

Universidade Estadual Paulista —“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Anderson Ricardo Carlos

**Efeitos da eutrofização e da composição de espécies de macrófitas sob a
emissão de gases de efeito estufa em lagos rasos**

Nimega

2016

Anderson Ricardo Carlos

Efeitos da eutrofização e da composição de espécies de macrófitas sob a emissão de gases de efeito estufa em lagos rasos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sarian Kosten

Nimega

2016

Anderson Ricardo Carlos

**Efeitos da eutrofização e da composição de espécies de macrófitas sob a
emissão de gases de efeito estufa em lagos rasos**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas**

Aprovado em __/__/__

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Sarian Kosten

Prof^a Dr^a. Elza Maria Guimarães Santos

Prof. Dr. Marcos Gomes Nogueira

Nimega

2016

Dedicatória

Aos meus pais, Alvina e João, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.

Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer o apoio financeiro que o governo brasileiro me deu para estudar na Holanda e desenvolver um bom projeto de pesquisa através do Programa Ciência Sem Fronteiras.

Meu agradecimento vai para o doutorando Ernandes Sobreira por seu valioso apoio e muitos bons conselhos, especialmente no momento de trabalhar com os dados. Eu devo mencionar o doutorando Ralf Aben; os estudantes de mestrado Tamara van Bergen, Renata Montalvão, Astri Wana e Julio Stelzer; a coordenadora de estudantes internacionais Conny Mooren; a professora doutora Elza Maria Guimarães Santos da UNESP: todos eles foram importantes de diferentes formas para possibilitar o desenvolvimento desse estágio.

Eu gostaria especialmente de agradecer a professora doutora Sarian Kosten pela sua agradável cooperação nesse trabalho: por aceitar me supervisionar e encarar todas as burocracias brasileiras nas documentações; por me ensinar as medições pessoalmente com grande paciência; por marcar reuniões sempre que eu precisava; e por responder prontamente todos os meus incansáveis e-mails com dúvidas e problemas.

Resumo

CARLOS, A. R. **Efeitos da eutrofização e da composição de espécies de macrófitas sob a emissão de gases de efeito estufa em lagos rasos**. 2016. p.53. Monografia – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

Recentes pesquisas indicaram que a eutrofização pode concomitantemente levar a altas emissões de gases de efeito estufa (GEE), por sua vez, promovendo mudança climática. Eutrofização tende a aumentar fixação de gás carbônico (CO₂) em sistemas de água doce, o que pode parecer positivo para uma perspectiva em relação ao aquecimento global. Contudo, eutrofização também promove um aumento absoluto da produção e respiração, maior lançamento de óxido nitroso (N₂O) e metano (CH₄). Além disso, o entendimento sobre o caminho do fluxo de gases de efeito estufa e a influência de macrófitas no processo permanece ainda incerto. Portanto, esse estudo pretende esclarecer os efeitos da eutrofização e das espécies de macrófitas nas emissões de GEE especialmente em lagos rasos – historicamente ignorados das estimativas de orçamento de GEE. Esta pesquisa também almeja expandir o entendimento das emissões de CO₂, CH₄ e N₂O (difusão e ebulição), avaliando a produção de GEE em sedimentos e o consumo de metano por oxidação, e a relação deles com o perfil de oxigênio na água. Com intuito de avaliar esses fatores, 9 lagos artificiais foram estudados ao longo de oito meses de medições onde três níveis de eutrofização (alta, intermediária e baixa carga de nutrientes) foram criados através da adição de P e N e cada lago foi dividido em quatro partes, cada qual contendo uma das diferentes espécies: ou uma planta flutuante (*Azolla filiculoides*) ou uma das três espécies de plantas submersas (*Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* ou *Myriophyllum spicatum*).

Essa pesquisa concluiu que o efeito do nível de nutrientes têm relativamente mais importância nas emissões de gases de efeito estufa que a composição de espécies de macrófitas em lagos rasos, se comportando como um bom sequestrador de GEE (sequestro de CO₂, especialmente por *Azolla*, mas também sequestro de N₂O no tratamento com carga baixa de nutrientes) ou se comportar como uma alta fonte de emissões (emissões de metano e óxido nitroso no nível de nutriente alto foi, respectivamente, com uma média de 32,51 mg/m²/dia e 307,81 mg/m²/dia e para o nível de nutriente intermediário foi 24,68 mg/m²/dia e 101,95 mg/m²/dia).

Significantes resultados foram obtidos para o metano: sua oxidação apresentou altas taxas (média = 29,36 $\mu\text{mol/h/g}$ peso seco de planta) e a ebulição de metano foi claramente menos relevante que a difusão para as emissões totais, sendo que os valores para ebulição foram proporcionais com a carga de nutriente.

Além disso, as emissões de óxido nitroso foram fortemente dependentes do gradiente de N e o gás apresentou emissões e sequestros que dominaram em importância em relação aos outros gases no ponto de vista do aquecimento global, fato que clama por mais atenção para o estudo do N_2O , principalmente considerando seu Potencial de Aquecimento Global (GWP).

Palavras-chave: eutrofização, gases de efeito estufa, lagos rasos, macrófitas

Abstract

CARLOS, A. R. **Effects of eutrophication and macrophytes species composition on greenhouse gas emission from shallow lakes.** 2016. p.53. Monografia – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

Recent research indicates that eutrophication can concomitantly lead to higher greenhouse gas (GHG) emissions, in turn promoting climate change. Eutrophication tends to increase carbon dioxide (CO₂) fixation in fresh water systems which might seem positive for global warming perspective. Nevertheless, eutrophication also promotes to increased absolute production and respiration, greater release of more nitrous oxide (N₂O) and methane (CH₄). Furthermore, the understanding about GHG flux pathways and the influence of macrophytes in the process still remain unclear. Therefore, this study intends to clarify the effects of eutrophication and macrophyte species on GHG specially from shallow lakes - historically ignored from GHG budgets estimates. This research also craves to expand the understanding of the CO₂, CH₄ and N₂O emissions (diffusion and ebullition), evaluating the GHG production in sediments and the consume of methane by oxidation, and their relation to the oxygen profile in the water. In order to evaluate these factors, 9 artificial ponds were studied over eight months of measurements where 3 levels of eutrophication were created through P and N addition (high, intermediate and low nutrient loadings) and each pond was divided in quarters, which contained one of the different species in each one: floating plant (*Azolla filiculoides*) or three submerged plants (*Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* and *Myriophyllum spicatum*).

This research concluded the nutrient level effects have relatively more importance in the GHG emissions than the macrophytes species composition in shallow lakes, behaving as a GHG sink (a CO₂ sink, specially in *Azolla*, but also N₂O sink in the low nutrient loading) or a significantly high source of emissions (CH₄ and N₂O emission in the high nutrient level were, respectively, an average of 32,51 mg/m²/day and 307,81 mg/m²/day and for intermediate nutrient level were 24,68 mg/m²/day and 101,95 mg/m²/day). Meaningful results were

obtained for the methane: its oxidation presented high rates (average = 29,36 $\mu\text{mol/h/g}$ dry weight) and the ebullition was clearly less relevant than the diffusion for total emissions, whose values were proportional with nutrient loadings. Furthermore, N_2O emissions and sinks were strongly dependent on the N gradient and it presented emissions or sinks that overruled the importance of the other gases for a global warming perspective, regarding its Global Warming Potencial (GWP), and claims for more future research.

Keywords: eutrophication, GHG emissions, shallow lake, macrophytes

Sumário

Banca Examinadora.....	3
Dedicatória.....	4
Agradecimentos.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	8
Sumário.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1. Descrição dos mesocosmos.....	16
2.2. Simulação da eutrofização.....	17
2.3. Descrição das plantas.....	17
2.4. Ebulição de metano.....	19
2.4.1. Armadilha para bolhas.....	19
2.4.2. Medição e cálculos.....	20
2.5. Difusão.....	21
2.5.1. Montagem do experimento.....	21
2.5.2. Cálculos.....	22
2.6. Emissão dos sedimentos.....	22
2.6.1. Coleta e incubação.....	22
2.6.2. Medições.....	23
2.6.3. Cálculos.....	24
2.7. Perfil de oxigênio.....	24
2.8. Oxidação de metano.....	25
2.8.1. Coleta e incubação.....	25

2.8.2.	Medições.....	26
2.8.3.	Cálculo das taxas de oxidação de metano.....	26
2.8.4.	Oxidação de metano por planta	27
2.9.	Estatística	28
3.	RESULTADOS	29
3.1.	Cobertura de macrófitas e temperatura para as medições	29
3.2.	Teste de Kolmogorov-Smirnov	31
3.3.	Perfil de oxigênio	32
3.4.	Fluxo de CO ₂ : difusão água-atmosfera e produção em sedimentos óxicos ...	33
3.5.	Fluxo de CH ₄ : difusão água-atmosfera, produção em sedimentos óxicos, ebulição e oxidação	36
3.6.	Fluxos de N ₂ O: difusão água-atmosfera e produção em sedimentos.....	39
3.7.	Condições óxicas e anóxicas para a produção dos GEE nos sedimentos	40
4.	DISCUSSÃO	42
5.	CONCLUSÃO	49
6.	REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Ecossistemas aquáticos em todo o globo estão sofrendo de potencialização da carga de nitrogênio (N) e fósforo (P) causando a eutrofização. Este processo leva a perigosas proliferações de fitoplâncton, domínio de plantas flutuantes, hipóxia e perda de biodiversidade em função, por exemplo, da completa perda de vegetação submersa (SCHEFFER *et al.* 2003; SMITH *et al.* 1999; STERNER *et al.* 2002). Acima de tudo, mudança climática tende a intensificar os sintomas da eutrofização em sistemas de água doce (JEPPESEN *et al.* 2010) e talvez a eutrofização pode concomitantemente levar a altas emissões de gases de efeito estufa (GEE), por sua vez promovendo mudança climática (MOSS *et al.* 2011). Efeitos interativos entre eutrofização e mudança climática têm principalmente sido achados em lagos rasos, que majoritariamente estão na forma de lagos bem pequenos, cuja dificuldade de mapeá-los – eles não podem ser detectados em mapas ou imagens de satélite tradicional – causaram sua exclusão das estimativas do orçamento dos gases de efeito estufa (GEE), o principal alvo da mudança climática. No entanto, altas emissões de GEE para a atmosfera de lagos bem pequenos (considerados tendo menos que 0,001 km² na área de superfície) tem sido recentemente achados, principalmente por gás carbônico (CO₂), criado no sedimento por decomposição de matéria orgânica, e por metano (CH₄), produzido por metanogênese e favorecido por condições anóxicas, correspondendo a 30-80 % da mineralização anaeróbica de C em águas e sedimentos [BE'DARD and KNOWLES, 1991; FALLON *et al.*, 1980; KUIVILA *et al.*, 1988; RUDD *et al.* 1978]. As altas emissões de GHG nesse caso pode ser provavelmente explicados, por exemplo, pela ocorrência de águas rasas, alto sedimento e frequente mistura. Esses atributos aumentam a supersaturação desses gases na água e destacam lagos bem pequenos como um importante fluxo de carbono de águas continentais (HOLGERSON *et al.* 2016).

Diferente dessa provável característica de lagos bem pequenos de emitir mais CO₂, águas eutróficas podem levar a uma dependência proporcionalmente menor da matéria orgânica importada e maior fixação autotrófica - e portanto sequestro – de gás carbônico pela proliferação de algas. Inicialmente, essa possível consequência sobre maior fixação de CO₂ em águas eutróficas pode parecer positiva para a perspectiva do aquecimento global. Entretanto, eutrofização também promove um

aumento absoluto da produção e respiração, maior lançamento de óxido nitroso (N_2O) da desnitrificação (HUTTUNEN *et al.* 2003) e metano de águas e sedimentos anóxicos (BASTIVKEN *et al.* 2008, 2011). Além disso, ambos gases citados são, respectivamente, 289 vezes e 72 vezes mais potentes que o dióxido de carbono, considerando seu GWP (Potencial de Aquecimento Global – do inglês *Global Warming Potential*) para 20 anos (IPCC, 2007). Portanto, o provável aumento da produção de N_2O e CH_4 no caso são argumentos que suportam que eutrofização poderia promover mudança climática, aumentando a temperatura global (MOSS *et al.* 2011).

Ademais, algumas pesquisas já tem mostrado variáveis efeitos da adição de N e P na poderosa dinâmica os gases - N_2O and CH_4 – em ecossistemas aquáticos. Embora o óxido nitroso tenda a aumentar com carga de N (STOW *et al.* 2005; CLOUGH *et al.* 2011; BEAULIEU *et al.* 2010; BAULCH *et al.* 2012; BAULCH *et al.* 2011), essa tendência é frequentemente fraca ou inexistente, particularmente em sistemas com restrita gradientes de N. Dessa forma, em geral, nós podemos declarar que nosso entendimento dos fluxos de óxido nitroso em sistemas de água doce permanece fragmentado (SOUED *et al.* 2016).

Por outro lado, para o lançamento de metano atmosférico de sedimentos orgânicos ricos de água doce, os caminhos identificados incluem direta difusão e lançamento ebulitivo (CHANTON *et al.* 1989; SEBACHER *et al.* 1983; SMITH *et al.* 1992) e transporte através da lacuna de gás de macrófitas vasculares emergentes (DACEY *et al.* 1979; CHANTON *et al.* 1993; SORRELL *et al.* 1994). Ademais, o único sequestro biológico conhecido para o metano é sua oxidação para gás carbônico por organismos oxidantes aeróbicos e anaeróbicos (metanotrofos), alterando a proporção de gás lançada para a atmosfera (STEIN *et al.* 2012). O metano é um componente orgânico mais altamente reduzido que significa que a energia pode ser ganhada por oxidação de metano facilitado pela presença de oxigênio (BASTIVKEN, 2009). Sobre a relação com esses *inputs* de nutriente, pequenas adições de N tendem a estimular a oxidação de metano, enquanto altas adições são inibitórias. Para a adição de P, a oxidação de metano tem uma correlação positiva, embora ela também correlacione com muitas outras variáveis, como a vegetação, embora pouco se sabe sobre seus efeitos (VERAART *et al.* 2015).

Portanto, uma das variáveis, que influencia o orçamento dos GEE e, por sua vez, sua relação com a eutrofização, seria a composição da vegetação aquática. Macrófitas interpretam um papel chave para a biodiversidade e transparência da água em lagos rasos temperados, especialmente plantas submersas (SCHEFFER *et al.* 1993; JEPPESEN *et al.* 1998) e podem estar associadas a bactérias oxidantes entre o sedimento e suas raízes (GERARD *et al.* 1993; Lombardi *et al.* 1997). Contudo, uma proliferação de fitoplâncton tende a suprimir plantas submersas, mas em águas eutróficas essas macrófitas são frequentemente substituídas por plantas flutuantes (FEUCHTMAYR *et al.* 2009). Um dos exemplos dessas plantas, que será discutido nesse estudo é *Azolla filiculoides*, uma planta flutuante associada a cianobactéria simbiótica N-fixadora (*Anabaena azollae*) dentro da cavidade de suas folhas. Ela têm sido cultivada por muitos séculos em plantações de arroz na Ásia como “fertilizante verde” para melhorar a disponibilidade de N no arroz (WATANABE *et al.* 1992; WAGNER, 1997). O acúmulo potencial de N nessa espécie de planta flutuante depende de alguns fatores como a disponibilidade de P e a assimilação de C e deveria ser aumentada pela elevada [CO₂] (CHENG *et al.* 2010). Considerando agora as plantas submersas na Europa, que foram escolhidas para essa pesquisa, nós mencionamos *Elodea canadensis*, a espécie aquática invasora mais comum da Europa (HUSSBER, 2012), uma forte competidora e comum em águas eutróficas (NICHOLS *et al.* 1986). *Elodea* são espécies que tem uma abrangente variação do conteúdo de fósforo em sua biomassa (GARBEY *et al.* 2004) e elas são capazes de estocar esse nutriente em suas raízes (EUGELINK, 1998) para ser usado para o crescimento quando os níveis de fósforo na água estão baixos. Essa planta submersa é também capaz de capturar fósforo do sedimento por suas raízes, reduzindo a concentração de fósforo na coluna de água, o que, na maioria dos casos, não é capaz de reduzir seu crescimento (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016). *Myriophyllum spicatum*, também é uma espécie invasora e natural da Eurásia e sua abundância foi positivamente associada com status de nutrientes (MADSON, 1998). Isso pode gerar alguns impactos, como a redução nos níveis de oxigênio com a água devido ao decaimento de grandes quantidades de biomassa da planta. E finalmente, *Ceratophyllum demersum*, a espécie mais abundante da Europa de dez espécies do gênero *Ceratophyllum* e encontradas especialmente em rios e lagos, promovendo produção de uma grande quantidade de biomassa (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016).

Portanto, esse estudo pretende desvendar os efeitos da eutrofização e da composição de espécies de macrófitas nas emissões de gases de efeito estufa especialmente em lagos rasos. Ele também almeja expandir o entendimento das emissões de CO₂, CH₄ e N₂O (difusão e ebulição) avaliando seus caminhos, levando em conta sua produção nos sedimentos e o consumo de metano por oxidação, e a relação deles com o perfil de oxigênio na água. Portanto, a eutrofização aumenta o sequestro de gás carbônico – especialmente em altos níveis de eutrofização devido a maior produção primária – e também as emissões de metano e de óxido nitroso em lagos rasos? Há significativa diferença nas emissões de GEE e seu caminho de fluxo para uma planta flutuante – considerando *Azolla* uma grande sequestradora de carbono – comparada com as plantas submersas – que criam mais condições óxicas na água e, portanto, diminuiriam as emissões de metano? Há alguma espécie com significativa diferença na emissão de GEE para certo nível de eutrofização? As emissões de gases de efeito estufa em lagos rasos, inicialmente ignoradas nas estimativas, são relevantes para a perspectiva do aquecimento global?

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição dos mesocosmos

Um conjunto de nove mesocosmos (185 cm Ø, 90 cm de profundidade, mostrado na figura 1) foram colocados no chão na parte externa da estufa no complexo da Universidade de Radboud (Nimega, Holanda). Todos mesocosmos foram preenchidos com 20 cm (135 L) de turfa (originado do Ilperveld, 52°27' N, 4°56' E; n=9), depois do qual eles receberam uma camada de 50 cm de água da torneira. Em todos mesocosmos, placas de fibra de carbono transparente foram usadas para criar quatro quartos completamente isolados. Portanto, em cada quarto foi inserido um tipo de planta, somando um total de 36 unidades experimentais (4 plantas em 3 tipos de tratamento com 3 réplicas de cada um, que será demonstrado abaixo).



Figura 1: Visão geral dos mesocosmos

2.2. Simulação da eutrofização

Os três tratamentos foram criados, simulando três níveis de eutrofização: nível de nutriente alto (H-tratamento), nível de nutriente intermediário (I-tratamento) e nível de nutriente baixo (L-tratamento), tendo cada tratamento três réplicas (total de 9 lagos). A solução estoque foi preparada contendo NH_4NO_3 e Na_2HPO_4 e seguido a proporção próxima a N:P=16 (KLAUSMEIER, 2004). Dessa maneira, foi adicionado $1\text{mg/m}^2/\text{dia}$ de P e $20\text{mg/m}^2/\text{dia}$ de N no nível baixo de nutrientes; $50\text{mg/m}^2/\text{dia}$ de P e $1\text{g/m}^2/\text{dia}$ de N no tratamento intermediário; e $200\text{mg/m}^2/\text{dia}$ de P e $4\text{g/m}^2/\text{dia}$ no nível de tratamento alto. Essa simulação de eutrofização durou de setembro de 2015 até maio de 2016.

2.3. Descrição das plantas

Como foi mencionado na introdução, três espécies de macrófitas submersas foram usadas: *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* e *Myriophyllum spicatum*; uma espécie de macrófita flutuante foi usada: *Azolla filiculoides* (Figura 2).

Azolla filiculoides: variação de 1 a 2.5 cm de comprimento (WAGNER, 1997). Ela tem muitas folhas pequenas e sobrepostas. Essa planta cresce muito rápido e pode ser muito abundante, formando grandes biomassas cobrindo a superfície completamente. As raízes são finas e seu comprimento é por volta de 5 cm. A extensão nativa desse planta inclui zonas com temperaturas quentes, subtropicais no noroeste da América. Contudo, *Azolla* foi dispersa por todo o mundo e atualmente é encontrado na África do Sul, Ásia, Austrália, toda a extensão da Europa e das Américas (HUSSNER, 2010).

Ceratophyllum demersum: é uma macrófita submersa perene que normalmente cresce com a base em sua haste enterrada no substrato lodoso e arenoso. Ela não forma raízes. Pode formar uma densa subsuperficial dossel e atinge a altura de 5 a 6m e frequentemente cresce como uma comunidade mono-específica (alturas de 10m têm sido noticiados em Maraetai, Nova Zelândia). *C. demersum* pode formar

folhas modificadas que crescem próximas do fundo de lagos, que usa para ancorar aos sedimentos (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016).

Elodea canadensis: é uma planta submersa, densamente espessa e perene aquática. Essa erva aquática tem haste que se estende entre 20 e 30 cm em comprimento, que se tende a formar suporte monoespecífico que pode cobrir centenas de acres. As juntas de caules são frágeis. As frágeis são lineares e são em grupos de três. As folhas são numerosas, sobrepostas, verde escuras, translúcidas e minuciosamente dentadas, com 1 cm de comprimento e 2-3 mm de largura. Além disso, as folhas têm uma textura não cerosa e são rígidas. Essa espécie contém flores, ou brancas ou púrpuras pálidas, que aparece na superfície de água. Há frutas, que são cápsulas tendo um comprimento de menos que 1 cm e 3 mm em largura. As raízes são brancas, não ramificadas e filiformes. A planta tem múltiplos pontos de crescimentos apicais. Esta planta tem sido noticiada em lugares com lagos de uma grande extensão de profundidade, e é geralmente considerada com relativa alta tolerância à baixa condição de luz. Além disso, é capaz de formar novos brotos, mesmo quando folhas não estão presentes ou a haste se torna marrom como resultado de herbivoria (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016).

Myriophyllum spicatum: Uma erva perene com hastes longas e folhas de formato de penas que é submersa e enraizada no substrato. Ela tem flores pequenas e avermelhadas em cima da água na escápula. Hastes são delgadas, macias, de comprimento de 2-6 m e ramos são muitas vezes acima da superfície da água. Folhas são longas, divididas profundamente, com formato de pena. Cada folha tem um eixo central com 14-24 segmentos filiformes em cada lado. Folha em espiral com aproximadamente 20 cm de espessura. Tem quatro petaladas, aproximadamente 3 mm de largura, 4 sépalas e 8 estâmes. Tem quatro frutas lobadas que se divide em quatro partes e raízes fibrosas que podem desenvolver em fragmentos de plantas (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016).

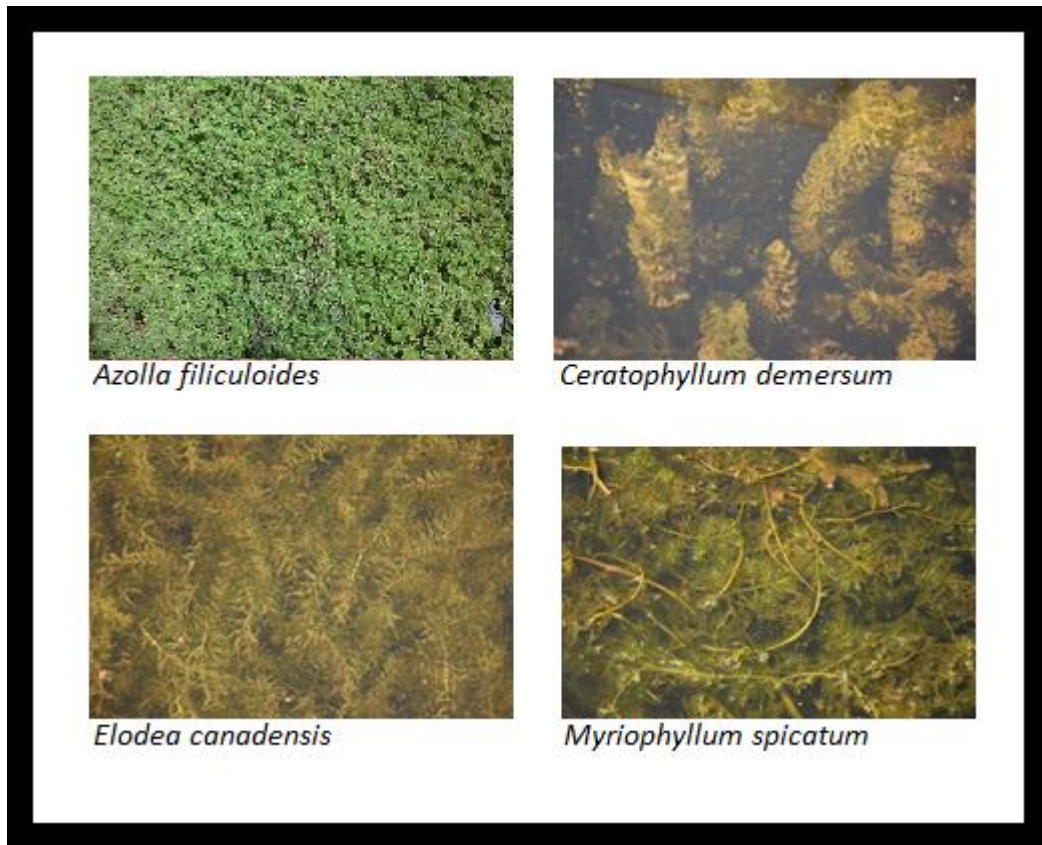


Figura 2: Painel com as quatro plantas usadas nos experimentos

2.4. Ebulição de metano

2.4.1. Armadilha para bolhas

Barras foram montadas acima dos lagos artificiais e foram usadas para anexar (usando fita adesiva) garrafas, viradas de ponta cabeça e com capacidade de aproximadamente 120 mL, que por sua vez, foram anexadas a funis, com diâmetro de 12,2 cm, para cada unidade experimental. Visando o encaixe perfeito, pedaços de mangueira foram colocados entre a garrafa e o funil, como ilustrado na figura 3. Dessa maneira, a armadilha para bolhas poderia capturar as bolhas de gás que vinham do fundo devido à pressão hidrostática, possibilitando a medição posterior da ebulição. As garrafas foram deixadas nos mesocosmos durante um mês inteiro, levando majoritariamente à formação de um acúmulo de ar na parte superior da garrafa. Após cerca de 30 dias expostas no mesocosmos, elas foram retiradas e imediatamente substituídas por novas, sempre na primeira semana do mês, durante

o período entre outubro de 2015 e junho de 2016, exceto no pico do inverno, quando os lagos congelaram (fevereiro).



Figura 3: Armadilha para bolhas nos mesocosmos

2.4.2. Medição e cálculos

As garrafas de amostragem foram levadas para o laboratório com intuito de realizar a medição na cromatografia de gás. Concentrações de metano do headspace foram medidas na *HP 5890 gas chromatograph* equipada com *Porapak Q column (80/100 mesh)* e um detector de ionização de chamas (Hewlett Packard, USA). Portanto, duas amostras de 0,1 mL foram retiradas do headspace de cada garrafa e injetadas na máquina para determinar ppm de metano (através da comparação entre áreas de mV por tempo de injeção de calibragem com valores pré-determinados e as áreas das amostradas oferecidas pela máquina). Em seguida, usando a concentração em ppm, os fluxos de metano foram determinados ($\text{mg/m}^2/\text{dia}$) em cada unidade experimental, usando as áreas dos funis e a exata quantidade de dias expostas nos mesocosmos.

2.5. Difusão

2.5.1. Montagem do experimento

A difusão de gases da água para a atmosfera foi determinada usando um analisador portátil de GEE que usa a espectroscopia de absorção a laser (*PICARRO G2508 GHG analyzer*) anexado a uma bomba e conectado a uma câmara flutuante de acrílico (área da base = 660 cm²; volume = 14,700 cm³) através de cabos. Essa câmara tinha três buracos na parte superior (duas permitindo a ligação à máquina/bomba e outra feita para ajustar a pressão inteira quando a câmara precisava ser removida). A câmara foi mantida parcialmente submersa em cada uma das 36 unidades experimentais, ficando 12 cm acima da superfície da água. Usando dois cabos (um conectando à bomba e outro ao Picarro), um circuito foi montado onde os gases poderiam passar através de um espaço fechado e vazio dentro da câmara, a bomba e o Picarro - de acordo com a figura 4 – e, portanto, determinando a concentração de gás carbônico, metano e óxido nitroso em ppm por tempo. As medições foram feitas sempre na segunda semana de cada mês de setembro de 2015 a maio de 2016, exceto no pico do inverno quando os lagos congelaram (fevereiro).



Figura 4: A difusão nos mesocosmos sendo medida, com a câmara flutuante anexada ao Picarro (GHG analyzer) ao fundo

Também durante essas medicos, para cada unidade experimental, anotações foram feitas sobre a altura das plantas submersas em relação à superfície do lago e a porcentagem de cobertura das quatro plantas nas unidades experimentais.

2.5.2. Cálculos

Usando os dados oferecidos pelo Picarro, os fluxos ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$) para os gases CH_4 , CO_2 e N_2O foram determinados usando a seguinte fórmula:

$$F = \frac{V}{A} * \text{slope} * \frac{P * F_1 * F_2}{R * T}$$

Onde, F é o fluxo do gás ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$), V é o volume da câmara (m^3), A é área da superfície da câmara (m^2), *slope* é a curva de relação entre CH_4 , CO_2 or N_2O e tempo (ppm/segundo); P é a pressão atmosférica (kPa); F1 é o pesor molecular para o gás carbônico (44), óxido nitroso (44) e metano (16; g mole^{-1}); e T é a temperatura em Kelvin (K). Um Macro criado através do Programa *Microsoft Excel* ajudou na realização dos cálculos.

2.6. Emissão dos sedimentos

2.6.1. Coleta e incubação

Sedimentos foram coletados uma vez por mês durante o período entre setembro de 2015 e maio de 2016 de cada unidade experimental, uma vez por mês, e foram incubados para determinar as emissões *in situ*. Cilindros de plástico de diferentes comprimentos (variando de 20 a 45 cm) foram usados com duas tampas de borracha, levando em conta que a quantidade de sedimento coletada era variável entre as unidades experimentais. A coleta foi feita manualmente, primeiramente empurrando o cilindro sob o sedimento, colocando em seguida a tampa na parte superior enquanto o cilindro ainda estava no sedimento. O encaixe de uma outra

tampa de borracha era colocada na parte inferior assim que o cilindro emergia novamente para a superfície. Os cilindros com sedimentos foram deixados dentro de uma banheira simulando a temperatura aproximadamente que os mesocosmos se encontravam na época da coleta, a qual deveria ser feita no máximo três dias antes das medições.

2.6.2. Medições

Primeiramente, antes das medições, a água do cilindro foi removida por sucção até a altura dos sedimentos usando um cabo, sem perturbar o sedimento. Para determinar as emissões, o analisador de GEE (Picarro) foi usado, anexado a tampa de borracha (perfurada com dois buracos) do cilindro através de dois cabos, um conectando em direção à bomba e outro no Picarro, compondo um circuito onde gases poderiam passar através de um espaço vazio e fechado dentro do cilindro, além da bomba e do Picarro e, portanto, determinando a concentração de CO₂, CH₄ e N₂O em ppm por tempo. Esse espaço de ar no cilindro foi medido em cada um deles com intuito de determinar o volume total do circuito cujos gases estavam circulando, uma vez que o volume era variável em cada medição, levando em conta que a altura dos sedimentos era também variável para cada cilindro. Cada cilindro foi coletado (figura 5) de cada unidade experimental foi medido em duas condições diferentes: óxica e anóxica. Para a primeira, os cilindros foram mantidos abertos alguns minutos antes das medições. Para a condição anóxica, um sistema de cabos e válvulas foi montado com intuito de, primeiramente, lavar os cilindros com gás nitrogênio até o nível de CO₂ < 20 ppm e os cilindros foram então imediatamente medidos. As medições foram feitas sempre na terceira semana de cada mês de setembro de 2015 a maio de 2016, com exceção do pico do inverno, onde os lagos congelaram (fevereiro), impedindo a coleta dos sedimentos para incubação.



Figura 5: Medindo os fluxos dos cilindros com sedimentos após a incubação

2.6.3. Cálculos

Usando os dados oferecidos pelo Picarro, os fluxos ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$) para os gases CH_4 , CO_2 e N_2O foram determinados usando a seguinte fórmula:

$$F = \frac{V}{A} * \text{slope} * \frac{P * F_1 * F_2}{R * T}$$

Onde, F é o fluxo do gás ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$), V é o volume da câmara (m^3), A é área da superfície da câmara (m^2), slope é a curva de relação entre CH_4 , CO_2 or N_2O e tempo ($\text{ppm}/\text{segundo}$); P é a pressão atmosférica (kPa); F_1 é o peso molecular para o gás carbônico (44), óxido nitroso (44) e metano (16; g mole^{-1}); e T é a temperatura em Kelvin (K). Um Macro criado através do Programa *Microsoft Excel* ajudou na realização dos cálculos.

2.7. Perfil de oxigênio

A concentração do oxigênio dissolvido (dada em mg/L) na água de cada unidade experimental foi determinada com intuito de ter uma indicação da produção primária, da adequação para a metanogênese e oxidação de metano. O dispositivo usado foi IntelliCAL™ LDO101 Rugged Luminescent/Optical Dissolved Oxygen (LDO) Probe, 5-Meter Cable anexado a um HQD Portable Meters, utilizado uma vez por mês, três vezes em cada unidade experimental, considerando três diferentes temperaturas: 5, 15 e 45 cm da superfície. As medições foram feitas sempre na segunda semana no mês de outubro de 2015 a maio de 2016.

2.8. Oxidação de metano

2.8.1. Coleta e incubação

Amostras de água e plantas foram coletadas com intuito de medir a atividade da oxidação de metano por bactérias metanotróficas de cada unidade experimental, uma vez durante a última semana de cada mês, considerando o período de setembro de 2015 a abril de 2016. A oxidação de metano foi medida por incubação de 36 garrafas contendo 60 mL de água (além de plantas de cada unidade experimental) and \pm 50 mL de espaço de air ambiente. Mais 36 das mesmas garrafas foram preparadas com as mesmas características mencionadas, divergindo apenas na ausência de plantas. A quantidade de plantas usadas variou ao longo das espécies: 1g de *M.spicatum*, 2g de *A. filiculoides* and 3g de *C. demersum* e *E. canadensis*. As garrafas foram fechadas com uma borracha e lacradas com uma tampa de alumínio (figura 6). As garrafas foram mantidas numa câmara climática (de setembro a janeiro) ou em um refrigerador (de fevereiro a abril), dependendo da disponibilidade de locação no laboratório. A temperatura foi simulada em ambos os casos e as condições de luz apenas na câmara climática.



Figura 6: Preparação de amostras para a então incubação na câmara climática ou refrigerador

2.8.2. Medições

Antes da primeira medição no mesmo equipamento usado para a ebulição, a máquina de cromatografia de gás, metano era injectado de 1 a 2 mL em cada garrafa para monitorar o decréscimo na sua concentração. Em cada medição na cromatografia de gás, 2 amostras de 0,1 mL eram retiradas do espaço de ar de cada uma das 72 garrafas e injetadas na máquina para determinar ppm de metano (através da comparação entre áreas de mV/tempo de injeção das garrafas para a calibragem com valores pré-determinados em relação às áreas das amostras oferecidas pela máquina). A primeira medição seria apenas para verificar a exata quantidade de metano injetada em cada garrafa e depois as próximas três medições na cromatografia de gás seriam feitas com um período variável de tempo (de 2 dias a uma semana) com intuito de ver se o decréscimo nas garrafas ao longo do tempo devido à oxidação de metano.

2.8.3. Cálculo das taxas de oxidação de metano

A concentração de metano nos espaços de ar nas amostras foi em seguida usada para calcular a concentração de metano na água incubada pela lei constante

de Henry. Posteriormente, a quantidade absoluta de mols de metano foi calculada multiplicando as concentrações achadas na água e nos espaços de ar com os volumes correspondentes. A mudança na concentração de metano ao longo do tempo pode ser calculada, portanto, como:

$$\frac{dCH_4}{dt} = -K_{CH_4} * CH_4$$

Onde metano é a (restante) concentração, K_{CH_4} é a reação constante (h-1) e se integra com a equação seguinte:

$$CH_{4,t} = CH_{4,0} * e^{-K_{CH_4} * t}$$

Onde $CH_{4,0}$ é a concentração de metano no tempo 0, $CH_{4,t}$ é a concentração de metano no tempo t. Essa integração foi usada para calcular a reação de constantes em nosso experimento de incubação.

2.8.4. Oxidação de metano por planta

Após todas as medições na cromatografia de gás serem feitas, as plantas foram totalmente removidas da garrafa e cada planta vinda de cada unidade experimental foi colocada em uma travessa de alumínio ou de porcelana, permanecendo 4 dias em uma estufa a 60°C. Em seguida, o peso seco foi medido para determinar a influência de cada grama de planta para a oxidação de metano (figura 7).



Figura 7: As amostras de planta sendo levadas para a estufa

2.9. Estatística

Um teste não paramétrico (Kolmogorov-Smirnov) foi feito com intuito de verificar a normalidade da distribuição dos dados. No caso de uma distribuição normal, um teste ANOVA – um método estatístico usado para testar diferenças entre duas ou mais médias – foi conduzido. Para todas as medições, o teste ANOVA foi feito para analisar a influência das duas variáveis (espécie e nível de nutrientes) e o seu termo de interação. O teste de HSD (diferença honesta significativa – *honest significant difference*) foi também realizado para criar grupos homogêneos para comparar as variáveis. Todos os testes estatísticos foram conduzidos usando o SPSS (V21, 2012, IBM Statistics) e $p < 0,05$ foi considerado significativo para os resultados.

3. RESULTADOS

3.1. Cobertura de macrófitas e temperatura para as medições

A tabela 1 abaixo mostra, durante todo o período, a temperatura em que as medições cujos processos eram dependentes da temperatura para o cálculo. Em fevereiro, as medições pararam devido ao pico do inverno, uma vez que a temperatura se tornou negativa e os lagos congelaram (figura 8). A cama de gelo atingiu cerca de 5 cm de espessura, que por sua vez tornou as medições da difusão e a produção de sedimentos impossível de serem feitas durante esse período. Além disso, as garrafas da armadilha para difusão, montadas no início de fevereiro antes da nevasca, também quebraram devido ao gelo interno (figura 9), o que levou ao descarte das medições da ebulição durante fevereiro.

Por outro lado, para a oxidação de metano, as medições pararam após abril, uma vez que algumas unidades experimentais não continham mais plantas devido à nível severo de eutrofização. Esse fato é descrito na tabela 2 (página 30), que inclui as características dos lagos ao longo de todo o período, onde cada unidade experimental (ou quarto dos lagos) recebeu um código* formado por três caracteres, o primeiro referindo a uma espécie (A=*Azolla*, C=*Ceratophyllum*, E=*Elodea*, M=*Myriophyllum*), o segundo ao nível de nutriente (em inglês: H= high nutrient level; I = intermediate nutrient level; L = low nutrient level) e o terceiro o número da réplica (1, 2 ou 3).

Tabela 1: Medição cujos procesos eram dependentes da temperatura para o cálculo

Measurement	Temperature (°C)									
	SEP	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	
Diffusion (ex situ)	20,6	8	12	8	7	-	9	14	12	
Production sediments (incubation)	14	8	8	10	12	-	10	15	14	
Methane oxidation (incubation)	23	23	10	10	7	5	10	15	-	

Tabela 2: Avaliação da cobertura e da distância entre o ápice das plantas e a superfície

Code of experimental (quarter)	Estimative distance of each submerged plant from the surface of the pond (cm) and percentage of estimative coverage for each plant - between parenthesis in the cell - in each month for each quarter							
	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Mar	Apr	May
AH1	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	D*(80%)	D* (70%)	D*(10%)	E*
AH2	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (80%)	D* (60%)	D*(80%)	D*(10%)	E*
AH3	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (80%)	D*(60%)	D*(60%)	D*(10%)	E*
AI1	- (95%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	D*(80%)	D*(60%)	D*(30%)	E*
AI2	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (80%)	D*(85%)	D*(80%)	D*(40%)
AI3	- (95%)	- (95%)	- (100%)	- (100%)	D*(80%)	D*(50%)	D*(30%)	E*
AL1	- (100%)	- (90%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	P (100%)	P*(90%)	P*(40%)
AL2	- (95%)	- (95%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	P*(100%)	P*(70%)
AL3	- (95%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)	-(100%)	- (90%)
CH1	1 (70%)	15 (70%)	T*	T*	T*	D*	D*	E*
CH2	0 (95%)	1 (70%)	2 (80%)	T*	T*	D*	D*	E*
CH3	1 (95%)	1 (95%)	1 (80%)	T*	T*	D*	D*	E*
CI1	0 (80%)	12 (80%)	18 (70%)	30 (80%)	T*	T*	D*	D*
CI2	2 (65%)	3 (70%)	5 (80%)	25 (80%)	20 (90%)	0 (80%)	T*	D*
CI3	5(100%)	1 (70%)	2 (50%)	T*	T*	D*	D*	E*
CL1	3 (75%)	5 (90%)	15 (90%)	20 (80%)	30 (40%)	40 (70%)	20 (80%)	2 (85%)
CL2	3 (75%)	20 (85%)	28 (80%)	40 (60%)	25 (40%)	40 (80%)	20 (80%)	20 (60%)
CL3	0 (85%)	1 (80%)	10 (65%)	15 (70%)	10 (75%)	30 (90%)	3 (80%)	T*
EH1	0 (95%)	0 (95%)	T*	T*	T*	D*	D*	E*
EH2	1 (70%)	0 (70%)	1 (70%)	T*	T*	D*	D*	E*
EH3	1 (95%)	1 (90%)	2 (70%)	T*	T*	D*	D*	D*
EI1	3 (75%)	3 (90%)	4 (75%)	3 (90%)	4 (70%)	1 (90%)	T*	T*
EI2	1 (80%)	2 (90%)	1 (95%)	0 (95%)	2 (95%)	T*	T*	T*
EI3	1(100%)	1 (100%)	1 (65%)	0 (100%)	1 (100%)	0 (85%)	T*	D*
EL1	2 (95%)	2 (90%)	6 (80%)	4 (70%)	5 (85%)	3 (90%)	0 (95%)	0 (100%)
EL2	1 (95%)	3 (95%)	2 (90%)	3 (90%)	2 (95%)	3(100%)	2 (100%)	2 (100%)
EL3	1 (95%)	1 (90%)	5 (80%)	10 (90%)	10 (90%)	10 (85%)	2 (95%)	0 (100%)
MH1	0 (95%)	1 (60%)	T*	T*	T*	D*	D*	E*
MH2	0(90%)	0 (70%)	1 (75%)	T*	T*	D*	D*	E*
MH3	1 (85%)	0 (95%)	0 (100%)	0 (100%)	T*	D*	D*	E*
MI1	1(100%)	0 (100%)	0 (90%)	0 (100%)	0 (95%)	1 (95%)	T*	D*
MI2	0 (90%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (90%)	T*	D*
MI3	1(100%)	0 (95%)	1 (85%)	0 (95%)	5 (85%)	0 (70%)	T*	D*
ML1	1(100%)	5 (80%)	10 (80%)	10 (60%)	10 (25%)	5 (30%)	0 (25%)	0 (100%)
ML2	1(100%)	0 (95%)	2 (85%)	0 (95%)	0 (95%)	0 (85%)	0 (90%)	0 (100%)
ML3	1 (85%)	1 (70%)	2 (60%)	0 (95%)	2 (85%)	2 (25%)	0 (45%)	T*

Legenda:

- Entre parênteses se encontra a cobertura das macrófitas e fora dele a distância entre os ápices das plantas e a superfície

- Para explicação do código das unidades experimentais veja (*) no corpo do texto

P* = *Azolla* estava avermelhada

T* = água no quarto se tornou turbida, impedindo a avaliação da cobertura e da altura das macrófitas submersas

D* = além da turbidez, a deterioração das macrófitas foi observada, uma vez que pedaços mortos das plantas foram vistos flutuando nos quartos. Uma vez que *Azolla* é a única planta flutuante, sua cobertura pôde ser determinada nessa condição

E* = quarto vazio; macrófita já se encontrava morta



Figura 8: Mesocosmos durante o pico do inverno (fevereiro). As medições e a adição de solução parou durante esse período



Figura 9: As armadilhas para bolhas durante o inverno. A coleta foi descartada em fevereiro.

3.2. Teste de Kolmogorov-Smirnov

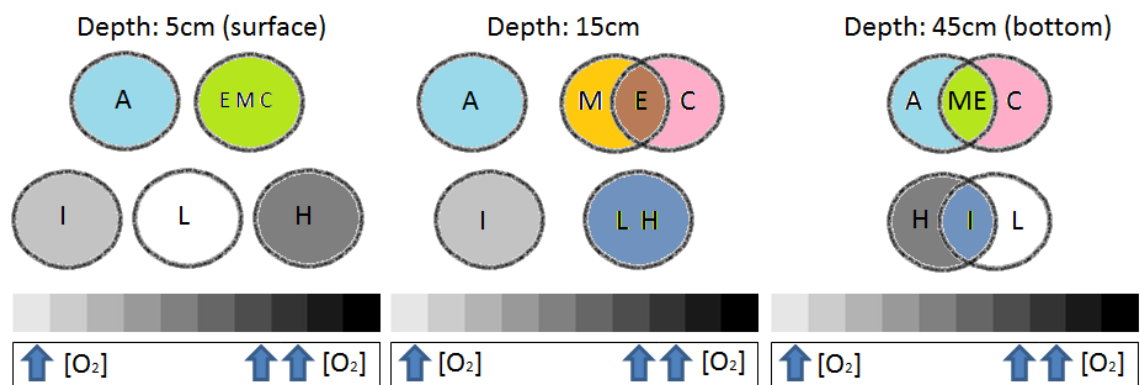
O mencionado teste não paramétrico foi usado para todo o conjunto de dados e foi demonstrada normalidade de distribuição para o conjunto, o que possibilitou o uso do teste ANOVA.

3.3. Perfil de oxigênio

Para todo o período, $n=288$ foi obtido para cada profundidade. Para a porção superficial (depth = 5 cm), teste ANOVA mostrou diferenças significantes entre as espécies ($p<0,0001$) e nutrient level treatment ($p<0,0001$). Contudo, o oposto foi demonstrado para sua interação ($p=0,176$). Para a profundidade intermediária (15 cm), todas as análises demonstraram significantes diferenças: entre as espécies, entre os níveis de tratamento e entre as interações ($p<0,0001$ para cada). Para profundidades próximas aos sedimentos (45 cm), mais uma vez diferenças significantes foram obtidas para todas as análises ($p<0,0001$ entre as espécies e entre os níveis de tratamento e $p=0,003$ entre sua interação).

Na figura 10, um esquema para o Teste HSD de Tukey onde o gradient com a concentração de oxigênio é demonstrado de acordo com a distribuição dos grupos homogêneos. A primeira letra do nível de nutriente (em inglês) é indicada na parte superior do esquema (H= high nutrient level; I = intermediate nutrient level; L = low nutrient level) e a primeira letra do nome de cada espécie (A=*Azolla*, C=*Ceratophyllum*, E=*Elodea*, M=*Myriophyllum*) está na parte inferior. A média da concentração de oxigênio durante todo o período em cada profundidade (sobrepostas no gráfico) por espécie em cada tratamento é também mostrada nessa seção (gráfico da figura 11).

Figura 10: Esquema para o teste HSD de Tukey – o agrupamento dos tratamentos com nutrientes e as espécies de acordo com o gradiente $[O_2]$



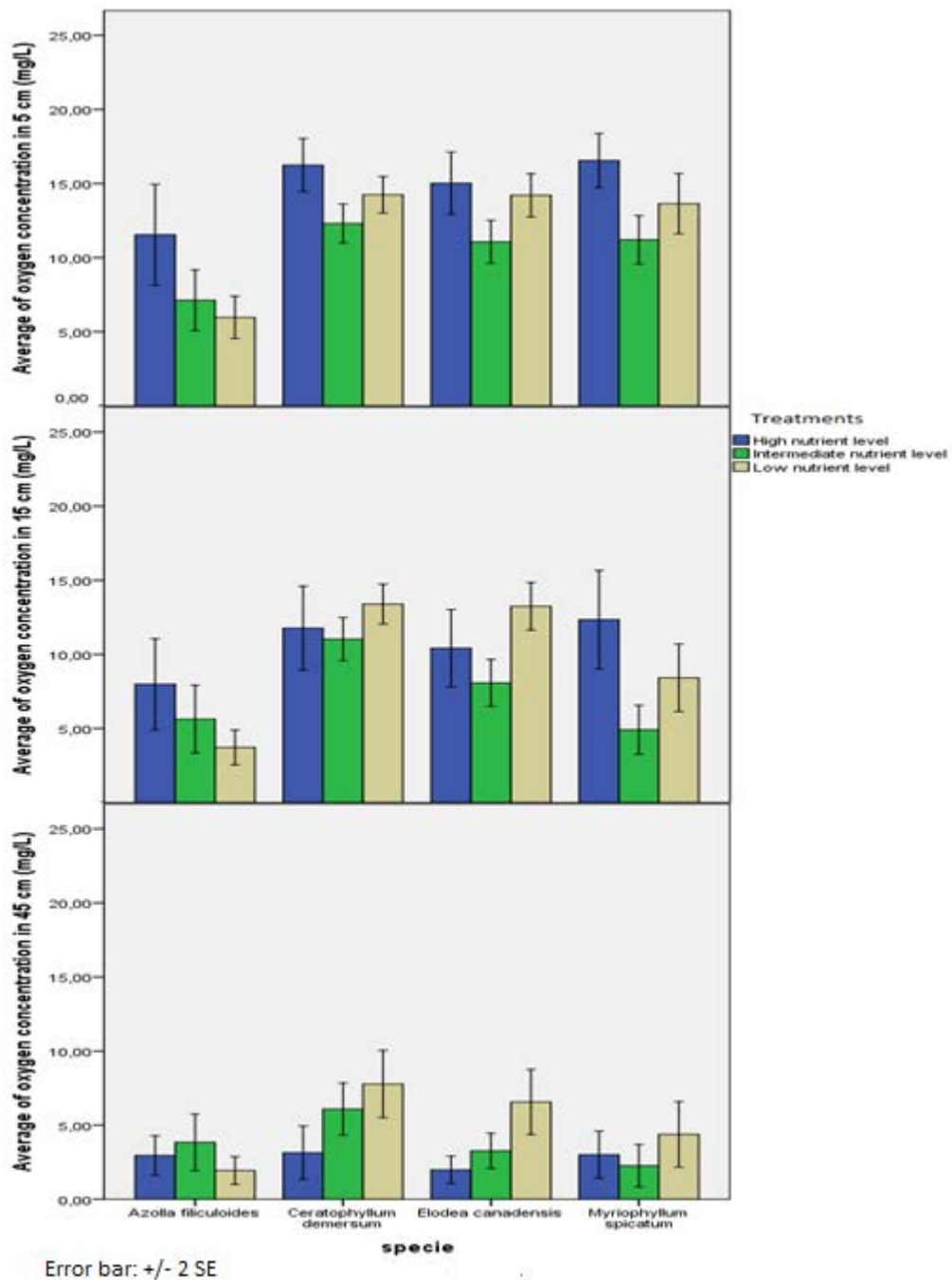
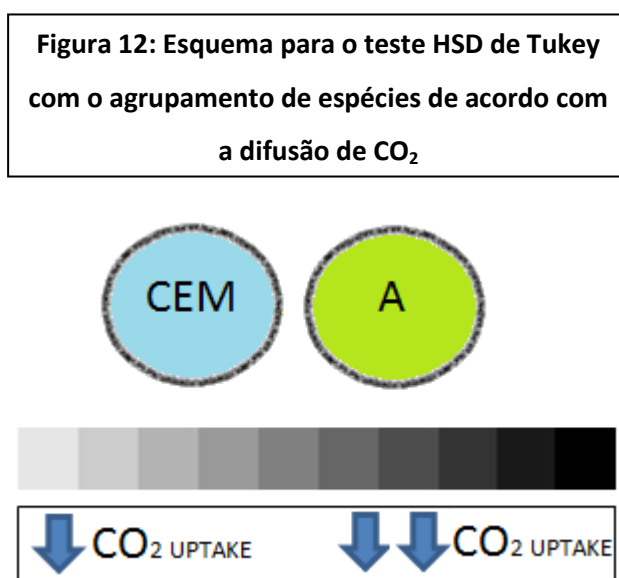


Figura 11: Perfil de oxigênio para cada espécie em cada tratamento

3.4. Fluxo de CO₂: difusão água-atmosfera e produção em sedimentos óxicos

O teste ANOVA foi feito para a difusão de gás carbônico considerando o período inteiro de coleta (n=288). Uma diferença significativa na difusão foi

encontrada entre as espécies. Azolla mostrou-se diferente das outras espécies ($p < 0,001$), tendo um maior sequestro de gás carbônico. Contudo, o nível de nutriente ($p = 0,771$) e interação espécie*nutriente level ($p = 0,597$) não obtiveram diferenças significativas. Na figura 12, num esquema para o teste HSD de Tukey, as letras representam as espécies dentro de seus respectivos grupos homogêneos de acordo com o gradiente de sequestro de gás carbônico na difusão. Note que mesmo considerando as três plantas submersas como homogêneas em relação a tal característica, a ordem disposta no grupo indica qual delas obteve mais ou menos sequestro de gás carbônico considerando o gradiente.



Para a produção de CO₂ nos sedimentos, as concentrações de oxigênio na coluna de água próxima ao sedimento foram majoritariamente acima de 2 mg/L, portanto a produção de gás carbônico no sedimento sob condições óxicas *in situ* provavelmente se assemelha melhor e foi usada para comparar com as emissões por difusão (gráfico da figura 13 abaixo). Para o período todo ($n = 277$), nenhuma diferença foi achada entre as espécies ($p = 0,487$), o nível de tratamento ($p = 0,173$) ou no fator de interação ($p = 0,219$).

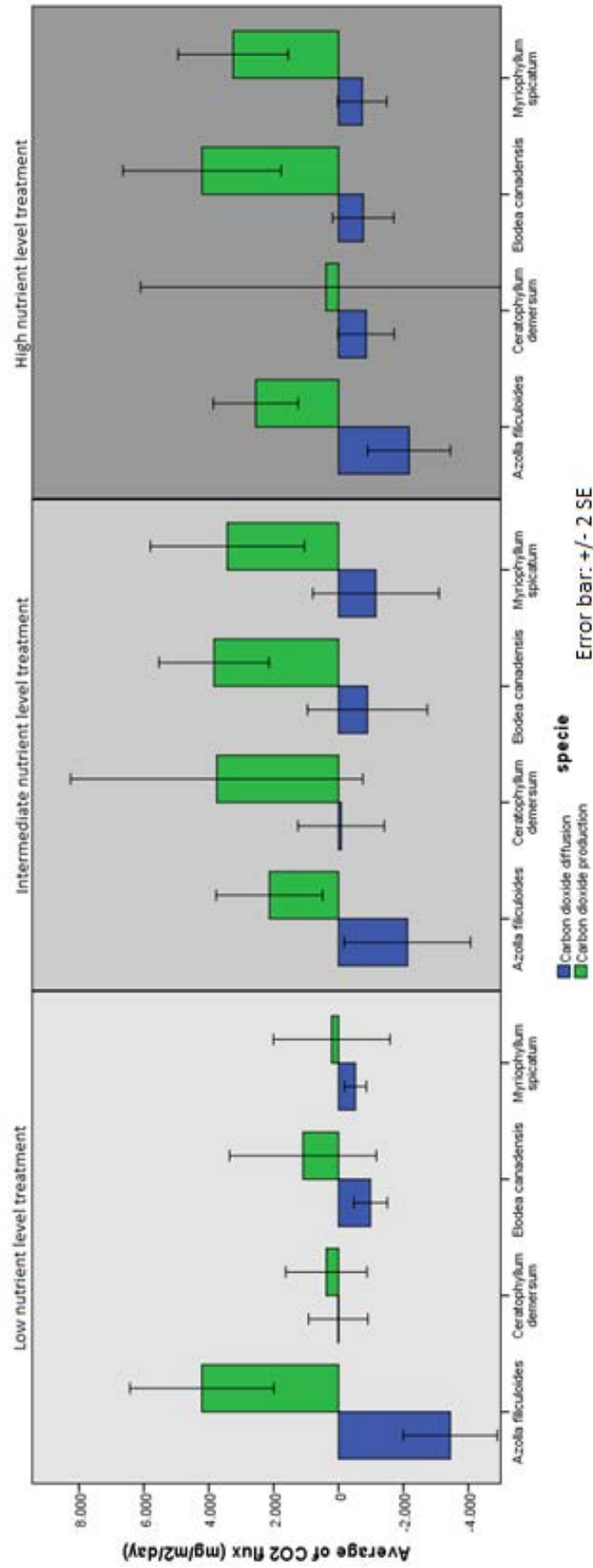


Figura 13: Média do período inteiro para a difusão água-atmosfera de gás carbônico e para sua produção em sedimentos por espécie em cada tratamento

3.5. Fluxo de CH₄: difusão água-atmosfera, produção em sedimentos óxicos, ebulição e oxidação

O teste da ANOVA foi feito para a difusão de metano considerando o período inteiro de coleta (n=288) e significantes diferenças não foram achadas na difusão considerando as análises entre espécies (p=0,730) e tratamentos (p=0,359). Contudo, para a interação entre essas variáveis, uma diferença significativa foi achada (p=0,049).

Para a produção de sedimentos, concentrações de oxigênio na coluna de água próxima ao sedimento foram majoritariamente acima de 2mg/L, portanto a produção de metano no sedimento sob condições oxigenadas *in situ* melhor descrevem as condições reais dos mesocosmos. Para o período inteiro (n=274), nenhuma diferença foi achada entre nenhuma das três análises para essa medição: espécies (p=0,33), os tratamentos (p=0,32) ou sua interação (p=0,484).

Por outro lado, a ebulição de metano mostrou diferenças significativas para as espécies (p<0,0001) e para o nível de nutrientes (p<0,0001), contudo o mesmo resultado não foi mostrado para a interação entre eles (p=0,164). Para as emissões por ebulição - muito mais baixas que para a difusão (gráfico da figura 14, página 37), as espécies, representadas por sua primeira letra, foram divididas em três grupos homogêneos, de acordo com o Teste HSD de Tukey (figura 16, parte superior, página 38). *Azolla* e *Myriophyllum* demonstraram uma clara diferença entre eles, pertencendo a diferentes grupos que não se relacionam entre si em relação ao gradiente para a ebulição de metano. Grupos homogêneos foram também definidos para os tratamentos (figura 16 – parte inferior, página 38). Portanto, altos níveis de P and N (H) permaneceram isolados com mais emissões que os outros tratamentos com menores níveis de nutrientes (I, L). A média de emissões ao longo dos meses para os fluxos ebulitivos por espécie em cada tratamento é representado no gráfico da figura 15 (página 38).

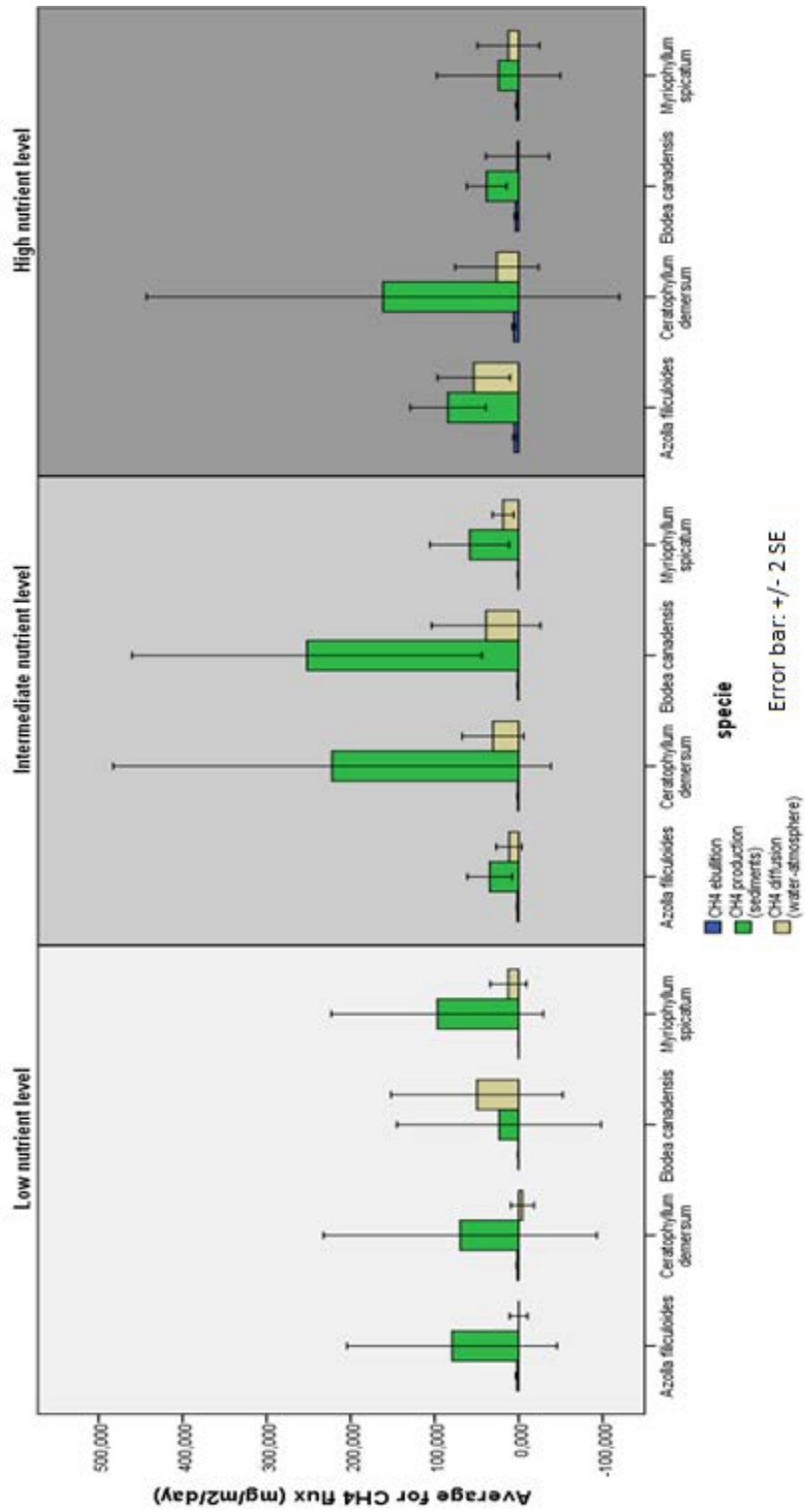


Figura 14: Média para as emissões de metano por espécie em cada tratamento ao longo de todo o período

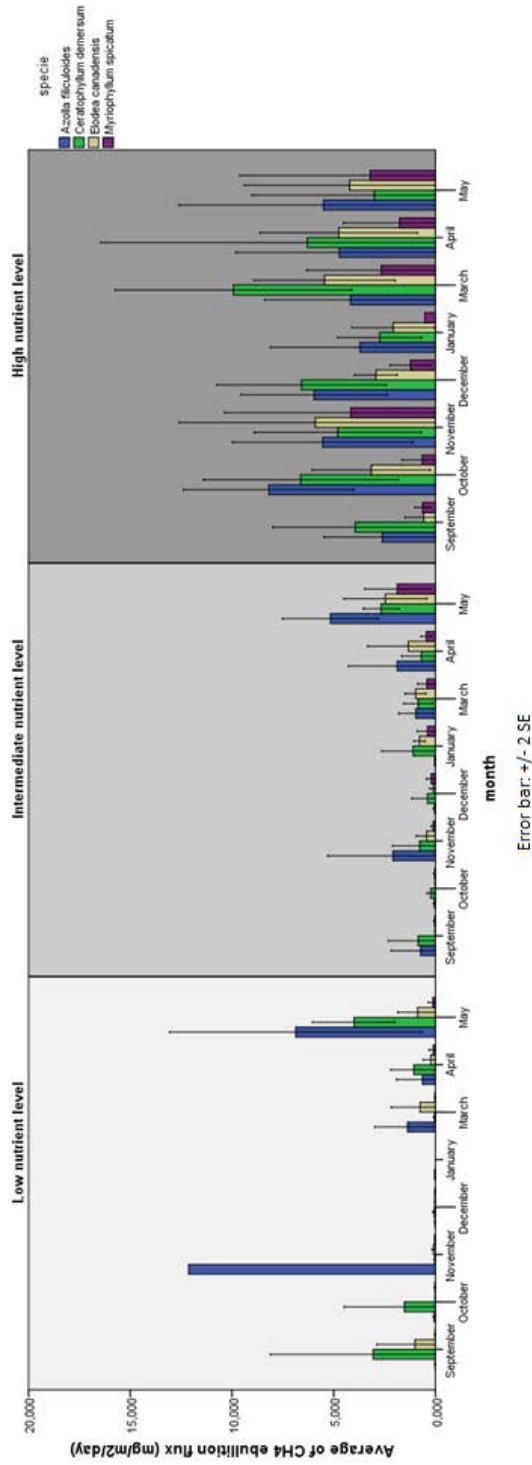


Figura 15: Média do fluxo de ebulção de metano por espécie em cada nível de nutriente

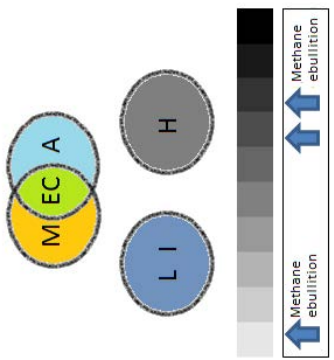


Figura 16: Esquema para o teste HSD de Tukey com as espécies e nível de nutriente de acordo com o gradiente de ebulção de metano

Teste ANOVA foi também realizado para a medição da oxidação de metano, considerando o código para as unidades experimentais (descrito na tabela 2, página 30) como fatores aleatórios, e nenhuma diferença significativa foi encontrada (entre espécies: $p=0,479$; entre nível de nutrientes: $p=0,465$; a interação entre eles: $p=0,559$). Também nenhum dos códigos das unidades experimentais mostraram diferenças significativas. O gráfico da figura 17 mostra a média do consumo de metano por oxidação ($\mu\text{mol/h}$) considerada por grama do peso seco da planta, durante o período todo ($n=288$), comparando o nível de nutriente e as espécies.

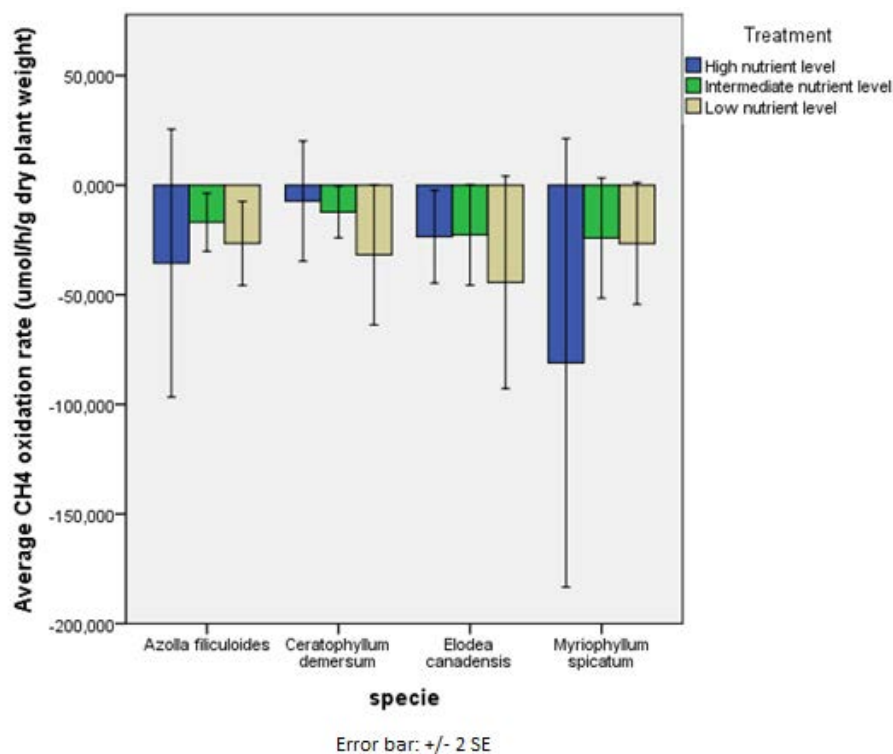


Figura 17: Consumo de metano por espécie em cada tratamento

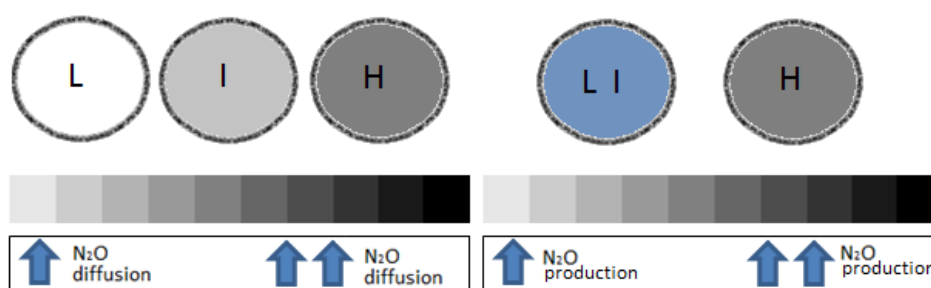
3.6. Fluxos de N_2O : difusão água-atmosfera e produção em sedimentos

O teste foi feito para a difusão de óxido nitroso durante o período inteiro de coleta ($n=288$). Diferenças significantes na difusão não foram mostradas entre as espécies ($p=0,127$) e na interação espécie*nutrient level ($p=0,192$). Entretanto,

houve uma diferença clara, gradual e significativa entre os três níveis de carga de nutrientes ($p < 0,0001$).

Para a produção de óxido nitroso nos sedimentos, as concentrações de oxigênio na coluna de água próximas ao sedimento foram majoritariamente acima de 2 mg/mL, portanto a produção de óxido nitroso sob condições óxicas *in situ* são melhor utilizadas para descrever esse processo no mesocosmos e comparar com a difusão (gráfico da figura 19). Para o período inteiro ($n=277$), as mesmas relações foram avaliadas (entre espécies: $p=0,107$; interação: $p=0,395$). Portanto, houve apenas diferença significativa novamente para o nível de nutrientes ($p < 0,0001$). O esquema da figura 18 demonstra a distribuição dos grupos homogêneos para o teste de HSD de Tukey, considerando o gradiente de N_2O em ambos os tipos de fluxos.

Figura 18: Esquema para o teste HSD de Tukey com o agrupamento das espécies e o nível de nutriente de acordo com a difusão/produção em sedimentos



3.7. Condições óxicas e anóxicas para a produção dos GEE nos sedimentos

O teste da ANOVA foi realizado para comparar as diferenças entre as condições óxicas e anóxicas na produção de GEE nos sedimentos. O resultado mostrou que não houve diferença significativa entre ambas as condições ($p=0,159$). Dessa maneira, os resultados para cada gás nas condições anóxicas não serão mostradas aqui, contudo, as razões para isso e a metodologia serão discutidas na próxima seção.

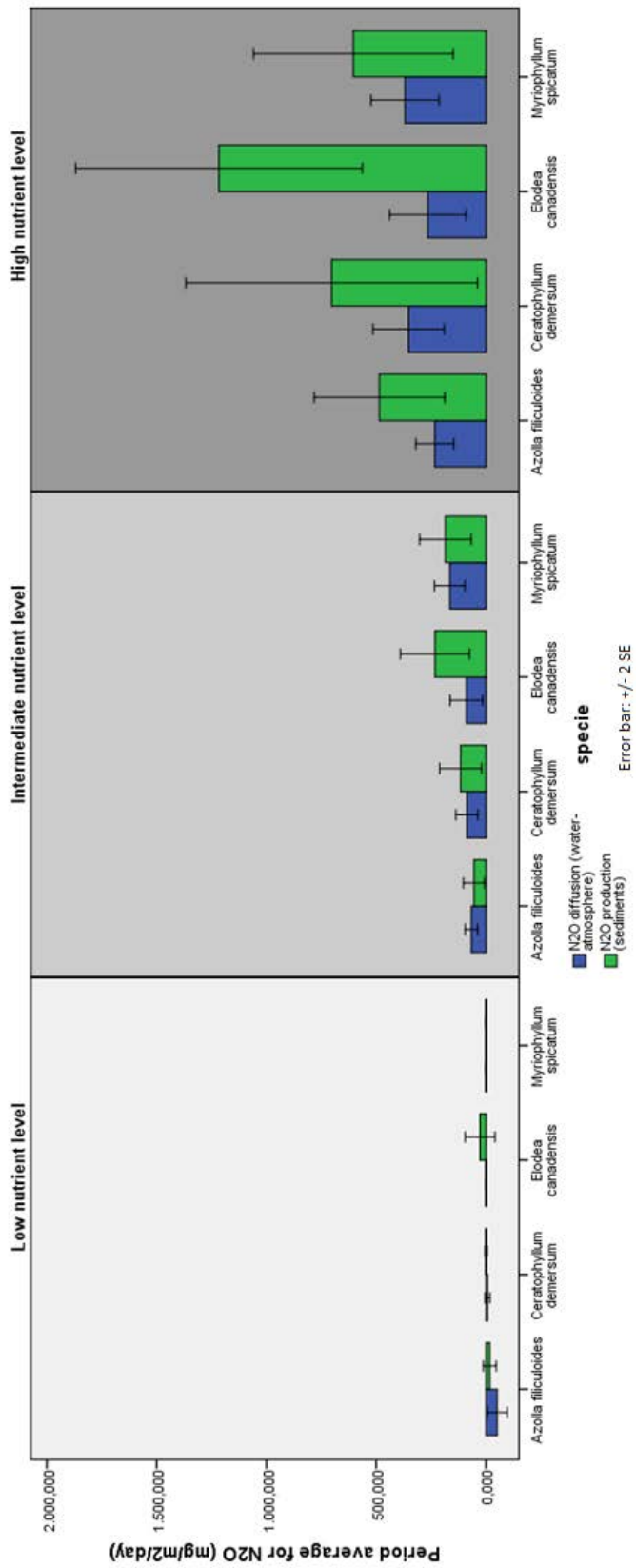


Figura 19: A média do período inteiro para os fluxos de óxido nitroso (difusão/produção em sedimentos) por espécie em cada nível de nutriente

4. DISCUSSÃO

Para a simulação das condições óxicas e anóxicas na produção de GEE nos sedimentos, nenhuma diferença foi verificada provavelmente devido ao curto período em que os cilindros com sedimentos permaneceram sem oxigênio, o que não repercutiu em eficiente metanogênese. Além disso, o fato da não inclusão da medição das concentrações de oxigênio dentro dos cilindros depois de lavá-los com gás nitrogênio também não garantiu que eles estivessem de fato anóxicos. Outra questão que pode ter prejudicado as medições, em ambas as condições, pode ter sido a perturbação dos sedimentos. O transporte dos cilindros dos mesocosmos (no Jardim Experimental do campus da Universidade de Radboud) até o laboratório no complexo de prédios da Faculdade de Ciências (Huygensgebouw) foi feito colocando-os dentro de baldes levados sobre uma mesa de rodas e, uma vez que o caminho não era plano, o movimento pode ter perturbado relativamente os sedimentos. Portanto, esse fato pode ser um dos argumentos para explicar os resultados altamente variáveis e não completamente satisfatórios para a produção de sedimentos.

Da metade do período das medições em diante, um intenso processo de eutrofização pôde ser verificado nos níveis alto e médio de nutriente. De acordo com a tabela 2 (página 30), algumas unidades experimentais começaram a ficar túrbidas aproximadamente por volta de novembro. Praticamente, as plantas no tratamento H (alto) já estavam quase completamente mortas e a maioria delas no tratamento I (intermediário). Ademais, verificando essa intensa eutrofização (figura 20) e essas altas emissões de óxido nítrico (média no tratamento H foi de 307,81 mg/m²/dia e para o tratamento I foi de 307,81 mg/m²/dia), análises de amostra de água foram feitas em fevereiro. Altos níveis de nitrato e fosfato, mas especialmente amônio, foram registrados nos tratamentos H e I, cujos valores são apresentados na tabela 3. O nível de nutrientes achado pode ser considerado muito alto, tendo em vista que carga crítica para fósforo calculada variam de 1.8 to 10.2 g P m⁻² ano⁻¹, enquanto para nitrogênio variam de 12.1 to 43.8 g N m⁻² ano⁻¹, de acordo com o modelo de eutrofização PCDitch (JANSE *et al.* 2007). Há então uma suposição que houve um processo de eutrofização interna para todos os lagos, além da eutrofização externa causada pela adição de nutrientes. Portanto, os sedimentos poderiam estar inicialmente sobrecarregados de fósforo e nitrogênio.

Tabela 3: Análise de água depois dos resultados obtidos

Nutrient level treatment	Average for the quarters ($\mu\text{mol/L}$)		
	Phosphate (PO_4)	Nitrate (NO_3)	Ammonium (NH_4)
High	266,10	215,55	4.298,02
Intermediate	70,83	175,06	1.894,85
Low	0,96	33,91	45,75

**Figura 20: Tratamento H em abril. Note a clara evidência do intenso processo de eutrofização**

Fora isso, de acordo com a tabela 2 (página 30), algumas plantas mostraram variável tolerância ao processo de eutrofização. Nós poderíamos mencionar *Elodea* como a mais resistente, uma vez que no tratamento I nenhuma planta morreu e mesmo algumas nem estavam se deteriorando em maio (quartos EI1 e EI2), embora a água se encontrava completamente turbida. No último mês, o único quarto do tratamento H que tinha uma planta viva continha *Elodea* (EH3), embora totalmente deteriorada. Portanto, esses resultados sobre a resistência corroboram à literatura sobre *Elodea*, servindo para justificar uma das características que a levaram para seu sucesso como espécie invasora, adaptando-se a águas eutróficas (HUSSNER, 2012; NICHOLS *et al.* 1986). Por outro lado, *Azolla* foi a macrófita mais vulnerável a esse *inputs* de nutrientes, sendo a única planta que deterioração foi observada mesmo no tratamento L (AL1 e AL2). Em alguns quartos com *Azolla*, houve um processo que fez como que a planta se tornasse avermelhada, provavelmente

indicando deficiência de fósforo, que é o mais importante e frequente nutriente para o crescimento de *Azolla* (Lumpkin, 1980). Portanto, esse fato explica a ocorrência dessa condição apenas nos lagos com tratamento L.

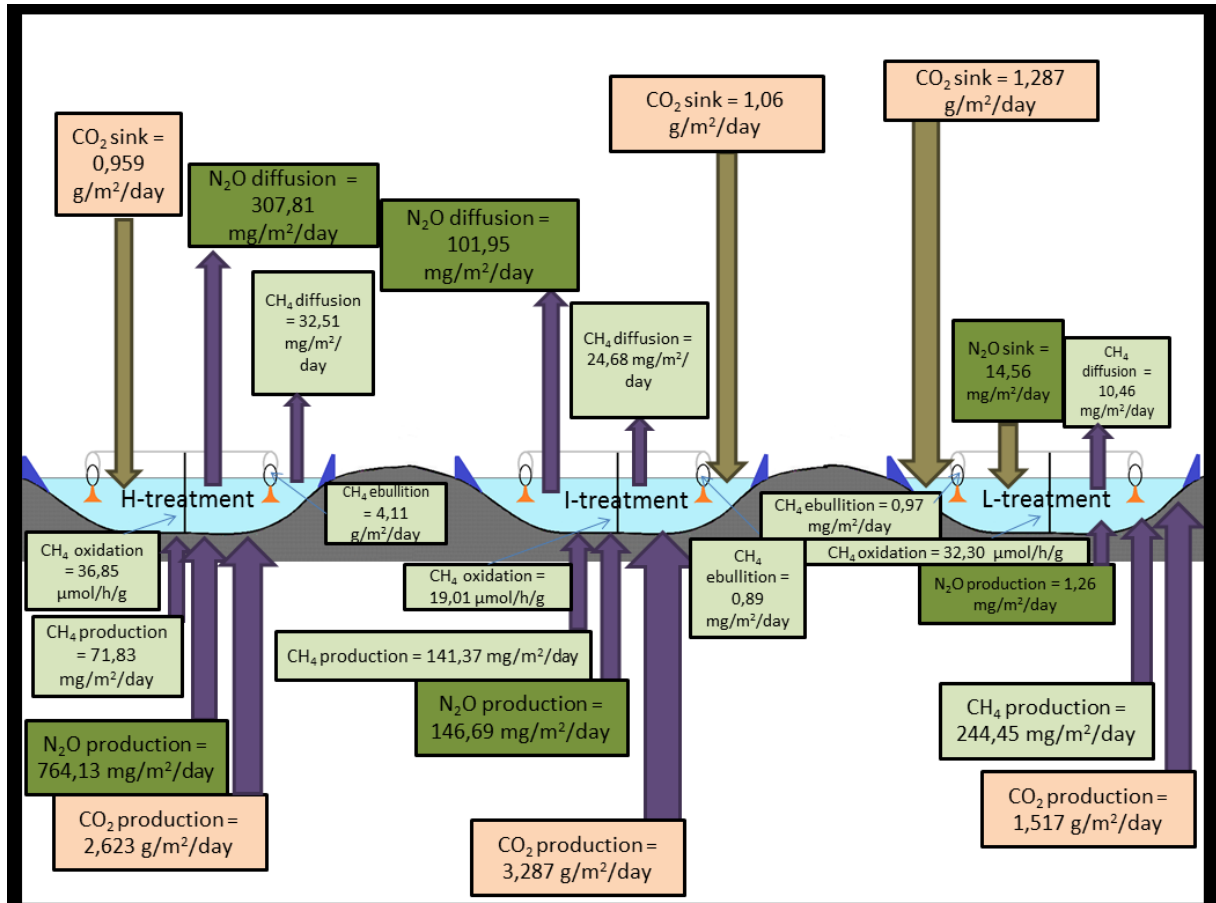


Figura 21: Esquema resumindo os fluxos dos GEE para todo o período comparando os três tratamentos

Os fluxos de gás carbônico nessa pesquisa apoiaram a literatura no ponto que todos os lagos, mas especialmente as unidades experimentais com *Azolla*, mostraram claramente um sequestro de gás carbônico. Nós também tínhamos uma hipótese que maiores sequestros desse gás ocorreriam no tratamento H, devido à maior produção primária. De fato, analisando as concentrações de oxigênio para a profundidade de 5 cm (próximo da superfície), nós podemos achar maiores concentrações de oxigênio no tratamento H e, desconsiderando a influência das macrófitas no tratamento H uma vez que estas começaram a se deteriorar severamente após fevereiro, nós poderíamos dizer que as altas [O₂] foram provavelmente devido à proliferação de fitoplâncton, aumentando a produção primária. No entanto, os maiores sequestros de gás carbônico ocorreram no

tratamento L (gráfico da figura 13, página 35), seguido pelo tratamento I (figura 21), embora essa diferença não foi significativa. Esse fato poderia ser explicado por um mecanismo: a biomassa das macrófitas. Uma vez que as plantas começaram a deteriorar especialmente após março, a taxa de fotossíntese e, portanto, a média da produção primária pode ter sido mais representativa pelas plantas vivas no tratamento L que o fitoplâncton nos lagos eutróficos.

Em geral, o perfil de oxigênio corrobora a variação da concentração de oxigênio para os níveis de eutrofização. No tratamento H, menos oxigênio foi encontrado próximo dos sedimentos (o que pode explicar os mais altos nível de ebulição de metano nesse tratamento, embora a camada de água diretamente acima dos sedimentos não é necessariamente anóxica) e os mais altos níveis de oxigênio foram apresentados na superfície. O tratamento L também apoiou o que seria esperado para um baixo nível de eutrofização, obtendo as mais altas concentrações na profundidade de 45 cm. Por outro lado, o nível intermediário de eutrofização não mostrou um claro padrão intermediário entre os outros tratamentos, sendo o mesmo muito variável. Para as plantas, as unidades experimentais com *Ceratophyllum* continha uma média de mais oxigênio em todas as profundidades, provavelmente devido à uma maior biomassa, como sugerido pela literatura (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016). Por outro lado, quartos com *Azolla* demonstraram em todas as profundidades conterem maior nível de oxigênio. Esse fato é facilmente verificado, uma vez que menos oxigênio é dissolvido na água devido ao fato de *Azolla* ser uma planta flutuante. *Myriophyllum* apresentou baixa $[O_2]$, destacando-se como a planta submersa com os menores níveis de oxigênio, também apoiando a bibliografia (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, 2016).

Analisando separadamente a profundidade de 45 cm (a terceira camada do gráfico da figura 11, página 33), próximo ao sedimento, a concentração de oxigênio é a mais baixa para *Azolla* no tratamento L. Esse fato poderia levar à errada interpretação que *Azolla* no tratamento L poderia ter os mais altas taxas de ebulição (levando em conta que baixos $[O_2]$ facilitariam a metanogênese), o que apresentaria uma diferença significativa na interação espécie X nível de nutriente para ebulição. Contudo, na ebulição de metano, nenhuma diferença significativa foi mostrada para a interação mencionada e, em geral, mesmo para *Azolla*, os altos níveis de nutriente tiveram mais ebulição (gráfico da figura 15, página 38). Portanto, isso pode ser explicado pelo fato da interação espécie X nível de nutriente estar presente na

concentração de oxigênio a 45 cm, o que poderia fazer *Azolla* se comportar diferentemente de outras espécies submersas no tratamento L. Dessa maneira, as maiores taxas de ebulição no tratamento H são explicadas devido aos mais baixos níveis de oxigênio nas outras espécies e não em *Azolla* (para esclarecer, no gráfico da figura 11 da página 33, note na profundidade de 45 cm do gráfico que todas as plantas submersas no tratamento H obtiveram menores concentrações de oxigênio comparado aos outros tratamentos).

Acima de tudo, nós deveríamos enfatizar que a ebulição não foi relevante como emissão de metano comparado com a difusão (figura 21, página 44). Os fluxos da última foram mais relevantes, contudo, não mostraram qualquer padrão para as variáveis separadamente assim como para a produção de metano em sedimentos, que foi quase inversamente proporcional com a difusão quando se compara os tratamentos (figura 21). Para a difusão, houve apenas uma fraca significância para a interação entre as variáveis ($p=0,049$). Analisando o gráfico da figura 14 (página 37), nós poderíamos indicar uma fraca tendência de *Azolla* em obter as maiores emissões de metano da água pra atmosfera no tratamento H. Contudo, tal planta flutuante se deteriorou muito nesse tratamento ao longo do período, o que dificulta qualquer conclusão.

Para completar a análise do fluxo de metano, sua oxidação também não demonstrou qualquer diferença para as variáveis, o que é demonstrado por sua alta variação em relação aos tratamentos e espécies e, especialmente, ao longo dos meses. Durante as medições, muitas vezes houve mais taxa de oxidação para as amostras contendo apenas água que para as contendo água e planta. Isso demonstra a ausência de metano oxidação para a influência das plantas. Ademais, inicialmente uma câmara climática foi utilizada para incubar as amostras. De fevereiro em diante, houve uma impossibilidade de manter as amostras no mesmo lugar, que fez com que as amostras fossem mantidas em refrigerador escuro. Essa variação na condição de luz durante as incubações pode ter causado a variação temporal. Contudo, os resultados estão de acordo com a literatura, mostrando um geral alta oxidação de metano (cuja média para o período inteiro em cada quarto foi 29,36 $\mu\text{mol/h/g}$ de peso seco por planta) para as macrófitas nessa pesquisa. In situ, Yoshida (2014) descreveu uma atividade de consumo de metano por metanotrofos associada com diferentes espécies de plantas aquáticas que eram no intervalo entre 3,7–37 $\mu\text{mol/h/g}$ de peso seco de planta, sendo 5,7 a 370 vezes mais

alto que o consumo de metano em partes submersas de plantas emergentes, como folhas de plantas lenhosas, por exemplo. As altas taxas de oxidação de metano também encontradas em nossa pesquisa esclareceu parcialmente o orçamento do metano (figura 15, página 44), uma vez que comparando os fluxos para produção em sedimentos e difusão, muito mais metano é produzido que lançado para a atmosfera, consolidando o papel da oxidação de metano como sequestro de metano. Contudo, esse orçamento ainda não está claro, uma vez que houve mais produção em sedimento no tratamento L e menos no tratamento H, então nós esperaríamos uma maior oxidação de metano no primeiro (também por apresentar maior biomassa de plantas) e, portanto, possibilitando explicar as baixas emissões de metano no tratamento L por difusão. No entanto, significantes resultados entre as cargas de nutrientes não foram mostradas para a oxidação de metano. Além disso, uma vez que nós não achamos qualquer diferença entre as variáveis, os resultados não suportam as hipóteses de Veraart (2015), que declara que a oxidação de metano tem positiva relação com a adição de fósforo e correlaciona com muitas outras variáveis, como a vegetação; também declarando que baixas adições de nitrogênio tendem a estimular a oxidação de metano e, por outro lado, grandes adições poderiam ser estimulatórias.

Para os fluxos de óxido nitroso, os resultados mais intrigantes foram apresentados. O nível de nutriente superou qualquer diferença entre espécies e mostrou diferenças significantes, principalmente para a difusão, onde uma diferença clara e gradual foi observada entre os tratamentos. As emissões foram extremamente altas, atingindo uma média de 307,81 mg/m²/dia no tratamento H ao longo dos oito meses (figura 21, página 44). Dessa forma, esses resultados corroboram a bibliografia, considerando que houve um maior lançamento de N₂O provavelmente de uma maior desnitrificação nas águas eutróficas (HUTTUNEN *et al.* 2003), uma vez que tal gás é um produto intermediário do processo de desnitrificação, antes do lançamento de gás nitrogênio para a atmosfera. Altas emissões de óxido nitroso podem ser explicadas pela alta disponibilidade de N, que foi comprovado pela análise de água. Além disso, principalmente para o tratamento H, houve uma clara diferença entre os níveis de óxido nitroso produzido no sedimento e as relativamente mais baixas emissões por difusão (gráfico da figura 19, página 41). Esse contraste indica que o sequestro de óxido nitroso aconteceu devido a algum processo incerto, possivelmente devido às macrófitas. Ademais, apesar da

diferenças não ser significativa para as espécies, *Elodea* tinha as maiores produções em todos os tratamentos e, ao mesmo tempo, relativamente as mais baixas emissões por difusão, que pode indicar algum processo de sequestro de óxido nitroso relacionado a essa planta. Por outro lado, nos quartos com *Azolla* mostraram as menores emissões e mesmo um sequestro de óxido nitroso para a difusão, como já sugerido pela literatura. Mengis *et al.* 1997 relatou um sequestro de 0,01 mg/m²/dia no caso de lagos profundos; Hendzel *et al.* 2005 descreveu um sequestro de 0,05 mg/m²/dia no caso de reservatórios de floresta boreal; finalmente, Soued *et al.* 2016 relatou um sequestro de 1,01 mg/m²/dia (23,1 μmol/m²/dia) e também emissões de 5,09 mg/m²/dia (115,7 μmol m²/dia). Entretanto, os valores apresentados mesmo para um sequestro na nossa pesquisa são expressivamente altos (14 mg/m²/dia) e contradizem a suposição de Soued: fluxos de óxido nitroso nesse trabalho foi fortemente dependente do gradiente de N. No entanto, uma investigação mais a fundo na possível ebulição de N₂O e no processo de desnitrificação poderia ajudar a esclarecer os fluxos desse gás.

Ao longo dessa pesquisa, nós poderíamos afirmar que a carga de nutrientes tem maior importância nos fluxos de GEE que as espécies de macrófitas. Contudo, de acordo com a avaliação da biomassa na tabela 2 (página 30), a condição das plantas variou muito entre os tratamentos, o que dificulta análise de diferença significativa clara, especialmente após uma intensa deteriorização das macrófitas no tratamento H e I após março. Embora a provável obliteração dos efeitos das macrófitas pode ter dificultado uma clara afirmação, nós ainda podemos indicar que os tratamentos com carga de nutrientes tendem a ter relativamente maior importância nos fluxos dos GEE que a composição de espécies de macrófitas. Afinal, mesmo para os tratamentos L, cujas macrófitas não foram deterioradas majoritariamente, diferenças relevantes não foram mostradas nos testes estatísticos para as espécies e para uma provável interação de certa espécie no tratamento L.

5. CONCLUSÃO

Para as medições da oxidação de metano e da produção de GEE nos sedimentos, houve uma alta variação de valores nos resultados que dificultou a elucidação dos processos, uma vez que os efeitos dos tratamentos não puderam ser completamente desvendados. Isso significa que provavelmente a metodologia deveria ser melhorada com intuito de obtenção de resultados mais precisos.

Embora houve provável obliteração dos efeitos das espécies de macrófitas no tratamento H e I, uma vez que elas começaram a se deteriorar ao longo do processo de eutrofização, nós ainda podemos indicar que os tratamentos de carga de nutriente tendem a ter relativamente maior importância nos fluxos de GEE que a composição de espécies de macrófitas. Portanto, os lagos podem se comportar como grandes fontes de sequestro de GEE (de gás carbônico, especialmente no caso de *Azolla*, mas também expressivo sequestro de óxido nitroso no tratamento L) ou alta fonte de emissão de GEE (no caso de emissões de metano e, sobretudo, emissões de óxido nitroso, para os tratamentos H e I).

Resultados consideráveis foram obtidos para o metano: sua oxidação apresentou altas taxas e sua ebulição, cujos valores foram proporcionais à carga de nutrientes, foi claramente menos relevante que a difusão para as emissões totais. Contudo, os resultados obtidos não foram suficientes para construir um orçamento de metano claro para esses lagos rasos e, assim, mais pesquisa é necessária para esclarecer o balanço entre a taxa de produção e a emissão desse gás.

Por outro lado, o óxido nitroso foi claramente dependente do gradiente de N e apresentou emissões que superaram a importância dos outros gases para a perspectiva do aquecimento global, especialmente considerando que o potencial de aquecimento global (GWP) para esse gás é 289 vezes mais alto que o CO₂. Dessa maneira, o fluxo do N₂O merece receber mais atenção nas pesquisas futuras.

Além disso, lagos rasos foram historicamente ignorados do orçamento de GEE e deveriam receber maior atenção, como já foi indicado em outras recentes pesquisas como a de Holgerson *et al.* 2016. Portanto, nossos resultados podem encorajar mais pesquisas sobre esse tipo de sistema de água doce no orçamento dos gases do efeito estufa.

6. REFERÊNCIAS

BASTIVKEN, D., COLE, J., PACE M. L. and VAN DE BOGERT, M.C. Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄ emissions. *J Geophys Res* 113: 20-24. 2008.

BASTIVKEN, D. Methane, p. 783–805. In G. E. Likens [ed.], *Encyclopedia of inland waters*. Elsevier. 2009.

BASTIVKEN, D., TRANVIK, L. J., DOWNING, J. A., CRILL, P. M. and ENRICH-PREST, A. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science*. 331:350. 2011.

BAULCH, H. M. Night and day: Short-term variation in nitrogen chemistry and nitrous oxide emissions from streams. *Freshwat. Biol.* 57: 509-525. 2012.

BAULCH, H. M., Schi, S. L., Maranger, R. and Dillon, P. J. Nitrogen enrichment and the emission of nitrous oxide from streams. *Glob. Biogeochem. Cycles* 25. 2011.

BE'DARD, C., and KNOWLES, R. Hypolimnetic O₂ consumption, denitrification, and methanogenesis in a thermally stratified lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1048–1054. 1991.

BEAULIEU, J. J., SHUSTER, W. D. and REBHOLZ, J. A. Nitrous oxide emissions from a large, impounded river: The Ohio River. *Environ. Sci. Technol.* 44: 7527-7533. 2010.

CHANTON, J.P., WHINTING, G. J., HAPPELL, J.D. and GERARD, G. Contrasting rates and diurnal patterns of methane emission from emergent aquatic macrophytes. *Aquat Bot* 46: 111–128. 1993.

CHANTON, J. P., MARTENS, C. S., and KELLEY, C. A. Gas transport from methane-saturated tidal freshwater and wetland sediments, *Limnol. Oceanogr.*, 34: 807–819. 1989.

CHENG, W., SAKAI, H., MATSUSHIMA, M., YAGI, K. and HASEGAWA, T. Response of the floating aquatic fern *Azolla filiculoides* to elevated CO₂, temperature, and phosphorus levels *Hydrobiologia*, vol. 656: 5-14. 2010.

CLOUGH, T. J., BUCKTHOUGHT, L. E., CASCIOTTI, K. L., KELLIHER, F. M. and JONES, P. K. Nitrous oxide dynamics in a braided river system, New Zealand. *J. Environ. Qual.* 40: 1532-1541. 2011.

DACEY, J. W. H., KLUG, M. J. Methane efflux from lake sediments through water lilies. *Science* 203: 1253-1255. 1979.

EUGELINK, A.H. Phosphorus uptake and active growth of *Elodea canadensis* Michx. and *Elodea nuttallii* (Planch.) St. John. Water Sci Technol 37: 59–65. 1998.

FALLON, R. D., HARRITIS, S., HANSON, R. S. and BROCK, T. D. The role of methane in internal carbon cycling in Lake Mendota during summer stratification. Limnology and Oceanography 25: 357-360. 1980.

FEUCHTMAYR, H., MORAN, R., HATTON, K. et al. Global warming and eutrophication: effects on water chemistry and autotrophic communities in experimental hypertrophic shallow lake mesocosms. Journal of Applied Ecology. 46: 713-723. 2009.

GARBEY, C. Is P-content in plant tissues an efficient tool to determine the aquatic plant strategies along a resource gradient?, Freshwater Biology. 49: 346-356. 2004.

Global Invasive Species Database. 2016. National Biological Information Infrastructure (NBII) & IUCN SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). Petra Podraza, University of Duisburg-Essen, Germany. Downloaded from <http://www.iucngisd.org/gisd/search.php> on 01-07-2016.

HENDZEL, L. L., MATTHEWS, C. J. D., VENKITESWARAN J. J., V. L. St. LOUIS, D. BURTON, JOYCE, E. M., and BODALY, R. A. Nitrous oxide fluxes in three experimental boreal forest reservoirs, Environ. Sci. Technol., 39: 4353-4360. 2005.

HOLGERSON, M.A., Raymond, P. A. Large contribution to inland water CO₂ and CH₄ emissions from very small ponds. Nat Geosci 9: 222–226. 2016.

HUSSNER, A. NOBANIS. Invasive Alien Species Fact Sheet: *Azolla filiculoides*. From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS. www.nobanis.org, Date of access 01/07/2016. 2010.

HUSSNER, A. Alien aquatic plants in European countries. Weed Res. 52: 397–406. 2012.

HUTTUNEN, J.T., ALM, J., LIIKANEN, A., JUUTINEN, S., LARMOLA, T., HAMMAR, T., SILVOLA, J., MARTIKAINEN, P.J. Fluxes of methane, carbon dioxide and nitrous oxide in boreal lakes and potential anthropogenic effects on the aquatic greenhouse gas emissions. Chemosphere. 52: 609–621. 2003.

IPCC: Climate Change. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104. 2007.

JANSE, J. H., VAN LIER, L. Setting nutrient values for ditches using the eutrophication mode PCDitch. Aquatic Ecology. 41: 443-449. 2007.

JEPPESEN, E. The ecology of shallow lakes—trophic interactions in the pelagial. D.Sc. dissertation. Ministry of Environment and Energy, National Environmental Research Institute. 1998.

JEPPESEN, E., MOSS, B., BENNION, H., CARVALHO, L., DE MEESTER, L., FEUCHTMAYR, H., FRIBERG, N., GESSNER, M. O., HEFTING, M. and LAURIDSEN, T. Interaction of climate change and eutrophication. In: Kernan M, Battarbee RW, Moss B, editors. Climate change impacts on freshwater ecosystems. Chichester (UK): Wiley-Blackwell. 119–151. 2010.

KLAUSMEIER, C.A., LITCHMAN, DAUFRESNE, E. T. and LEVIN, S.A. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 429: 171–174. 2004.

KUIVILA, K.M., MURRAY, J.W., DEVOL, A.H., LINDSTROM, M.E. and REIMERS, C.E. Methane cycling in the sediments of Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* 33: 571 – 581. 1988.

LOMBARDI, J.E., EPP, M.A. and CHANTON, J.P. Investigation of the methylfluoride technique for determining rhizospheric methane oxidation. *Biogeochem* 36: 153–172. 1997.

LUMPKIN, T. A., PLUCKNETT, D. L. *Azolla*: Botany, physiology, and use as a green manure. *Economic Botany*, 34 (2): 111-153. 1980.

MADSEN, J.D. Predicting invasion success of Eurasian watermilfoil. *J.Aquat. Plant Manage.* 36: 28–32. 1998.

MENGIS, M., R. GACHTER, and B. WEHRLI. Sources and sinks of nitrous oxide (N₂O) in deep lakes, *Biogeochemistry*, 38(3): 281–301. 1997.

MOSS, B., KOSTEN, S, MEERHOFF, R.W. BATTARBEE, E. JEPPESEN, N. MAZZEO, K. HAVENS, G. LACEROT, Z. LIU, L. De MEESTER, H. PAERL and SCHEFFER, M. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters* 1: 101-105. 2011.

NICHOLS, S. A. and SHAW, B. Ecological life histories of three aquatic nuisance plants, *Myriophyllum spicatum*, *Potamogeton crispus*, and *Elodea canadensis*. *Hydrobiologia* 131: 3-21. 1986.

RUDD, J. W. M. and HAMILTON, R. D. Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. *Limnology and Oceanography*, 23: 337-348. 1978.

SEBACHER, D.I, HARRIS, R.C. and BARTLETT, K.B. Methane flux across the air-water interface: Air velocity effects. *Tellus*, 35B: 103-09. 1983.

SCHEFFER, M., A. H. BAKEMA, and WORTELBOER, F. G. MEGAPLANT—a simulation model of the dynamics of submerged plants. *Aquat. Bot.* 45: 341–356. 1993.

SCHEFFER, M., F. WESTLEY, and BROCK, W. Slow response of societies to new problems: causes and costs. *Ecosystems* 6: 493–502. 2003.

SMITH, R.C., AINLEY, D., BAKER, K., DOMACK, E., EMSLIE, S., FRASER, B., KENNETT, J., LEVENTER, A., MOSLEY-THOMPSON, E., STAMMERJOHN, S., and VERNET, M. Marine ecosystem sensitivity to climate change. *BioScience*, 49(5): 393–400. 1999.

SMITH, L. K., and LEWIS, W. M. Seasonality of methane emissions from five lakes and associated wetlands of the Colorado Rockies, *Global Biogeochem. Cycles*, 6: 323–338. 1992.

SORRELL, B. K., BRIX, H., BOON, P. I. Modeling of in situ oxygen transport and aerobic metabolism in the hydrophyte *Eleocharis sphacelata* R. Br. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biological Sciences* 102: 367–372. 1994.

SOUED, C., DEL GIORGIA, P. A., MARANGER, R. Nitrous Oxide sinks and emissions in boreal aquatic networks in Québec. *Nature Geoscience*, 9: 116–120. 2016.

STEIN, L. Y., ROY, R., and DUNFIELD, P. F. Aerobic methanotrophy and nitrification: processes and connections, in: *Encyclopedia of life sciences (eLS.)*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1–11. 2012.

STOW, C. A., WALKER, J. T., CARDOCH, L., SPENCE, P. and GERON, C. N₂O emissions from streams in the Neuse River watershed, North Carolina. *Environ. Sci. Technol.* 39. 2005.

STERNER, R. W. and ELSER, J. J. *Ecological Stoichiometry* (Princeton Univ. Press, Princeton). 2002.

VERAART, A. J., A. S. STEENBERGH, A. HO, S. Y. KIM, and BODELIER, P. L. E. Beyond nitrogen: the importance of phosphorus for CH₄ oxidation in soils and sediments. *Geoderma* 259: 337–346. 2015.

WAGNER, G. M. *Azolla: A review of its biology and utilization*. *The Botanical Review* 63(1): 1-26. 1997.

WATANABE, I., Liu, C. C. Improving nitrogen-fixing systems and integrating them into sustainable rice farming. *Plant Soil* 141: 57-67. 1992.

YOSHIDA, N., H. IGUCHI, H. YURIMOTO, A. MURAKAMI, and SAKAI, Y. Aquatic plant surface as a niche for methanotrophs. *Frontiers in microbiology* 5. 2014.