, T.; HIROMI, J. Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p. 139-142, 2003.
- GOŹDZIEJEWSKA, A.; TUCHOLSKI, S. Zooplankton of fish culture ponds periodically fed with treated wastewater. **Polish J. of Environ. Stud**, v. 20, n. 1, p. 67-79, 2011.
- GRZESIUKA, M.; BEDNARSKA, A.; MIELECKI, D.; GARBICZ, D.; MARCINKOWSKI, M.; PILŹYSB, T.; MALINOWSKA, A.; ŚWIDERSKA, B.; GRZESIUK, E. Anticancer agents found in environment affect *Daphnia* at population, individual and molecular levels. *Aquatic Toxicology*, v. 215, n. 105288, 2019.
- HAEBA, M. H. *et al.* Selected endocrine disrupting compounds (vinclozolin, flutamide, ketoconazole and dicofol): effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *daphnia magna*. **Env Sci Pollut Res**, vol 15, n. 3, p. 222-227, 2008.
- HOLT, M. S. Sources of Chemical Contaminants and Routes into the Freshwater Environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p.21-27, 2000.

HUANG, X *et al.* Toxicity of herbicides in highway runoff. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2336–2340, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008**. Departamento de População e Indicadores Sociais. Rio de Janeiro. 219 p. 2008.

ISMAIL, A. H.; ADNAN, A. A. M. Zooplankton composition and abundance as indicators of eutrophication in two small man-made lakes. **Tropical Life Sciences Research**, v. 27(Supp.1), p. 31-38, 2016.

JACONETTI, P. C. M. **Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2005.187f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

JAKIEVICIUS, M. São Paulo (Estado) Secretaria do Meio Ambiente / Coordenadoria de Educação Ambiental. **Matas Ciliares e o Meio Ambiente Rural: uma proposta de trabalho para educadores**. São Paulo: SMA/CEA, 2011. 152p.

Jl, Z. **Hydrodynamics and Water Quality Modeling Rivers, Lakes, and Estuaries**. United States: Wiley, 2007. 702 p.

JONES, R.; HENDERSON, E. W. The dynamics of energy transfer in marine food chains. **South African Journal of Marine Science**, v. 5, n. 1, p. 447-465, 1987.

KANG, Y. *et al.* *Daphnia magna* may serve as a powerful tool in screening endocrine disruption chemicals (EDCs). **Environ Sci Technol**, v. 48, p. 881-882, 2014.

KATO, Y. *et al.* Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *daphnia magna*: deep conservation of a doublesex gene in the sex-determining pathway. **PLoS Genet**, v. 7, n. 3, 2011.

KHATRI, N.; TYAGI, S. Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. **Front Life Sci**, v. 8, n. 1, p. 23-39, 2015.

KOLPIN, D. W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

KOUMAKI, E.; MAMAIS, D.; NOUTSOPOULOS, C.; NIKA, M.; BLETSOU, A. A.; THOMAIDIS, N. S.; EFTAXIAS, A.; STRATOIANNI, G. Degradation of emerging contaminants from water under natural sunlight: The effect of season, pH, humic acids and nitrate and identification of photodegradation by-products. **Chemosphere**, v. 138, p. 675-681, 2015.

LAGO, C. S. **Influência da pecuária e sua implicação na sustentabilidade da mata ciliar do rio zutiua, maranhão, Brasil**. 2012. 66f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2012.

LAMEIRA, V. **Estudos dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera)**

Crustacea). Dissertação de Mestrado. 2005, 225f. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LAYRARGUES, P. P. Para onde vai a educação ambiental? o cenário político-ideológico da educação ambiental brasileira e os desafios de uma agenda política crítica contra-hegemônica. **Revista Contemporânea de Educação**, v. 7, n. 14, p. 388-411, 2012.

LEVY, C. Outro alerta sobre a água que bebemos. **Jornal da Unicamp**. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/dezembro2006/ju346pag03.html>. Acesso em janeiro 2020.

LI, Y. *et al.* Migration of natural estrogens around a concentrated dairy-feeding operation. **Environ Monit Assess**, v. 184, p. 5035-5041, 2012.

LI, Y. *et al.* Excretion of manure-borne estrogens and androgens and their potential risk estimation in the Yangtze River Basin. **Journal of environmental sciences**, v. 37, p. 110-117, 2015.

LIMA Jr., P. A. Reflorestamento da mata ciliar do entorno do açude São José II na cidade de Piquet Carneiro-CE. Monografia. Fortaleza: **Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Ceará**. 2018.

LITERATHY, P. Cap. 2: Industrial wastes and water pollution. In: RIJTEMA, P. E.; ELIAS, V. (eds.), **Regional Approaches to Water Pollution in the Environment**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1996.

LOUREIRO, B. R.; BRANCO, C. W. C.; ZANIBONI FILHO, E. Influence of net-cage fish farming on zooplankton biomass in the Itá reservoir, SC, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 4, p. 357-367, 2011.

LOVELL, S. T.; SULLIVAN, W. C. Environmental benefits of conservation buffers in the United States: evidence, promise, and open questions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 112, p. 249-260, 2006.

MAAVARA, T. *et al.* Global phosphorus retention by river damming. **PNAS**, v. 112, n. 51, p. 15603–15608, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANSANO, A. S. **Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico**. 2016. 28f. Tese de doutorado. Centro de ciências biológicas e da saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MANSANO, A. S. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 312-321, 2017.

MANSANO, A. S. *et al.* Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 723-733, 2018.

- MARTINS, F. L. **Remoção de 17alfa-etinilestradiol por meio de fotocatalise em reator de leito fluidizado**. Dissertação de Mestrado. 2017. 91f. Escola de engenharia civil e ambiental, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- MATSUMURA-TUNDISI, T. *et al.* Eutrofização da represa de Barra Bonita: estrutura e organização da comunidade de Rotifera. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 923-935, 1990.
- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. G. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 1, n. 3, p. 37-48, 2013.
- MILLER, T. H. *et al.* Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in afreshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. **Environmental Internacional**, v. 129, p. 595-606, 2019.
- MÖLLMANN, C. *et al.* Climate, zooplankton, and pelagic fish growth in the central Baltic Sea. **Journal of Marine Science**, v. 62, p. 1270-1280, 2005.
- MONTAGNER, C. C. *et al.* Caffeine as na indicator of estrogenic activity in source water. **Environ. Sci. Processes Impacts**, v. 16, n. 1866, 2014.
- MOORE, M. T. *et al.* Assessing caffeine as na emerging environmental concern using conventional approaches. **Arch. Environ Contam Toxicol**, v. 54, p. 31-35, 2008.
- MOREIRA, R. A. *et al.* A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2014.
- MORITA, D. M. Prevenção e controle da poluição da água e do solo causada por resíduos industriais perigosos. 2010. 557f. Tese de Livre-docência. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- MUGRABE, G. *et al.* Hatching rates of resting eggs of ‘Cladocera’ (Crustacea; Branchiopoda) at a tropical bay, **Brazil. Braz. J. Biol.**, v. 67, n. 3, p. 527-530, 2007.
- NAVIS, S. *et al.* Pesticide exposure impacts not only hatching of dormant eggs, but also hatchling survival and performance in the water flea *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 803-814, 2013.
- NICHOLS, D. J. *et al.* Runoff of Estrogen Hormone 17 β Estradiol from Poultry Litter Applied to Pasture. **J. Environ. Qual.**, v. 26, p. 1002-1006, 1997.
- NILSSON, C. *et al.* Fragmentation and flow regulation of the world’s large river systems. **Science**, v. 308, p. 405-408, 2005.
- OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 279f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, L. L. D. *et al.* Acute and chronic effects of three pharmaceutical drugs on the tropical freshwater cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water Air Soil Pollut**, v. 229, n. 116, 2018.

OLIVEIRA, V. M. B. **O papel da educação ambiental na gestão dos recursos hídricos: caso da bacia do Lago descoberto/DF**. 2008. 141f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Humanas, Universidade de Brasília, Brasília. 2008.

ONU. **Resolução A/RES/64/292**. 2010. Disponível em: <<https://undocs.org/A/RES/64/292>>. Acesso em Janeiro de 2020.

PAES, T. A. S. V. *et al.* Can microcystins affect zooplankton structure community in tropical eutrophic reservoirs?. **Braz. J. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 450-460, 2016.

PAL, A.; HE, Y.; JEKEL, M.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. Emergent contaminants of public health significance as water quality indicators compounds in the urban water cycle. **Environment International**, v. 71, p. 46-62, 2014.

PANARELLI, E. A.; CASANOVA, S. M. C.; HENRY, R. The role of resting eggs in the recovery of zooplankton community in a marginal lake of the Paranapanema River (São Paulo, Brazil), after a long drought period. **Acta Limnol. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 73-88, 2008.

PEDROZO, C. S.; ROCHA, O. Zooplankton and water quality of lakes of the northern coast of Rio Grande do Sul state, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 17, n. 4, p. 445-464, 2005.

PINHEIRO, M. H. O. *et al.* Consequences of suppressing natural vegetation in drainage areas for freshwater ecosystem conservation: considerations on the new “Brazilian forest code”. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2015.

POLLARD, A. I. *et al.* Effects of turbidity and biotic factors on the rotifer community in an Ohio reservoir. **Hydrobiologia**, v. 387/388, p. 215-223, 1998.

POMPÊO *et al.* (Orgs.) Ecologia de reservatórios e interfaces, **São Paulo**: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Capítulo 22, p. 340-353, 2015.

PRAT, N.; TOJA, J.; Solà, C.; BURGOS, M.D.; PLANS, M.; RIERADEVALL, M. Effect of dumping and cleaning activities on the aquatic ecosystems of the Guadiamar River following a toxic flood. **The Science of the Total Environment**, v. 242, p. 231-248, 1999.

QI, W. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in effluents from wastewater treatment plants and receiving streams in Tianjin, China. **Environ Monit Assess**, v. 177, p. 467-480, 2011.

RADZIKOWSKI, J. Resistance of dormant stages of planktonic invertebrates to adverse environmental conditions. **J. Plankton Res.**, v. 35, n. 4, p. 707-723, 2013.

REIS FILHO, R. W. **Hormônios estrógenos no rio do Monjolinho, São Carlos - SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais**. 2008. 162f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

REN, L. *et al.* Community structure of zooplankton and water quality assessment of Jialing River in Nan Chong. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, p. 1321-1326, 2011.

RICHMOND, E. K. *et al.* A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. **Nature communications**, v. 9, n. 4491, 2018.

RIETZLER, A. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Life cycle, feeding and adaptive strategy implications on the co-occurrence of *Argyrodiaptomus furcatus* and *Notodiaptomus iheringi* in Lobo-Broa reservoir (SP, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 93-105, 2002.

SÁ JR, W. P. Production of planktonic biomass for feed of alevins at Furnas hydrobiology and hatchery station. In: PINTO-COELHO, R. M., GIANI, A., VON SPERLING, E. (Eds), **Ecology and Human Impact on Lakes and Reservoirs in Minas Gerais with Special Reference to Future Development and Management Strategies**. Belo Horizonte: Seprac. 1994.

SABATER, S; BREGOLI, F.; ACUÑA, V; BARCELÓ, D.; ELOSEGI, A.; GINEBRED, A.; MARCÉ, R.; MUÑOZ, I.; SABATER-LIESA, L.; FERREIRA, V. Effects of human-driven water stress on river ecosystems: a meta-analysis. **Sci Rep**, v. 8, n. 11462, 2018.

SANTOS, R. M. **Estrutura das comunidades fito e zooplancônicas do reservatório Guarapiranga (São Paulo) e relações com a hidrodinâmica e a eutrofização**. 2014. 254f. Tese de doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

SCHERINGER, M. *et al.* How many persistent organic pollutants should we expect?. **Atmospheric Pollution Research**, v. 3, p. 383-391, 2012.

SMIRNOV, N. N. *Physiology of Cladocera*. 2nd edition. **London**: Academic Press. 2017.

SONG, W. T. *et al.* Study on environmental estrogen pollution in Yangtze river (Nanjing section) by an in vivo bioassay. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 84, p. 406-412, 2010.

SUHETT, A. L. *et al.* An overview of the contribution of studies with cladocerans to environmental stress research. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 27, n. 2, p. 145-159, 2015.

SUYAMUD, B. *et al.* *Dracaena sanderiana* endophytic bacteria interactions: Effect of endophyte inoculation on bisphenol A removal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 318-326, 2018.

SZÉKÁCS, A.; MÖRT, M.; DARVAS, B. Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: surveys in 1990–2015. **Journal of Chemistry**, v. 2015, n. 717948, p. 1-15, 2015.

TANG, X. *et al.* Chemical and bioassay analysis of estrogen pollution in the surface water of the tiaoxi river, the source river for taihu lake. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 89, p. 816-819, 2012.

TUNDISI, J. G. Capítulo 1 - Reservatórios como sistemas complexos: teoria, aplicação e perspectivas para usos múltiplos. In: HENRY, R. (Ed). **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu: FAPESP/FUNDIBIO. p. 19-38., 1999.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. E. M. Environmental Impact Assessment of reservoir construction: new perspectives for restoration economy, and development: the Belo Monte Power Plant case study. **Braz. J. Biol.**, v. 75, no. 3 (suppl.), p. 10-15, 2015.

VACCHI, F. I. **Eco/genotoxicidade do corante comercial CI Disperse Red 1 e seus subprodutos clorados**. 2012. 71f. Dissertação de mestrado. Faculdade de tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2012.

VALIELA, I.; BOWEN, J. L. Nitrogen sources to watersheds and estuaries: role of land cover mosaics and losses within watersheds. **Environ Polut**, v. 118, p. 239-248, 2002.

VERSTEEG, D. J. *et al.* Ceriodaphnia and Daphnia: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, n. 4, p. 869-892, 1997.

WARD, P.; SHREEVE, R. S. Egg production in three species of Antarctic Calanoid Copepods during an austral summer. **Deep Sea Research I**, v. 42, n. 5, p. 721-735, 1995.

WETZEL, R.; LIKENS, G. Limnological analyses. 3. ed. **New York**: Springer. 429 p. 2000.

WILLIS, G. H. Pesticides in agricultural runoff and their effects on downstream water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol 1, 267-219, 1982.

WOODWARD, G (Ed.). Advances in Ecological Research. **London**: Academic Press. 2011. 386 p.

WU, H. *et al.* Effects of dam construction on biodiversity: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 221, p. 480-489, 2019.

YEVDOKIMOV, N. A.; YERMOKHIN, M. V. Zooplankton crustaceans of ephemeral waterbodies on the territory of various natural zones in saratov oblast. **Inland Water Biology**, v. 2, n. 1, p. 59-66, 2009.

YOULTON, C. *et al.* Changes in erosion and runoff due to replacement of pasture land with sugarcane crops. **Sustainability**, v. 8, n. 685, p. 1-12, 2016.

ZHANG, G. *et al.* Bisphenol A removal by submerged macrophytes and the contribution of epiphytic microorganisms to the removal process. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 98, p. 770-775, 2017.

ZHANG, S. *et al.* Effects of sediment dredging on water quality and zooplankton community structure in a shallow of eutrophic lake. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 2, p. 218-224, 2010.