

Aurélio Fajar Tonetto

**Efeito das relações bióticas sobre o estabelecimento de
macroalgas de ecossistemas lóticos tropicais: interação com
microalgas e pressão por herbivoria**

**Rio Claro – SP
Setembro de 2014**

589.3 Tonetto, Aurélio Fajar
T664e Efeito das relações bióticas sobre o estabelecimento de
macroalgas de ecossistemas lóticos tropicais : interação com
microalgas e pressão por herbivoria : as relações bióticas
sobre o estabelecimento de macroalgas lóticas / Aurélio Fajar
Tonetto. - Rio Claro, 2014
80 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ciro Cesar Zaini Branco

1. Alga. 2. Algas bentônicas. 3. Interações bióticas. 4.
Competição. 5. Cooperação. 6. Herbívoros. I. Título.

Aurélio Fajar Tonetto

**Efeito das relações bióticas sobre o estabelecimento de
macroalgas de ecossistemas lóticos tropicais: interação com
microalgas e pressão por herbivoria**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (área: Biologia Vegetal)

Orientador: Prof^o. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco

Rio Claro – SP
Setembro de 2014

*“Se, a princípio, a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela”*

Albert Einstein

Agradecimentos

A princípio, acho que para todos que desenvolvem uma tese de mestrado ou doutorado o tema “Agradecimentos” deveria ser o mais fácil e tranquilo. Contudo, para mim foi relativamente difícil escrever esse tópico. A razão para tal dificuldade explica-se, felizmente, no imenso privilégio que tive de olhar para trás e não conseguir me lembrar tão facilmente de todas as pessoas que me ajudaram, uma vez que foram muitas que fizeram parte dessa história. Portanto, caso eu, eventualmente, deixe de citar alguém, deixo aqui meus mais sinceros agradecimentos a todos que estiveram presentes. Bom, quem me conhece bem sabe que esqueço um pouquinho as coisas.

Em primeiro lugar não poderia deixar de citar Tati, o amor da minha vida. Sem a presença dela as coisas não teriam sido as mesmas. Agradeço imensamente por fazer parte da minha vida e me mostrar todos os dias o quão gostoso é encontrar e poder estar ao lado da pessoa certa, e que isso traz um sentido incrível a vida, pois nada é mais gostoso do que sonhar e planejar as coisas juntos. Independentemente das dificuldades, ela me mostra que nada é mais importante do que o simples objetivo de estarmos juntos.

Agradeço a meus queridos pais por estarem incondicionalmente torcendo por mim. Agradeço todos os dias por ter pais como eles, que apesar da distância, estão sempre presentes em minha vida, me guiando e conduzindo. Uma vez li que “há mais dos nossos pais em nós do que imaginamos”. Para mim, ter apenas um pouquinho deles já seria incrível, pois seria uma alegria saber que tenho em mim as características de pessoas tão especiais.

Agradeço a meus queridos irmãos e respectivas famílias, Felipe, Tássia e Pietrinho, Lara e Marcel e, Aninha e Felipe Neves. Mais uma vez me considero uma pessoa privilegiada por ter irmãos como eles, por estarem sempre ao meu lado, torcendo por mim. Agradeço a todos os momentos juntos, que são tantos, pois sempre queremos estar juntos e curtindo uns aos outros. A saudade sempre esteve presente nesses longos anos distante, pois a alegre, divertida e amorosa companhia simplesmente fez muita falta.

Agradeço a meus incríveis amigos Dri, Guilherme (Quinzinho), Ro Primo, Reinaldo (El Mago), amigos de muitos anos que estiveram sempre comigo e participaram da minha história. Tenho muita alegria de ter encontrado essas amizades, pois, na verdade, hoje eles são parte da minha família, estando presentes sempre em todos os momentos importantes. Além disso, eles me mostraram que grandes amizades

continuam a crescer mesmo com longas distâncias. Podemos fazer muitas coisas ou simplesmente nada, e mesmo assim termos incríveis momentos juntos.

Agradeço imensamente ao grande Ciro Branco, ou como costume chamá-lo, Cirão. Agradeço por todos os momentos juntos e por ter sido além de um orientador, um grande amigo. Nossas conversas sempre foram além das orientações dos projetos e artigos, elas trouxeram ensinamentos que seguirei por toda minha vida. Sempre lembrarei de suas palavras e, mais uma vez, me considero uma pessoa de muita sorte por ter vivido minha experiência acadêmica ao lado deste grande amigo.

Agradeço muito a Carla Ferragut e Denise Bicudo, por estarem sempre disponíveis a me ajudar com o misterioso “mundo das microalgas do perifiton”. Sem a ajuda delas no planejamento inicial do projeto os resultados não teriam sido os mesmos. Obrigado por toda a disponibilidade. Sempre tentarei visitá-las no Instituto, cientificamente ou não, pois é sempre muito agradável estar entre vocês.

Agradeço a Thiago Rodrigues dos Santos (Instituto de Botânica) por ter me ajudado muito com o reconhecimento das microalgas. Sem a ajuda dele as identificações teriam sido muito mais difíceis e teriam levado muito mais tempo. Sem dizer que foi muito divertido sua companhia, com destaque da dificuldade de apontar, em um microscópio sem seta, o que era uma *Chromulina*. Além de Thiago no Instituto, agradeço muito a Barbara Golebski Pellegrini, que me explicou todo o procedimento de contagem das microalgas, desde o início com a sedimentação das amostras. Obrigado.

Agradeço imensamente a Priscila Izabel Tremarin pela incrível ajuda na confecção das lâminas e identificação das diatomáceas de todas as minhas amostras, além de ser uma pessoa extremamente simpática e divertida. Obrigado pelos momentos muito agradáveis que passamos em Curitiba no Laboratório da Professora Thelma Ludwig, a qual também agradeço muito pela disponibilidade em ceder o laboratório para as minhas atividades. Os momentos foram ainda melhores com Kaoli Cavalcante (eu sei que é com “e”) e Arielli Straube, os quais também ajudaram nas identificações e nas conversas descontraídas. E claro, agradeço a Eduardo e Isa, grandes amigos, que cederam sua casa para me acolher por mais de um mês. Casal encantador, que deveria ser exemplo para muitos.

Agradeço ao Professor Francisco Tanaka da USP-Esalq por ter esclarecido diversas dúvidas sobre a preparação das amostras para fotografia em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Agradeço muito a Bruno Crulhas, Thais Riolfi, Rafael Gandolfo, Régis de Campos e Gustavo Jerônimo por toda a ajuda nos trabalhos de campo ou confecção dos amostradores. Além disso, todos compõem grande amigos que fiz durante meus anos em Assis, e sei que essas amizades também cresceram muito. Agradeço em especial a Bruno e Thais, pois estiveram muito presentes durante meu projeto, são mais do que grandes amigos que levarei para toda a vida.

Agradeço a Ricardo Cardoso, Rhainer Guillermo, Marcos Carneiro, Kadu Ramalho e Marcos Knifes, amigos desde a graduação que permecem presentes em minha vida. Agradeço pelas interessantes discussões sobre artigos e pela incrível e especial companhia, além das palhaçadas que me divertem tanto. Todos são mais do que grandes amigos. Agradeço em especial a Kadu, por que mesmo estando distante sempre se fez presente, e fez de minhas estadias em Rio Claro muito mais divertidas e agradáveis na presença de um cara tão especial.

Agradeço em especial a Marcos Knifes e seus queridos pais, Zakk e Cristina, e irmã Livia, os quais me fizeram sentir parte de uma família. A atenção e todo o carinho que me deram é simplesmente imensurável. Muito obrigado por tudo.

Agradeço a Cleto Kaveski (lobisome do arvored), que mesmo após sua partida para outra cidade também fez parte crucial dessa jornada. É um grande amigo que me ensinou e continua me ensinando muito, principalmente com suas experiências e história de vida. Cleto é mais um irmão que fiz durante minha história. Obrigado por tudo.

Agradeço muito a Fapesp pela bolsa concedida (Processo 2010/17563-0). Sem seus recursos o projeto não teria sido finalizado. Além disso, a experiência de vida e científica que tive em estágio científico bancado pela Fapesp fora do Brasil foi muito importante.

Sumário

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1.....	18
RESUMO.....	19
1.1. INTRODUÇÃO.....	20
1.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
1.2.1. Área de estudo.....	22
1.2.2. Delineamento experimental.....	22
1.2.3. Análise dos dados.....	24
1.3. RESULTADOS.....	25
1.4. DISCUSSÃO.....	26
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
1.6. TABELAS E FIGURAS.....	34
CAPÍTULO 2.....	46
RESUMO.....	47
2.1. INTRODUÇÃO.....	48
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
2.2.1. Área de estudo.....	50
2.2.2. Delineamento experimental.....	50
2.2.3. Análises dos dados.....	52
2.3. RESULTADOS.....	52
2.4. DISCUSSÃO.....	53
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
2.6. TABELAS E FIGURAS.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
APÊNDICE A.....	68
APÊNDICE B.....	73

Resumo

As macroalgas lólicas têm sido consideradas, juntamente com perifiton, briófitas e macrófitas, um dos principais produtores primários de ambientes de riachos. Por essa razão, nas últimas décadas muitos trabalhos vêm sendo realizados na tentativa de entender-se a distribuição espaço-temporal desses organismos. A grande maioria desses trabalhos tem investigado exclusivamente os efeitos de variáveis ambientais sobre os padrões de distribuição ecológica das macroalgas de riachos. Entretanto, apenas a relação entre a ocorrência e distribuição desses organismos e as variações do ambiente tem demonstrado ser pouco preditiva em relação ao estabelecimento e manutenção das macroalgas nestes ecossistemas. Assim, parece claro que, além do mosaico dinâmico de condições ambientais, outras forças que atuam sobre estes organismos devem ser consideradas na análise de suas distribuições ecológicas. Neste sentido, é possível imaginar que as interações bióticas, em pequena escala, que ocorrem entre os organismos que coexistem em um mesmo trecho de riacho também possam interferir de maneira significativa nas respostas ecológicas desses organismos. As microalgas e macro-invertebrados herbívoros, por exemplo, são organismos que coexistem intimamente com as macroalgas e, portanto, devem possuir papel relevante na distribuição desses organismos no ambiente. De fato, alguns estudos têm sugerido que os fatores internos de uma comunidade parecem ser mais importantes para determinar as suas variações do que os fatores externos, pontuais ou sazonais, que atuam durante o período de colonização. Neste contexto, o presente estudo investigou as possíveis interações bióticas existentes entre as micro e macroalgas de riachos tropicais, através da condução de um estudo experimental. De forma mais específica, o primeiro objetivo foi avaliar a existência de competição ou cooperação entre as algas bentônicas (micro e macroalgas) ao longo de um processo de colonização em substratos artificiais. Em adição, procurou-se relacionar tais interações com a dinâmica de desenvolvimento das comunidades de algas bentônicas como um todo, a fim de esclarecer o sentido ecológico da, recorrentemente reportada, distribuição em mosaico das macroalgas. Além disso, também constituiu objetivo específico do presente estudo investigar os efeitos da atividade de herbívoros sobre as macroalgas, e como tais efeitos se relacionam com a distribuição em mosaico destas algas. Nossos resultados demonstram que as microalgas possuem relevante influência no estabelecimento das macroalgas em sistemas lólicos. De modo geral, as micro e macroalgas compõem a comunidade de algas bentônicas de

riachos, sendo as primeiras consideradas colonizadoras iniciais e as últimas colonizadoras tardias durante um processo de colonização. Assim, as manchas de macroalgas comumente reportadas em riachos representam, na verdade, estágios sucessionais tardios da comunidade de algas bentônicas e a ausência de macroalgas, em outras áreas do substrato, sugere que a comunidade ainda se encontra em estágios iniciais da colonização. Além disso, a pressão por herbivoria de gastrópodes raspadores influencia a trajetória da colonização das algas bentônicas de riachos. A raspagem da comunidade a mantém nos estágios iniciais de desenvolvimento, prevenindo, assim, o surgimento das macroalgas nos estágios mais tardios. Dessa forma, as manchas de macroalgas, novamente, representam momentos tardios da colonização. Assim, sugere-se que as comunidades de algas bentônicas de riachos possuem seu desenvolvimento direcionado pela interação entre micro e macroalgas, de modo a compor, na verdade, uma mesma comunidade de organismos em ambientes lóticos.

Palavras-chave: algas bentônicas, microalgas, macroalgas, perifíton, interações bióticas, competição, cooperação, herbivoria, substrato artificial, ambientes lóticos.

Abstract

The stream macroalgae have been considered, along with periphyton, bryophytes and macrophytes, one of the main primary producers in streams environments. For this reason, in recent decades many studies have been performed to understand the spatio-temporal distribution of these organisms. Most of these studies have only investigated the effects of environmental variables on patterns of ecological distribution of macroalgae streams. However, only the relationship between the occurrence and distribution of these organisms and the changes in environment has been shown to be poorly predictive in relation to the establishment and maintenance of macroalgae in these ecosystems. Thus, it seems clear that, beyond the dynamic mosaic of environmental conditions, other forces acting on these organisms should be considered in the analysis of their ecological distributions. In this sense, it is possible to imagine that biotic interactions on a small scale, that occur between coexistent organisms in the same stream stretch can also significantly influence on the ecological responses of these organisms. Microalgae and herbivorous, for example, are organisms that coexist intimately with macroalgae and therefore must have a relevant role in the distribution of these organisms in the environment. In fact, some studies have suggested that the internal factors of community seem to be more important in determining their variations than external, occasional or seasonal factors that act during the period of colonization. In this context, the present study investigated the possible existing biotic interactions between micro and macroalgae in tropical streams, by conducting an experimental study. More specifically, the first objective was to evaluate the existence of competition or cooperation between benthic algae (micro and macroalgae) over a process of colonization on artificial substrates. In addition, we tried to correlate these interactions with the dynamic development of benthic algal communities as a whole in order to clarify the ecological sense of recurrently reported, mosaic distribution of macroalgae. It also constituted specific objective of the present study to investigate the effects of herbivorous activity on macroalgae, and how these effects are relate to the patchy distribution of these algae. Our results demonstrate that microalgae have significant influence in the establishment of macroalgae in lotic systems. In general, micro and macroalgae comprise the community of benthic algae in streams. The former is considered initial colonizers and the latter the late colonizers during the colonization process. Thus, patches of macroalgae commonly reported in streams represent, in fact,

late successional stages of benthic algae community and the absence of macroalgae in other areas of the substrate, suggesting that the community is still in the earlier colonization stages. Furthermore, the herbivory pressure by scrapers influence the trajectory of the benthic algae colonization in streams. The scraping of the community keep it in the earlier development stages, thus preventing the appearance of macroalgae in the later stages. Thus, patches of macroalgae, again, represent late stages of colonization. Hence, it is suggested that benthic algal communities in streams have their development driven by the interaction between micro and macroalgae, in order to compose the same community of organisms in lotic environments.

Keywords: benthic algae, microalgae, macroalgae, periphyton, biotic interactions, competition, cooperation, herbivory, artificial substrates, lotic systems.

Introdução Geral

Ambientes lóticos possuem características específicas que garantem a existência de um ecossistema extremamente particular (Allan & Castillo, 2007; Tokeshi & Arakaki, 2012). Rios e riachos fornecem diversos tipos de habitats para os organismos aquáticos, diferentemente de outros corpos d'água, pois estão sujeitos a modificações estruturais ao longo de seu percurso, o que conseqüentemente provoca variações nas propriedades físicas e químicas do ambiente (Townsend & Hildrew, 1994). A grande movimentação da água dificulta a ocorrência de organismos tipicamente planctônicos (Reynolds & Lund, 1988) de modo a favorecer o estabelecimento de uma comunidade bentônica mais desenvolvida.

Os produtores primários observados nas comunidades bentônicas desses ambientes incluem, principalmente, representantes do grupo das cianobactérias, das algas eucarióticas e das embriófitas, exceto gimnospermas. Além disso, algumas outras bactérias e protistas também possuem importante papel como autótrofos em águas correntes (Allan & Castillo, 2007).

Considerando em particular os produtores primários bentônicos, o componente ficológico tem sido amplamente descrito como um dos principais elementos de sustentação da teia trófica desses ambientes (Lamberti, 1996), uma vez que todos os substratos que estejam recebendo luz podem, potencialmente, suportar o crescimento de uma comunidade de algas bentônicas (Allan & Castillo, 2007). Entretanto, essa comunidade ficológica pode estabelecer-se sob diferentes formas e arranjos. Em 1924, Behning utilizou pela primeira vez o termo perifiton para se referir aos organismos aderidos a substratos artificiais submersos na água. Após a sua proposição, o termo recebeu várias outras propostas de definições (e.g., Sládecková, 1962; Round, 1964), mas, somente em 1983, Robert Wetzel destacou algumas características diagnósticas a esse grupo de organismos de modo a compor uma definição amplamente aceita pela comunidade científica até os dias atuais. Para Wetzel (1983), perifiton é “*uma complexa comunidade de microrganismos (algas, bactérias, fungos e animais), detritos orgânicos e inorgânicos aderidos a substratos inorgânicos ou orgânicos vivos ou mortos*”.

Contudo, há uma importante porção da flora algal bentônica que não se enquadra na definição de perifiton (*sensu* Wetzel, 1983), uma vez que é constituída por espécies que apresentam crescimento macroscópico evidente; ou seja, são visíveis e reconhecíveis em campo a olho nu (John & Moore, 1985; Sheath *et al.*, 1989). Esse

componente algal das comunidades bentônicas tem sido reportado como macroalgas lólicas, como proposto por Sheath & Cole (1992). Segundo esses autores o termo macroalgas é definido da seguinte forma: “*Tipicamente, macroalgas de riachos são bentônicas e formam um talo maduro que é uma estrutura discreta e reconhecível a olho nu; a identificação microscópica é geralmente necessária e, freqüentemente, microalgas estão associadas ao talo*”.

As assembleias de macroalgas lólicas e suas respostas ecológicas vêm sendo estudadas sob diversas abordagens científicas na tentativa de encontrar padrões relacionados à sua ocorrência, já que tais assembleias têm sido retratadas como altamente relevantes na produção primária de rios e riachos (Giller & Malmqvist, 1998; Dell’Uomo, 1991). De fato, diversos trabalhos (Sheath & Burkholder, 1985; Necchi & Pascoaloto, 1993; Necchi *et al.*, 2003; Branco *et al.*, 2008; 2009) estudaram a relação entre os padrões de distribuição espaço-temporal dessas algas com as variáveis físicas e químicas do ambiente. Nesse sentido, a abundância e a riqueza de espécies de macroalgas lólicas têm sido relacionadas, por exemplo, com a temperatura da água (Necchi & Pascoaloto, 1993; Branco & Necchi, 1996), a turbidez (Necchi & Pascoaloto, 1993; Branco & Necchi, 2003), o tipo de substrato (Sheath *et al.*, 1989; Pfister, 1993), a condutividade específica (Sherwood & Sheath, 1999), o oxigênio dissolvido (Necchi & Pascoaloto, 1993; Foerster *et al.*, 2004), o sombreamento (Sheath *et al.*, 1986; Necchi *et al.*, 2003), a profundidade (Necchi *et al.*, 2003; Pfister, 1993; Sherwood & Sheath, 1999), a velocidade da correnteza (Sherwood & Sheath, 1999) e os nutrientes dissolvidos (Leukart, 1995; Foerster *et al.*, 2004).

Além disso, trabalhos abordando aspectos ecofisiológicos das macroalgas (Falkowski & LaRoche, 1991; Necchi, 2004) têm auxiliado na compreensão das respostas desses organismos frente às variáveis ambientais. Tais estudos têm sugerido uma série de variáveis que presumivelmente favoreceriam a ocorrência de representantes das macroalgas em uma determinada condição ambiental.

Entretanto, há extenso registro de uma recorrente falta de relação direta e evidente entre as macroalgas e as variáveis ambientais que, de modo geral, são comumente utilizadas em estudos ecológicos e/ou ecofisiológicos (Krupek *et al.*, 2007; Branco *et al.*, 2009). Peres *et al.* (2009), por exemplo, sugerem que as variáveis físicas e químicas mensuradas nos riachos da Serra da Prata, Estado do Paraná, foram pouco representativas para explicar o padrão de distribuição espacial das macroalgas na região de estudo. Do mesmo modo, trabalhos que investigaram a distribuição ecológica de

macroalgas em regiões geográficas amplas (e.g.: Krupek *et al.*, 2007; Branco *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2009) mostraram que a ocorrência de macroalgas talvez seja um evento amplamente aleatório, sugerindo que tais organismos parecem responder mais fortemente às variações do dinâmico mosaico de condições ambientais em escala local (nível de micro-habitat) que em escalas regionais. Além disso, preferências espécies-específicas a determinadas variações ambientais registradas em trabalhos ecofisiológicos (com variáveis ambientais testadas isoladamente) não são, muitas vezes, observadas em condições consideradas ideais para a ocorrência de macroalgas. Dessa forma, é possível perceber que a falta de reconhecimento de padrões regulares e consistentes na ocorrência das macroalgas lólicas também pode estar relacionada com uma certa limitação no enfoque das pesquisas ecológicas que têm sido conduzidas sobre esses organismos.

Nesse contexto, algumas questões fundamentais sobre a ecologia das macroalgas lólicas merecem ser destacadas. Será que a suposta falta de padrões capazes de descrever a ocorrência das macroalgas lólicas não é, na verdade, o reflexo de escassas informações sobre as interações biológicas às quais esses organismos podem estar sendo submetidos? Será que o conhecimento dos processos biológicos interativos entre as macroalgas e organismos coexistentes poderiam adicionar informações relevantes e esclarecedoras, ajudando a compreender o que tem sido registrado em campo? A partir de reflexões dessa natureza, fica evidente que investigações ecológicas com uma abordagem voltada para as relações bióticas poderiam revelar, por exemplo, o grau de influência direta dessas interações sobre a distribuição das macroalgas de riachos; ou, então, se as variações ambientais atuam indiretamente, influenciando mais propriamente a relação biótica do que as macroalgas isoladamente.

De fato, alguns estudos têm sugerido que as comunidades de algas bentônicas de riachos, ao contrário das explicações mais comuns, devem ser reguladas mais fortemente pelas relações biológicas do que primariamente por fatores abióticos (Feminella & Hawkins, 1995). Uma vez que as microalgas (perifiton – *sensu* Wetzel, 1983) e as macroalgas (*sensu* Sheath & Cole, 1992) coexistem na comunidade de algas bentônicas de ambientes lólicos, torna-se inevitável a sobreposição delas e, assim, perfeitamente compreensível que os limites entre os componentes micro e macroscópico sejam extremamente difíceis de estabelecerem-se. Entretanto, mesmo sem nenhuma separação espacial evidente, esses organismos são estudados de maneira isolada. Em regra, os trabalhos envolvendo a investigação de macroalgas (Sheath & Burlholder,

1985; Krupek & Branco, 2014) não consideram as microalgas em suas análises, da mesma forma que trabalhos sobre a comunidade perifítica (Cardinale *et al.*, 2006) deixam de incorporar a porção de algas tipicamente macroscópicas. Porém, a coexistência desses componentes seguramente proporciona a emergência de processos interativos entre eles, e esta relação pode trazer importantes respostas que auxiliem no esclarecimento dos mecanismos de distribuição das macroalgas em sistemas lóticos.

Da mesma forma que as microalgas, os macro-invertebrados também compõem as comunidades bentônicas de rios e riachos (Allan & Castillo, 2007). Uma vez que muitos desses organismos são consumidores primários, as comunidades de algas bentônicas podem sofrer relevantes alterações em função da pressão de consumo exercida sobre elas (Alvarez & Peckarsky, 2014). Por exemplo, os raspadores aquáticos selecionam as algas de acordo com seu tamanho, forma de crescimento e grau de fixação no substrato (Tall *et al.*, 2006). Nesse contexto, a intensidade, a frequência e a natureza da herbivoria exercida sobre a comunidade de algas bentônicas de riachos devem influenciar os padrões de distribuição espacial das micro e macroalgas.

Assim, a presente tese foi conduzida a fim de avaliar a influência de possíveis interações biológicas entre (i) macroalgas e microalgas e (ii) macroalgas, microalgas e herbívoros. Espera-se que o aumento da compreensão dessas relações possa, potencialmente, esclarecer alguns dos mecanismos que determinam a distribuição das macroalgas em ambientes lóticos. No Capítulo 1 serão abordadas as relações entre as macro e microalgas, enquanto que no Capítulo 2 serão abordadas essas mesmas relações com a adição dos efeitos da herbivoria.

Referências Bibliográficas

- Allan DJ. 1995. *Stream Ecology: structures and functions of running waters*. London: Chapman & Hall, 388p.
- Allan JD & Castillo MM. 2007. *Stream Ecology: structure and functions of running waters*. 2ª edition. Springer, Dordrecht.
- Branco CCZ & Necchi OJr. 1996. Survey of stream macroalgae of eastern Atlantic Rainforest of São Paulo State, southeastern Brazil. *Arch. Hydrobiol.* 80: 35-57.
- Branco CCZ & Necchi OJr. 2003. Temporal dynamics of two species of Chaetophoraceae (Chlorophyta) in tropical streams of São Paulo State, southeastern Brazil. *Rev. Brasil. Bot.* 26(2): 151-161.

- Branco CCZ, Krupek RA & Peres CK. 2009. Distribution of stream macroalgal communities from the mid-western region of Paraná state, southern Brazil: importance of local scale variation. *Braz. J. Biol. Technol.* 52(2): 379-386.
- Cardinale BJ, Hillebrand H & Donald FC. 2006. Geographic patterns of diversity in streams are predicted by a multivariate model of disturbance and productivity. *J. Ecol.* 94(3): 609-618.
- Esteves FA. 1988. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Editora Interciência/FINEP, 575p.
- Falkowski PG & Laroche J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27: 8-14.
- Feminella JW & Hawkins CP. 1995. Interactions between stream herbivores and periphyton: a quantitative analysis of past experiments. *J. N. A., Benthol. Soc.* 14(4): 465-509.
- Foerster J, Gutowski A & Vis ML. 2004. Defining types of running waters in Germany using benthic algae: A prerequisite for monitoring according to the Water Framework Directive. *J. Appl. Phycol.* 16: 407-418.
- Giller PS & Malmqvist B. 1998. *The Biology of stream and rivers: biology of habitat*. Oxford: Oxford University Press, 296p.
- John DM & Moore JA. 1985. Observations on the phytobenthos of freshwater Thames II. The floristic composition and distribution of the smaller algae sample using artificial surfaces. *Arch. Hydrobiol.* 103(1): 83-97.
- Krupek RA & Branco CCZ. 2014. Estrutura das comunidades de macroalgas da bacia de drenagem do rio Cascavel, Estado do Paraná, Brasil. *Hoehnea* 41(1): 41-50.
- Krupek RA, Branco CCZ & Peres CK. 2007. Distribuição ecológica das comunidades de macroalgas da bacia de drenagem do Rio das Pedras, região Centro-Sul do estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 30: 173-182.
- Lambert GA. 1996. The role of periphyton in benthic food webs. In: Stevenson RJ, Bothwell M & Lowe RL. (Ed) *Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems*. San Diego: Academic Press, p. 533-564.
- Leukart P & Hanelt D. 1995. Light requirements for photosynthesis and growth in several macroalgae from a small soft-water stream in the Spessart Mountains, Germany. *Phycologia*. 34: 528-532.

- Necchi OJr & Pascoaloto D. 1993. Seasonal dynamics of macroalgal communities in the Preto River basin, Sao Paulo, southeastern Brazil. *Arch. Hydrobiol.* 129: 231-252.
- Necchi OJr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia.* 525: 139-155.
- Necchi OJr, Branco LHZ & Branco CCZ. 2003. Ecological distribution of stream macroalgal communities from a drainage basin in the Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 63: 635-646.
- Peres CK, Branco CCZ & Krupek RA. 2009. Distribuição ambiental e temporal das comunidades de macroalgas de riachos da Serra da Prata, Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 32: 625-633.
- Pfister P. 1993. Seasonality of macroalgal distribution pattern within the reach of a gravel stream (Isar, Tyrol, Austria). *Arch. Hydrobiol.* 129: 89-107.
- Reynolds CS & Lund JWG. 1988. The phytoplankton of an enriched, soft-water lake subject to intermittent hydraulic flushing (Grasmere, English Lake District). *Freshwat. Biol.* 19: 379-404.
- Sheath RG & Burkholder JM. 1985. Characteristics of softwater streams in Rhode Island II. Composition and seasonal dynamics of macroalgal communities. *Hydrobiologia.* 28:109-118.
- Sheath RG & Cole KM. 1992. Biogeography of stream macroalgal in North America. *J. Phycol.* 28: 448-460.
- Sheath RG, Morinson MO, Korch JE, Kaczmarezyk D & Cole KM. 1986. Distribution of stream macroalgae in south-central Alaska. *Hydrobiologia.* 135: 259-269.
- Sheath RG, Hamilton PB, Hambrook JA & COLE KM. 1989. Stream macroalgae of eastern boreal forest region of North America. *Can. J. Bot.* 67: 3553-3562.
- Sherwood AR & Sheath RG. 1999. Seasonality of macroalgae and epilithic diatoms in spring-fed streams in Texas, U.S.A. *Hydrobiologia.* 390: 73-82.
- Tokeshi M & Arakaki S. 2012. Habitat complexity in aquatic systems: fractals and beyond. *Hydrobiologia.* 685: 27-47.
- Townsend CR & Hildrew AG. 1994. Species traits in relation to a habitat template for river systems. *Fresh. Biol.* 31: 265-275.
- Wetzel RG. 1983. Periphyton of freshwater ecosystems developments. The Hague. Dr. W. Junk publishers. 364p. (*Hydrobiology* 17).

Capítulo 1

*Análise experimental das relações
biológicas entre micro e macroalgas de
ecossistemas lóticos tropicais: cooperação
ou competição?*

Resumo

Em uma comunidade, a coexistência dos organismos conduz necessariamente a interações ecológicas entre os indivíduos presentes. Em ambientes lóticos, os substratos são compostos por uma rica comunidade de organismos, entre os quais as algas representam um dos grupos mais diversos. Várias formas de crescimento podem ser observadas entre as espécies de algas, desde microscópicas (microalgas), consideradas como parte do perifiton, até aquelas reconhecíveis a olho nu, reportadas tradicionalmente como macroalgas. Entretanto, apesar da íntima coexistência entre micro e macroalgas nas comunidades de algas bentônicas, ainda não se conhece minimamente as possíveis interações entre elas e a relação dessas interações com a distribuição espaço-temporal desses organismos. Sendo assim, um estudo experimental foi realizado com o objetivo de analisar-se as possíveis interações entre micro e macroalgas de riachos. Substratos artificiais foram instalados em dois grupos de riachos: (i) com ausência de macroalgas (Grupo 1) e (ii) com presença desses organismos (Grupo 2). A riqueza e abundância (densidade) de microalgas foram investigadas nos riachos dos Grupos 1 e 2 com o objetivo de verificar-se se há influência direta das variações das assembleias de microalgas sobre as variações das macroalgas (densidade e porcentagem de cobertura) nos ambientes de riachos. Nossos resultados demonstram que as microalgas possuem relevante influência no estabelecimento das macroalgas em sistemas lóticos. De modo geral, as microalgas proporcionaram condições que favoreceram o surgimento das macroalgas. Essas últimas, por sua vez, após seu crescimento, aparentemente, também criam condições que favorecem as microalgas subjacentes. Sugere-se, então, que as comunidades de algas bentônicas de riachos possuem desenvolvimento fortemente influenciado por uma relação de cooperação entre micro e macroalgas que, em última análise, representam estágios sucessionais distintos. Neste contexto, as microalgas respondem como colonizadoras iniciais em uma comunidade de algas bentônicas lóticas, enquanto as macroalgas como as colonizadoras tardias de uma mesma comunidade.

Palavras-chave: interações bióticas, cooperação, microalgas, macroalgas, riachos.

1.1. Introdução

Compreender a estrutura das assembleias de organismos é um dos principais objetivos dos estudos ecológicos. Detectar padrões na estrutura das assembleias, no espaço e no tempo, pode proporcionar a observação dos processos que conduzem ao desenvolvimento das comunidades (Horner-Devine *et al.*, 2007). Alguns estudos têm indicado que processos determinísticos são importantes para o desenvolvimento das assembleias e coexistência de organismos (Gotelli & McCabe, 2002). Por exemplo, os padrões ecológicos de micro e macrorganismos têm sido investigados na tentativa de encontrarem-se similaridades e/ou diferenças entre esses tipos de comunidades (Green & Bohannan, 2006; Martiny *et al.*, 2006). Em sistemas de riachos, por exemplo, micro e macrorganismos convivem intensamente, mas, atualmente, ainda não está claro como a coexistência desses organismos ocorre efetivamente (Horner-Devine *et al.*, 2007).

As algas bentônicas de sistemas lóticos têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas. Alguns trabalhos têm propostos modelos funcionais na tentativa de associarem-se traços ecológicos particulares de determinados táxons com as condições do ambiente que habitam (Steinman *et al.*, 1992; Biggs *et al.*, 1998). Em resumo, tais modelagens classificam os organismos de acordo com suas estratégias de crescimento, morfologia e reprodução diante de diferentes níveis de distúrbio e suprimento de recursos (Biggs, 1996). Como rios e riachos podem sofrer alterações em função do tempo (Biggs *et al.*, 1998), a capacidade peculiar desses grupos funcionais de persistirem às mudanças ambientais e, conseqüentemente, interagirem entre si, pode influenciar de maneira relevante a trajetória de colonização e a estruturação dessas comunidades. Nesse contexto, as algas representam um importante grupo de organismos para se investigar as interações ecológicas, uma vez que apresentam uma grande diversidade de espécies, variando desde táxons microscópicos até filamentosos longos e pseudoparenquimatosos. Tal variação morfológica pode refletir em diferentes estratégias de sobrevivência (Biggs *et al.*, 1998; Horner-Devine *et al.*, 2007).

Entretanto, micro e macroalgas de ambientes lóticos, apesar de intimamente associadas no habitat, são tradicionalmente estudadas de forma isolada. Nesse contexto, os padrões de distribuição espacial das macroalgas, por exemplo, têm sido investigados através da relação entre as variáveis ambientais e seus padrões de ocorrência, sem levar em consideração as microalgas associadas (Sheath & Cole, 1992; Krupek & Branco, 2014). Porém, estudos recentes têm mostrado que os fatores abióticos pouco predizem a

ocorrência desses organismos no ambiente (Branco *et al.* 2009; Peres *et al.*, 2009). Branco *et al.* (2014) averiguaram que a contribuição ambiental para explicar a variação da composição das assembleias de macroalgas de 105 riachos da região sul do Brasil, apesar de significativa, foi de apenas 5,7% e que aproximadamente 90% da variação desses organismos não pôde ser explicada pelas variações ambientais, espaciais ou mesmo a soma delas. Dessa forma, o trabalho sugere, dentre outros fatores, que a ausência das interações bióticas nas análises pode ter contribuído para essa grande fração inexplicável dos resultados. Além disso, os fatores internos de uma comunidade parecem ser mais importantes para as variações dessa do que os fatores externos sazonais durante um período de colonização (McCormick & Stevenson, 1991).

Por conseguinte, as assembleias bentônicas de microalgas que coexistem com as macroalgas em rios e riachos podem possuir algum papel no seu desenvolvimento. A coexistência entre esses organismos pode ser estabelecida através das diferentes habilidades para adquirir um determinado recurso, em virtude de adaptações e/ou restrições fisiológicas ou morfológicas (McCormick, 1996; Roxburg *et al.*, 2004). Nesse contexto, o tamanho algal apresenta papel fundamental para sua ecologia, uma vez que pode estar associado com capacidades morfo-funcionais diferentes na captura de recursos, absorção de luz e taxas de crescimento (Hein *et al.*, 1995). Hoagland *et al.* (1982) sugerem ainda que a mobilidade espacial de micro (*e.g.*, diatomáceas) e macroalgas (*e.g.*, algas verdes filamentosas) permite a elas competirem efetivamente por diferentes recursos. Contudo, apesar da coexistência e particularidades ecológicas intrínsecas às formas de crescimento micro e macroscópicas, nenhum trabalho abordou conjuntamente esses organismos no sentido de investigar se possíveis interações influenciam a dinâmica espaço-temporal de ambos os tipos de crescimento em ambientes lóticos.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar o processo de colonização das algas bentônicas desde o estabelecimento das microalgas até o surgimento das macroalgas, a fim de reconhecer e compreender as possíveis interações bióticas durante a estruturação da comunidade. Devido às possíveis diferenças morfo-funcionais desses componentes, principalmente relacionadas ao tamanho (Biggs *et al.*, 1998), esperava-se que a maior abundância de um resultasse na redução do outro e vice-versa, caracterizando-se uma dinâmica de comunidade mediada pela competição.

1.2. Materiais e Métodos

1.2.1. Área de estudo

As investigações sobre as interações entre as assembleias de micro e macroalgas de ambientes lóticos foram realizadas em nove riachos naturais de 2ª e 3ª ordens, com substrato predominantemente rochoso e altos níveis de irradiância (ambientes abertos, segundo DeNicola & Hoagland 1996). Os ambientes estão localizados na Bacia do Rio do Cervo, região Centro-Oeste do Estado de São Paulo. A Bacia do Rio do Cervo possui um relevo relativamente plano, com altitude variando de 500 a 580 metros, e clima tropical com um verão chuvoso e um inverno seco (Max *et al.* 2003). A flora original da região era formada por Cerrado em ecótono com a floresta estacional semidecidual, porém, parte desta formação vegetal natural têm sido progressivamente devastada e substituída por culturas agrícolas (*e.g.*, cana-de açúcar e soja) e plantações de *Pinus* sp. e *Eucaliptus* sp. (Max *et al.* 2003). A Figura 1 ilustra a localização dos pontos utilizados durante o experimento.

Em todos os riachos utilizados, foi observada a presença de microalgas nos substratos naturais. Por outro lado, dois grupos de riachos se formaram quanto à presença de macroalgas: em um dos grupos de riachos foi verificada a evidente presença de macroalgas nos substratos naturais, enquanto que no outro a ocorrência desses organismos foi apenas ocasional e, quando presentes, em baixíssimas abundâncias. Essa estratégia amostral permitiu investigar se as variações de ocorrência das macroalgas nos diferentes ambientes estão, ou não, relacionadas com a presença das microalgas. A Tabela 1 ilustra os dois grupos de riachos quanto a densidade máxima de macroalgas em cada riacho. O grupo 1 foi representado por riachos com valores abaixo de 111 indivíduos enquanto o grupo 2 riachos com valores acima de 262 indivíduos.

1.2.2. Delineamento experimental

O experimento foi realizado com uso de substratos artificiais (lâminas de vidro) (Branco *et al.*, 2010). Em cada riacho foram instaladas 100 lâminas de vidro (75x25 mm) presas horizontalmente em uma base de madeira associada a placas de concreto com aproximadamente 17 kg (ver descrição dos amostradores no Apêndice A1). O estudo experimental ocorreu durante as estações de outono-inverno, período na qual as precipitações são menos frequentes em regiões tropicais (Branco & Necchi, 1997;

Branco *et al.*, 2009; Tonetto *et al.*, 2014). Dessa forma, os impactos consequentes dos eventos de chuvas seriam reduzidos durante o processo de colonização das comunidades.

O acompanhamento temporal foi realizado por um período de 75 dias (Branco *et al.*, 2010), com as lâminas sendo retiradas em intervalos de quatro a cinco dias, totalizando 16 amostragens durante o período de experimentação. A determinação da ordem das lâminas a serem removidas foi feita de forma randômica. Durante as amostragens, três lâminas foram coletadas para análise da estrutura das comunidades, sendo essas destinadas à estimativa da riqueza de espécies (fixadas em formol 4%), à mensuração da densidade de espécies e ao registro de imagens fotográficas com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (as duas últimas preservadas em lugol acético 0,5%). As lâminas destinadas às análises com MEV tiveram como objetivo registrar as características da arquitetura das comunidades. É importante explicar que durante as amostragens foram anotadas as ocorrências das macroalgas, segundo a definição do termo como proposto por Sheath & Cole (1992), e fotomicrografias digitais foram registradas para mensuração da porcentagem de cobertura das macroalgas.

Durante o procedimento de determinação da densidade de espécies, os táxons comumente reportados como macroscópicos (geralmente espécies filamentosas) foram tratados separadamente, a fim de se obter os valores de densidade das microalgas e das macroalgas individualmente. O método para determinação da densidade das espécies utilizou a contagem dos indivíduos tanto microscópicos como macroscópicos, seguindo os trabalhos de Utermöhl (1958) e Lund *et al.* (1958), enquanto que a identificação das espécies abundantes, tratadas como aquelas com densidade superior a densidade média de toda a comunidade (Lobo & Leighton, 1986) foi realizada através de literatura especializada. A varredura em microscópio eletrônico foi conduzida após desidratação total das amostras em concentrações crescentes de acetona e ponto crítico do CO₂ (equipamento CPD 030 Balzers). Após a metalização, as amostras foram levadas ao microscópio LEO435-VP para os registros fotográficos. A porcentagem de cobertura das macroalgas foi medida no *software* AutoCad® (comumente utilizado em trabalhos de engenharia), o qual permite medir a área ocupada por esses organismos nas imagens digitais (Tonetto *et al.*, 2012). Os Apêndices B1.1, 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5 descrevem detalhadamente as técnicas utilizadas para mensuração das variáveis bióticas da comunidade de algas bentônicas estudadas.

Além dos dados biológicos, as seguintes variáveis físicas e químicas da água foram mensuradas no próprio riacho a cada evento de retirada das lâminas: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, potencial de oxido redução e turbidez. Todas essas medições foram realizadas com o auxílio de um controlador de qualidade da água, marca Horiba, modelo U-52, equipado com sonda multi-parâmetros. Além dessas variáveis, também foi mensurada a velocidade da correnteza, utilizando-se um correntômetro eletrônico Swoffer 3000. Por fim, em cada ponto, uma amostra de 500 mL de água do próprio riacho foi coletada para a quantificação de nitrogênio e fósforo totais através da utilização de um espectrofotômetro Spectroquant Nova 60 e reagentes específicos. A Tabela 2 sumariza as variáveis físicas e químicas de cada um dos riachos examinados.

1.2.3. Análise dos dados

De modo geral, ambientes lóticos são tipicamente caracterizados por uma acentuada heterogeneidade ambiental. A fim de controlar-se tal heterogeneidade foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (Sokal & Rohlf, 2000; Gotelli & Ellison, 2004), muito aplicado em experimentos ecológicos envolvendo ambientes com esse tipo de característica (*e.g.*, Usio & Townsend, 2004; Bechara *et al.*, 2007; Landeiro *et al.*, 2008; Tonetto *et al.*, 2012; Tonetto *et al.*, 2014).

As análises estatísticas foram realizadas com base nos grupos de riachos 1 e 2 (Tabela 1, baseada na densidade máxima de macroalgas em cada riacho). Neste contexto, os valores de densidade e riqueza das microalgas foram submetidos a uma ANOVA em blocos com medidas repetidas para investigar as diferenças de colonização das macroalgas entre esses grupos de riachos.

Além disso, uma análise de componentes principais foi utilizada para reduzir a dimensionalidade das variáveis ambientais e sumarizá-las adequadamente. Essa análise foi conduzida para a caracterização dos riachos de acordo com as variáveis ambientais observadas durante o período experimental. Por fim, utilizamos uma análise de regressão parcial múltipla (análise de redundância parcial, pRDA) com o objetivo de particionar os efeitos específicos do ambiente e das microalgas (densidade) sobre a abundância de macroalgas (Branco *et al.*, 2014). Na pRDA as frações analisadas foram as seguintes: componente ambiental [A], componente microalgal [Micro], componente ambiental independente do microalgal [A|Micro], componente microalgal independente

do ambiental [Micro|A], componente ambiental inseparável do microalgal [A+Micro] e componente não explicado [R]. A contribuição e a significância de cada fração foram verificadas pelos valores de R^2 ajustado e valores de $p < 0,05$, respectivamente (Legendre & Legendre, 1998; Peres-Neto *et al.*, 2006, Branco *et al.*, 2014). Para determinar quais variáveis ambientais seriam usadas nas análises fizemos uma seleção (“*forward selection*”) por permutação de resíduos em nível de significância de 5%.

As análises foram realizadas com os programas Statistica 6.0 e NTSys. Além disso, o ambiente computacional R, versão 2.13 (R-Development-Core-Team, 2011), foi utilizado para a condução da pRDA, com a aplicação de pacotes estatísticos associados: „*packfor*” (Dray *et al.*, 2009) para a seleção das variáveis ambientais e „*yegan*” (Oksanen *et al.*, 2011) para a RDA e partição da variância.

1.3. Resultados

A Tabela 3 mostra a lista das espécies abundantes encontradas nos riachos estudados, com clara dominância das diatomáceas.

O resultado da ANOVA-medidas repetidas mostrou que o Grupo 1 apresentou densidade de microalgas significativamente menor do que os riachos do Grupo 2 ($F = 54,75$; $p < 0,001$, Figura 2). Os valores da densidade das microalgas variaram de aproximadamente 100 a 2400 indivíduos nos riachos do Grupo 1, enquanto que o Grupo 2 variou de 100 a 5000 indivíduos. Assim, os riachos com maior número de macroalgas (Grupo 2) registraram também densidade de microalgas mais elevada do que os riachos com menor densidade de macroalgas (Grupo 1). A ANOVA mostrou resultado similar para a porcentagem de macroalgas ($F = 2,18$; $p < 0,05$, Figura 3). Quando considerada a riqueza das espécies de microalgas, a ANOVA não revelou diferenças significativas entre os grupos de riachos 1 e 2, ($F = 0,58$; $p > 0,05$, Figura 4). As fotografias registradas em MEV para um representante de cada grupo (Rio 2, Grupo 1; Rio 5, Grupo 2) mostraram que o acúmulo de microalgas (principalmente diatomáceas) foi muito mais intenso no riacho do Grupo 2, de modo que as superfícies das amostras do riacho do Grupo 1 apresentaram-se pronunciadamente mais homogêneas (Figuras 5 e 6).

Ao longo do processo de colonização, as macroalgas apresentaram o primeiro registro apenas no 30º dia de colonização, porém para apenas os riachos do Grupo 2. A partir dessa data foi possível observar um claro e generalizado aumento na presença dessas algas, sendo que no último dia de colonização (75º dia) todos os riachos de

ambos os grupos registraram as suas ocorrências. Vale ressaltar que nos riachos do Grupo 1 (2, 7 e 8), as macroalgas foram registradas somente em datas já próximas ao final do período experimental. No ponto 7, por exemplo, foi registrada pela primeira vez no 55º dia de colonização, enquanto que nos pontos 8 e 2, esse registro ocorreu apenas nos 65º e 70º dias, respectivamente.

O eixo 1 da PCA explicou 39,4% da distribuição dos pontos estudados (Figura 7). Os riachos 4, 5 e 6, pertencentes ao Grupo 2, apresentaram uma relação positiva com nitrogênio e fósforo e negativa com velocidade da correnteza, enquanto os riachos 1, 2, 3, 7, 8 e 9 pertencentes ao Grupo 1 (exceto o riacho 1) revelaram uma relação contrária com tais variáveis. Os resultados da pRDA (Figura 8) revelaram que as variáveis ambientais somadas aos efeitos da densidade das microalgas explicaram 25% da variação das macroalgas. Os fatores ambientais sozinhos explicaram 10,2% (R^2 ajustado de 0,102; $p < 0,01$), enquanto que as microalgas explicaram 4,75% (R^2 ajustado de 0,475; $p < 0,01$).

1.4. Discussão

Os resultados demonstraram que as assembleias de micro e macroalgas apresentaram forte relação durante um processo de colonização. O surgimento das macroalgas esteve intimamente associado com a presença estabelecida de microalgas no substrato. Embora a literatura sugira um efeito negativo da coexistência de espécies devido à competição por recursos (McCormick, 1996; Biggs *et al.*, 1998), nossos dados sugerem que as microalgas podem, ao contrário, cooperar com o surgimento das macroalgas.

Durante um processo de colonização, o primeiro passo é o estabelecimento dos organismos em uma determinada área. Em princípio, isso levaria a uma competição por espaço durante o desenvolvimento dos subsequentes organismos das comunidades bentônicas de riachos (Biggs *et al.*, 1998). Quando a competição ocorre, o resultado é frequentemente a redução da densidade, ou mesmo a extinção de uma ou mais populações coexistentes (McCormick, 1996; Uwadiae, 2014). Nesse contexto, a recorrente distribuição restrita observada em larga escala e a distribuição em manchas em pequena escala das macroalgas (Branco *et al.*, 2009) têm sido descritas como resultado de uma possível competição por espaço com algas adjacentes (Borges & Necchi, 2006). Porém, de forma muito clara, os resultados do presente estudo

mostraram que o aumento da densidade de microalgas proporcionou um consequente aumento da densidade de macroalgas. Os sistemas de riachos são ambientes comumente perturbados, nos quais manchas de habitats são totalmente destruídas e novas áreas para novos colonizadores estão sempre disponíveis (Lake, 2000). Essa característica reduz muito a limitação de espaço para colonização, o que parece tornar muito menos provável um cenário de acirrada competição por esse fator entre micro e macroalgas.

Durante a colonização, os sucessores iniciais (comumente microalgas) tendem a apresentar uma maior habilidade de imigração e, assim, acumulam-se mais rapidamente no substrato (McCormick & Stevenson, 1991; Biggs *et al.*, 1998). Em riachos, a alta taxa de imigração e crescimento desses tipos de organismos proporciona a presença contínua deles no habitat. Os sucessores tardios, por outro lado, acumulam-se mais eficientemente quando as densidades populacionais já estão altas, sendo mais abundantes em habitats mais estáveis (Biggs *et al.*, 1998). Assim, seus traços ecológicos determinam a ocorrência mais restrita desses organismos, sendo encontrados mais frequentemente em épocas com baixa perturbação ambiental, as quais permitem atingirem maiores abundâncias (Biggs *et al.*, 1998). De fato, no presente estudo as macroalgas surgiram em estágios mais tardios do processo de colonização, no qual as microalgas já estavam estabelecidas. Isso indica que uma maior densidade de microalgas pode proporcionar condições que favoreçam o aparecimento dos táxons macroscópicos (Pickett *et al.*, 1987), os quais aparentemente aguardam por tais condições (McCormick & Stevenson, 1991). Neste contexto, parece não haver competição direta entre os componentes macro e microscópicos das comunidades de algas bentônicas, já que esta relação implicaria, por exemplo, na necessária redução das macroalgas em um substrato com alta presença de microalgas. Por essa hipótese, as manchas de macroalgas, que caracterizam a típica distribuição espacial em mosaico (em escala local), podem representar, na verdade, manchas de estágios sucessionais tardios das comunidades de algas bentônicas, enquanto que a ausência delas, estágios mais recentes dessas mesmas comunidades.

Neste contexto, as fotomicrografias das comunidades de algas bentônicas tiradas com MEV corroboram essa hipótese. Por exemplo, é possível observar (Fotos MEV, riacho 5, dia 35 em diante) que o grande número de diatomáceas fixas no substrato promove o surgimento de uma superfície mais heterogênea e rugosa. Superfícies mais rugosas têm sido frequentemente associadas com maior acúmulo algal (Murdock & Doods, 2007), e uma das razões desse tipo de resposta está no aumento da sedimentação

e adesão celular (Scardino, 2006). Além disso, esse tipo de condição pode proporcionar uma melhor adesão dos esporos algais (Maggs & Callows, 2002), os quais representam a principal forma de dispersão e colonização de novos substratos na maioria das algas, inclusive as filamentosas (Fletcher & Callow, 1992).

Após o estabelecimento da comunidade, as algas devem manter suas funções biológicas. Quando há uma disponibilidade reduzida de recursos (*e.g.*, luz e nutrientes), associada com uma intensa sobreposição de necessidades fisiológicas, um cenário de intensa competição pode novamente surgir (McCormick, 1996). Por exemplo, o crescimento vertical da comunidade de algas (Hoagland *et al.*, 1982) reduz a penetração de luz às populações com forma de crescimento prostrado (McCormick, 1996). Assim, comunidades algais intimamente associadas ao substrato seriam competitivamente reduzidas ou mesmo excluídas pelas algas filamentosas, as quais conseguiriam captar maiores quantidades de luz (Biggs *et al.*, 1998). Entretanto, no presente estudo, a ANOVA demonstrou que riachos com maior presença de macroalgas apresentaram também maior abundância de algas microscópicas, fato que contradiz essa premissa. Os resultados aqui reportados, contudo, encontram amparo na literatura. Estudos mostram que uma quantidade de luz reduzida, na verdade, pode produzir um efeito positivo ao desenvolvimento das microalgas, principalmente quando representadas pelas diatomáceas. Mesmo em condições de forte sombreamento provocadas por algas verdes filamentosas, as diatomáceas não diminuíram sua abundância e apresentaram alta eficiência fotossintética em baías costeiras (Sundbäck *et al.*, 1996; Sundbäck & McGlathery, 2005). Em ambientes lóticos, espécies de Bacillariophyta demonstraram adaptação a condições de sombreamento, com a presença de fotoinibição em altas irradiancias (Necchi, 2004). Dessa forma, a atenuação de luz devido ao crescimento das algas macroscópicas pode proporcionar uma condição favorável para as particularidades fisiológicas das diatomáceas subjacentes. De fato, as espécies de microalgas observadas no presente estudo foram representadas principalmente por diatomáceas (Tabela 3).

Além da luz, as algas podem competir pelos nutrientes disponíveis no ambiente. As microalgas, por exemplo, apresentam maior relação área superficial/volume e por essa razão apresentam maior taxa de captura de nutrientes do que algas macroscópicas (Hein *et al.*, 1995). Essa característica proporcionaria às algas menores uma vantagem competitiva diante de uma possível limitação de recursos no ambiente. Entretanto, o efeito de um possível processo competitivo também não foi observado no presente

estudo. Ao contrário, a PCA mostrou que riachos associados com menores concentrações de nutrientes apresentaram menores densidades tanto de micro como de macroalgas, de modo que essas menores concentrações estiveram relacionadas com uma redução da comunidade de algas bentônicas como um todo. Esse resultado, aliás, é similar ao observado em outros estudos envolvendo a manipulação de nutrientes em algas (Dodds *et al.*, 2002).

A possível ausência de competição por recursos entre micro e macroalgas pode estar relacionada com os diferentes modos de ocupação de nicho desses componentes da comunidade algal bentônica (Uwadiae, 2014). As microalgas geralmente estão intimamente associadas ao substrato, inseridas dentro da camada limite da superfície de colonização (Stevenson, 1996), região onde a velocidade da água é muito reduzida e o aporte de nutrientes provém principalmente da sedimentação orgânica ou inorgânica (Hoagland *et al.*, 1982). Por outro lado, as espécies macroscópicas, em regra, comumente formadas por filamentos ou tufo, expõem grande parte do seu talo acima da camada limite, o que as permitem alcançarem pontos mais altos da coluna d'água (Schneck & Melo, 2012). Nessas regiões, esses organismos adquirem seus recursos diretamente da água circundante proveniente do rio acima. Além dessas diferentes estratégias para aquisição de nutrientes, os talos das macroalgas podem aumentar a ciclagem de nutrientes no sedimento devido ao aumento da entrada de matéria orgânica (Sundbäck & McGlathery, 2005). A decomposição de filamentos senescentes, por exemplo, também pode proporcionar um suprimento alternativo de recursos para as algas que se encontram associadas ao substrato (Astill & Lavery, 2001).

A análise de redundância parcial (pRDA) mostrou que as microalgas, de fato, apresentaram uma contribuição significativa na explicação das variações encontradas na abundância das assembleias de macroalgas presentes nos ambientes estudados. Em conjunto, as microalgas e as variáveis ambientais mensuradas explicaram ~40% dessa variação. É importante destacar que, embora tanto a fração ambiental como a fração microalgal tenham sido significativas, a fração do ambiente indissociável das microalgas foi muito expressiva (ca. de 25%). Isso sugere que o ambiente, as microalgas e as macroalgas estão intimamente relacionados, de modo que os efeitos do ambiente sobre as microalgas devem refletir de forma relevante sobre as assembleias de macroalgas. Nesse sentido, os efeitos do ambiente sobre as assembleias de macroalgas também podem ser indiretos, à medida que tais variáveis podem influir sobre as microalgas e essas, então, sobre as macroalgas. Essa intrincada conexão entre ambiente

e a comunidade de algas bentônicas poderia, inclusive, explicar a comum falta de relações entre a estrutura das assembleias de macroalgas e as variáveis ambientais que têm sido observadas em vários estudos recentes (ver discussão em Branco *et al.*, 2009).

Em resumo, a coexistência estável entre espécies é prevista para ocorrer em comunidades com mecanismos de partição de nicho que reduzem a competição interespecífica (Uwaidae, 2014). No presente estudo, as microalgas foram reconhecidas como colonizadoras iniciais durante o processo de estabelecimento das comunidades de algas bentônicas e, a partir daí, criaram condições para o desenvolvimento das algas macroscópicas, enquanto que essas últimas, quando estabelecidas na comunidade, aparentemente podem criar condições favoráveis às algas microscópicas pré-estabelecidas no substrato. Assim, nesse trabalho, ficou claramente estabelecido que a interação ecológica do tipo cooperação (Uwaidae, 2014) parece possuir grande papel na estruturação das comunidades algais bentônicas de ecossistemas lóticos tropicais, particularmente quando consideradas as relações entre micro e macroalgas.

1.5. Referências Bibliográficas

- Astill H & Lavery P. 2001. The dynamics of unattached benthic macroalgal accumulation in the Swan-Canning Estuary. *Hydrol. Proc.* 15: 2387-2399.
- Bechara JA, Planas D & Paquet S. 2007. Indirect effects of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) on the structure of epilithic algal communities in an oligotrophic boreal forest stream. *Fundam. Appl. Limnol.* 169: 89-99.
- Biggs BJF, Stevenson RJ & Lowe RL. 1998. A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Arch. Hydrobiol.* 143: 21-56.
- Borges FR & Necchi OJr. 2006. Patterns of spatial distribution in macroalgal communities from tropical lotic ecosystems. *Braz. J. Bot.* 29(4): 669-680.
- Branco LHZ & Necchi OJr. 1997. Seasonality of macroalgae in three tropical drainage basins in São Paulo State, southeastern Brazil. *Arch. Hydrobiol.* 141: 75-91.
- Branco CCZ, Bispo PC, Peres CK, Tonetto AF & Branco LHZ. 2014. The roles of environmental conditions and spatial factors in controlling stream macroalgal communities. *Hydrobiologia.* 732(1): 123-132.
- Branco CCZ, Krupek RA & Peres CK. 2009. Ecological distribution of stream macroalgal communities from mid-western region of Paraná State, Southern Brazil:

- evidence of the importance of local scale variation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 379-386.
- Branco CCZ, Necchi O Jr & Peres CK. 2010. Effects of artificial substratum types and exposure time on macroalgal colonization in a tropical stream. *Fundam. Appl. Limnol.* 178(1): 17-27.
- DeNicola DM & Hoagland HD. 1996. Effects of Solar Spectral Irradiance (Visible to UV) on a Prairie Stream Epilithic Community. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15: 155-169.
- Dodds WK, Smith VH & Lohman K. 2002. Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59(5): 865-874.
- Dray S, Legendre P & Blanchet G. 2009. *Packfor*: Forward Selection with permutation (Canoco p.46). R package version 0.0-7/r58
- Ferragut C & Bicudo DC. 2010. Periphytic algal community adaptive strategies in N and P enriched experiments in a tropical oligotrophic reservoir. *Hydrobiologia.* 646(1): 295-309.
- Fletcher RL & Callow ME. 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Brit. Phycol. J.* 27: 303-329.
- Gotelli NJ & Ellison AM. 2004. *A primer of Ecological Statistics*. Sinauer Associates Publishers, Massachusetts, 510p.
- Green JL & Bohannan BJM. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Tr. Ecol. Evol.* 21(9): 501-507.
- Hein M, Pedersen MF & Sand-Jensen K. 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 118: 247-253.
- Hoagland KD, Roemer SC & Rosowski JR. 1982. Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). *Am. J. Bot.* 69(2): 188-213.
- Krebs CJ. 1999. *Ecological Methodology*. Addison Wesley Educational Publishers, Menlo Park.
- Krupek RA & Branco CCZ. 2014. Estrutura das comunidades de macroalgas da bacia de drenagem do rio Cascavel, Estado do Paraná, Brasil. *Hoehnea.* 41(1): 41-50.
- Lake PS. 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 19(4): 573-592.
- Landeiro VL, Hamada N & Melo AD. 2008. Responses of aquatic invertebrate assemblages and leaf breakdown to macroconsumer exclusion in Amazonian “terra firme” streams. *Fundam. Appl. Limnol.* 172: 49-58.

- Legendre P. & Legendre L. 1998. Numerical Ecology. Elsevier Science, Amsterdam.
- Lobo EA & Leighton G. 1986. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la Zona Central de Chile. *Rev. Biol. Mar.* 22: 1-29.
- Lund JWG, Kipling C & Le Cren ED. 1958. The inverted microscopy method of estimating of algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia.* 11: 143-170.
- Maggs CA & Callow ME. 2002. *Algal spores*. Encyclopedia of life sciences. 1-6.
- Martiny JBH *et al.* 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Reviews Mic.* 4: 102-112.
- Max JCM, Melo ACG, Honda EA, Durigan G, Malícia LC, Souza MBM. 2003. Plano de manejo da Floresta Estadual de Assis. *Instituto Florestal*.
- McCormick PV. 1996. Resource competition and species coexistence in freshwater benthic algal assemblages. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. 229-252.
- McCormick PV & Stevenson RJ. 1991. Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology.* 72(5): 1835-1848.
- Murdock JN & Dodds WK. 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *J. Phycol.* 43(3): 449-460.
- Necchi OJr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia.* 525: 139-155.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt H, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H & Wagner H. 2011. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-0.
- Peres CK, Branco CCZ, Krupek RA. 2009. Distribuição ambiental e temporal das comunidades de macroalgas de riachos da Serra da Prata, Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 32: 625-633.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S & Borcard D. 2006. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology.* 87: 2614-2625.
- Pickett STA, Collins SL & Armesto JJ. 1987. Models, mechanisms and pathways of succession. *Bot. Review.* 53: 335-371
- Romesburg HC. 1984. *Cluster Analysis for Researchers*. Lifetime Learning Publications, Belmont, CA.

- Roxburgh SH, Shea K & Wilson JB. 2004. The intermediate disturbance hypothesis: patch dynamics and mechanisms of species coexistence. *Ecology*. 85(2): 359-371.
- Scardino AJ, Harvey E & De Nys R. 2006. Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling*. 22: 55-60.
- Schneck F & Melo AS. 2012. Hydrological disturbance overrides the effect of substratum roughness on the resistance and resilience of stream benthic algae. *Fresh Biol*. 57(8): 1678-1688.
- Sheath RG & Cole KM. 1992. Biogeography of stream macroalgal in North America. *J. Phycol*. 28: 448-460.
- Sokal RR & Rohlf FJ. 2000. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, 887p.
- Sundbäck K & McGlathery K. 2005. Interactions between benthic macroalgal and microalgal mats. *Coast. Est. Stud*. 60: 7-28.
- Sundbäck K, Carlson L, Nilsson C, Jönsson B, Wulff A & Odmark S. 1996. Response of benthic microbial mats to drifting green algal mats. *Aquat Mic. Ecol*. 10: 195-208.
- Tonetto AF, Branco CCZ & Peres CK. 2012. Effects of irradiance and spectral composition on the establishment of macroalgae in streams in southern Brazil. *Ann. Limnol.-Int. J. Limnol*. 48(4): 363-370.
- Tonetto AF, Cardoso-Leite R, Peres CK, Bispo PDC & Branco CCZ. 2014. The effects of habitat complexity and hydraulic conditions on the establishment of benthic stream macroalgae. *Fresh. Biol*. 59(8): 1687-1694.
- Usio N & Townsend C. 2004. Roles of crayfish: consequences of predation and bioturbation for stream invertebrates. *Ecology*. 85: 807-822.
- Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol*. 9: 1-38.

1.6. Tabelas e Figuras

Tabela 1. Tabela mostrando a formação de dois grupos de riachos (Grupos 1 e 2) utilizados nos estudos experimentais das relações biológicas entre as micro e macroalgas. Essa análise utilizou como base o número máximo de indivíduos considerados macroscópicos registrado em cada ambiente.

		Densidade máxima de
	Riachos	macroalgas
Grupo 1	2	27
	3	88
	7	80
	8	90
	9	111
Grupo 2	1	262
	4	206
	5	391
	6	338

Tabela 2. Características físicas e químicas da água em cada riacho estudado. O símbolo “ indica os riachos do Grupo 1 e ” indica os riachos do Grupo 2.

	pH	O ₂ dissolvido (mg L ⁻¹)	Condutividade (mS cm ⁻¹)	Turbidez (NTU)	Temperatura (°C)	Correnteza (cm s ⁻¹)	Potencial Redox	Nitrogênio T (mg L ⁻¹)	Fósforo T (mg L ⁻¹)
Rio 1”	6,0±0,5	8,0±1,0	0,038±0,001	13,2±2,4	19,0±1,2	46,7±6,3	246,6±21,9	0,30±0,08	0,1±0,01
Rio 2’	6,2±0,7	8,5±1,0	0,017±0,002	15,1±6,5	19,1±1,1	60,0±8,1	293,2±22,4	0,30±0,09	0,07±0,06
Rio 3’	6,2±0,6	7,7±1,0	0,039±0,001	20,4±6,5	19,5±1,09	60,0±8,2	279,4±22,3	0,29±0,08	0,06±0,01
Rio 4”	5,9±0,6	7,0±0,8	0,031±0,004	10,8±4,7	19,1±0,9	39,9±5,4	327,1±39,4	0,32±0,08	0,07±0,02
Rio 5”	6,0±0,5	6,6±0,9	0,051±0,012	13,1±3,4	19,2±1,09	45,5±6,1	346,1±29,0	0,75±0,2	0,11±0,03
Rio 6”	5,5±0,7	6,9±1,1	0,013±0,008	9,3±4,7	19,6±1,1	58,1±7,8	358,1±31,2	0,61±0,1	0,08±0,01
Rio 7’	6,2±0,6	7,9±1,0	0,027±0,005	4,7±3,8	19,7±1,0	66,3±8,9	324,5±25,7	0,34±0,08	0,05±0,03
Rio 8’	6,4±0,6	7,6±0,9	0,053±0,001	25,8±7,2	20,2±1,0	56,8±7,7	294,6±30,7	0,34±0,08	0,05±0,03
Rio 9’	6,4±0,7	7,3±0,7	0,029±0,007	15,2±3,4	21,8±1,0	54,3±7,3	275,1±26,6	0,29±0,09	0,09±0,04

Tabela 3. Lista dos táxons abundantes identificados, quando possível, em nível de espécie. A lista mostra a ocorrência das espécies em todos os riachos utilizados durante o experimento. Táxons sublinhados representam espécies macroscópicas.

Espécies abundantes	Riachos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Achnanthydium macrocephalum</i> (Hustedt) Round & Bukhtiyarova		x							
<i>Achnanthydium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	x		x	x	x				x
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grunow) Simonsen		x							
<i>Calothrix</i> sp.			x						
<u>Estágio esporofítico „Chantransia“</u>			x						x
<i>Chlamydomonas epibiotica</i> G.M. Smith		x			x	x			
<i>Chromulina pygmaea</i> Nygaard		x							x
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 1	x		x		x	x		x	
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 2									x
<i>Diatoma</i> sp.						x			
<i>Encyonema amanianum</i> Krammer								x	
<i>Encyonema vulgare</i> var <i>vulgare</i> Krammer					x				
<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot & W.Schiller								x	x
<u>Estágio inicial de <i>Stigeoclonium</i> sp.</u>	x				x				
<i>Eunotia bilunaris</i> Ehrenberg	x		x	x	x	x			x
<i>Eunotia botuliformis</i> F.Wild, Nörpel & Lange-Bertalot		x				x			
<i>Eunotia camelus</i> Ehrenberg						x			
<i>Eunotia incisadistans</i> Lange-Bertalot et E. Sienkiewicz								x	
<i>Eunotia meridiana</i> D.Metzeltin & Lange-Bertalot					x				x
<i>Eunotia novaisiae</i> Lange-Bertalot et Ector									x
<i>Eunotia pomeranica</i> Lange-Bertalot, Bąk et Witkowski									x
<i>Eunotia pseudosudetica</i> Metzeltin, Lange-Bertalot & Garcia-Rodríguez	x					x	x	x	
<i>Eunotia rabenhorstii</i> Cleve & Grunow						x			
<i>Eunotia sedina</i> Lange-Bertalot, Bąk et Witkowski		x	x	x	x				x
<i>Eunotia sudetica</i> Otto Müller		x	x			x			
<i>Leptolyngbya</i> sp.			x						
<i>Fragilaria</i> cf. <i>gracilis</i> Østrup	x								
<i>Fragilaria socia</i> (Wallace) Lange-Bertalot		x							
<i>Gomphonema angustatum</i> (Kützing) Rabenhorst		x							
<i>Gomphonema exilissimum</i> (Grunow) Lange-Bertalot & E.Reichardt	x								
<i>Gomphonema gracile</i> Ehrenberg	x								
<i>Gomphonema innocens</i> E.Reichardt	x	x							
<i>Gomphonema lagenula</i> Kützing	x	x			x	x			x
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing					x	x	x	x	x
<i>Gomphonema pseudoaugur</i> Lange-Bertalot									x
<i>Gomphonema</i> sp. 1		x			x				
<i>Gomphonema</i> sp. 2									
<i>Gomphonema stigmata</i>	x	x							
<i>Gomphonema utae</i> Lange-Bertalot & E.Reichardt					x				

<i>Heteroleiblenia</i> sp.	x								
<i>Luticola</i> sp.	x								
<i>Navicula</i> sp1						x	x		
<i>Navicula angusta</i> Grunow					x		x		
<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot									x
<i>Navicula lohmannii</i> Lange-Bertalot & U.Rumrich									x
<i>Navicula recens</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot					x				
<i>Navicula</i> sp2								x	
<i>Nupela praecipua</i> (E.Reichardt) E.Reichardt									x
<i>Oedogonium</i> sp.									x
<i>Phormidium retzii</i> Gomont					x				
<i>Stephanodiscus</i> sp.	x	x						x	x
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) P.Compère	x		x	x	x			x	x

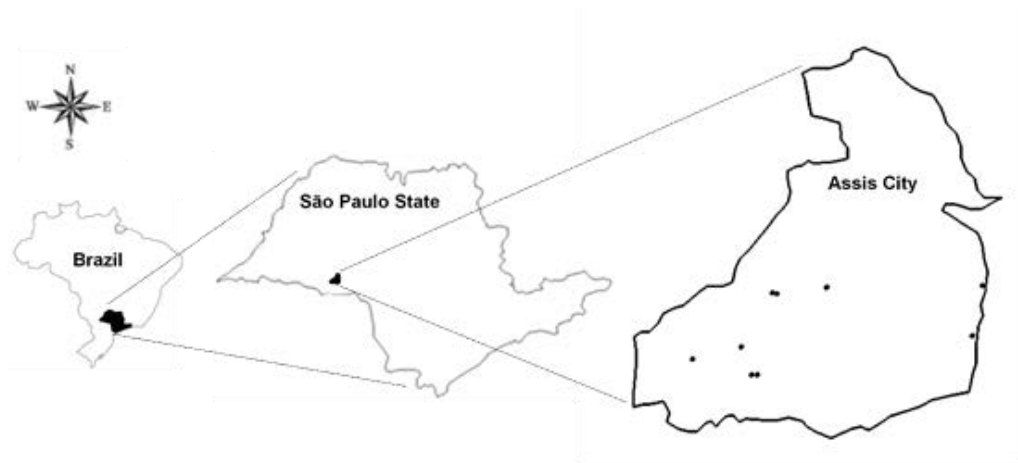


Figura 1. Mapa com localização dos riachos utilizados nos estudos experimentais das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

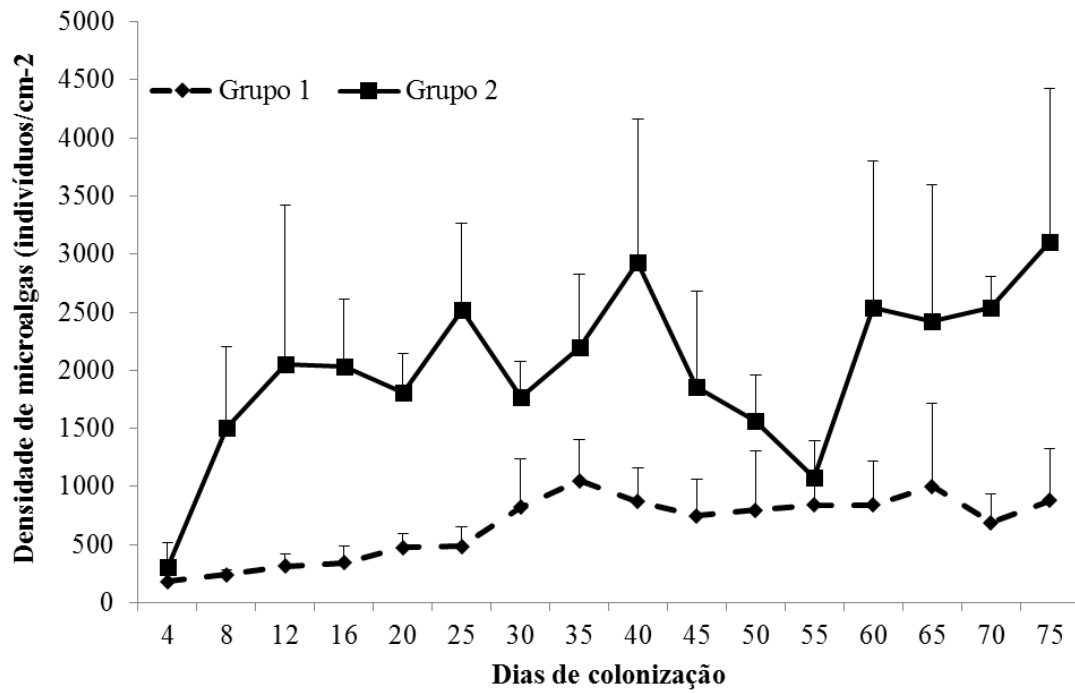


Figura 2. Variação nos valores de densidade das microalgas nos Grupos de riachos 1 e 2 observada ao longo do período experimental dos estudos das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

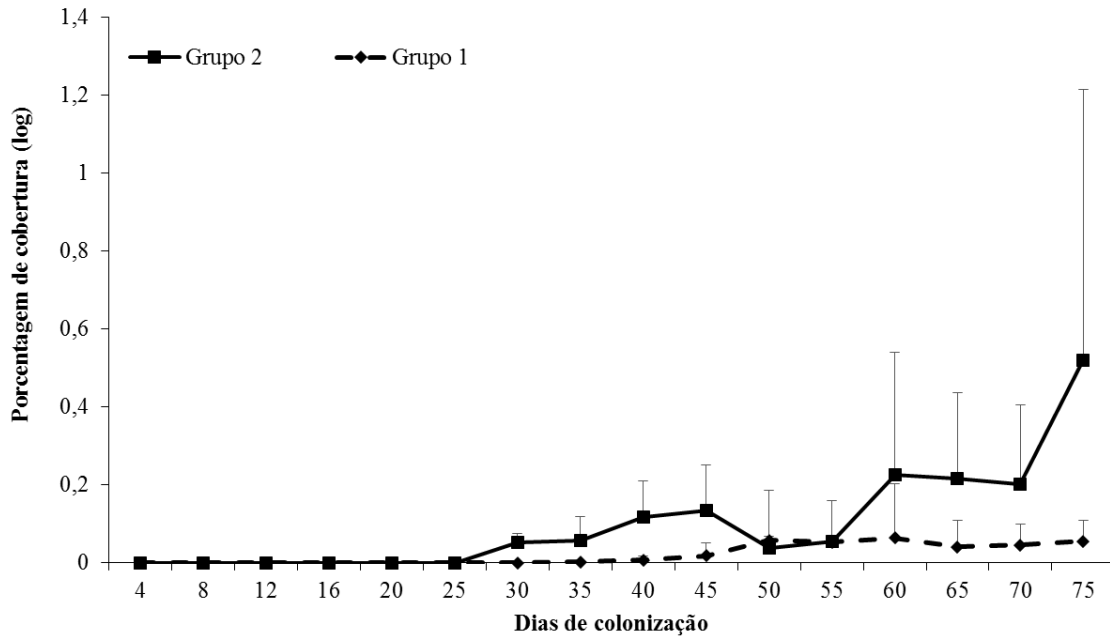


Figura 3. Variação dos valores da porcentagem de cobertura das macroalgas nos Grupos de riachos 1 e 2 observada ao longo do período experimental dos estudos das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

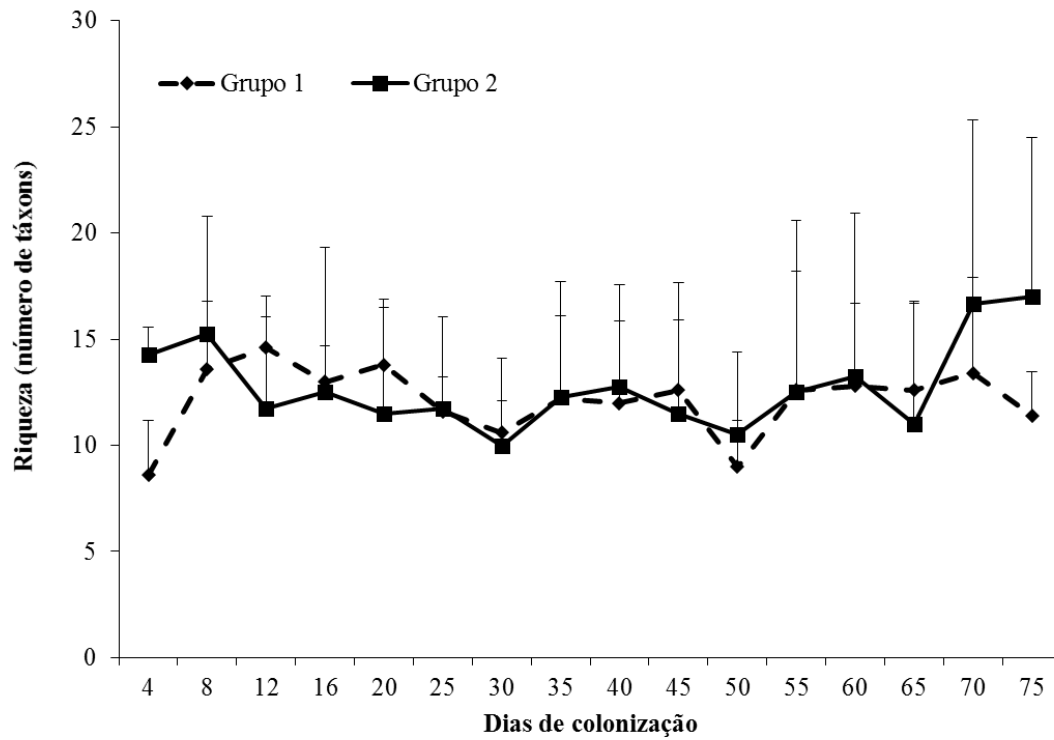


Figura 4. Variação dos valores de riqueza de espécies nos Grupos de riachos 1 e 2 observada ao longo do período experimental dos estudos das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

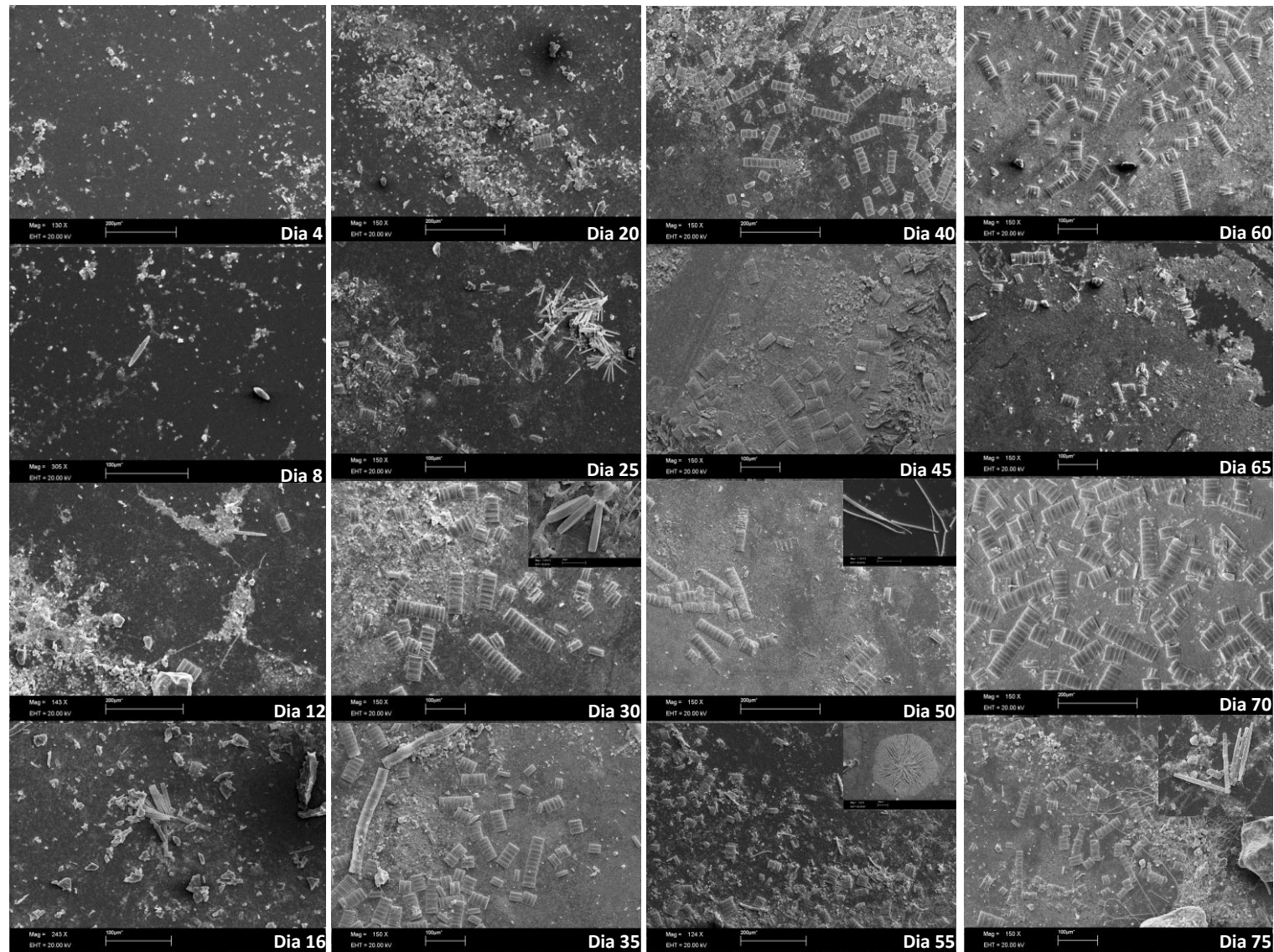


Figura 5. Microscopia de varredura das amostras de um riacho representante do Grupo 1 (riacho 2) em diferentes momentos temporais ao longo de todo o período experimental dos estudos das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

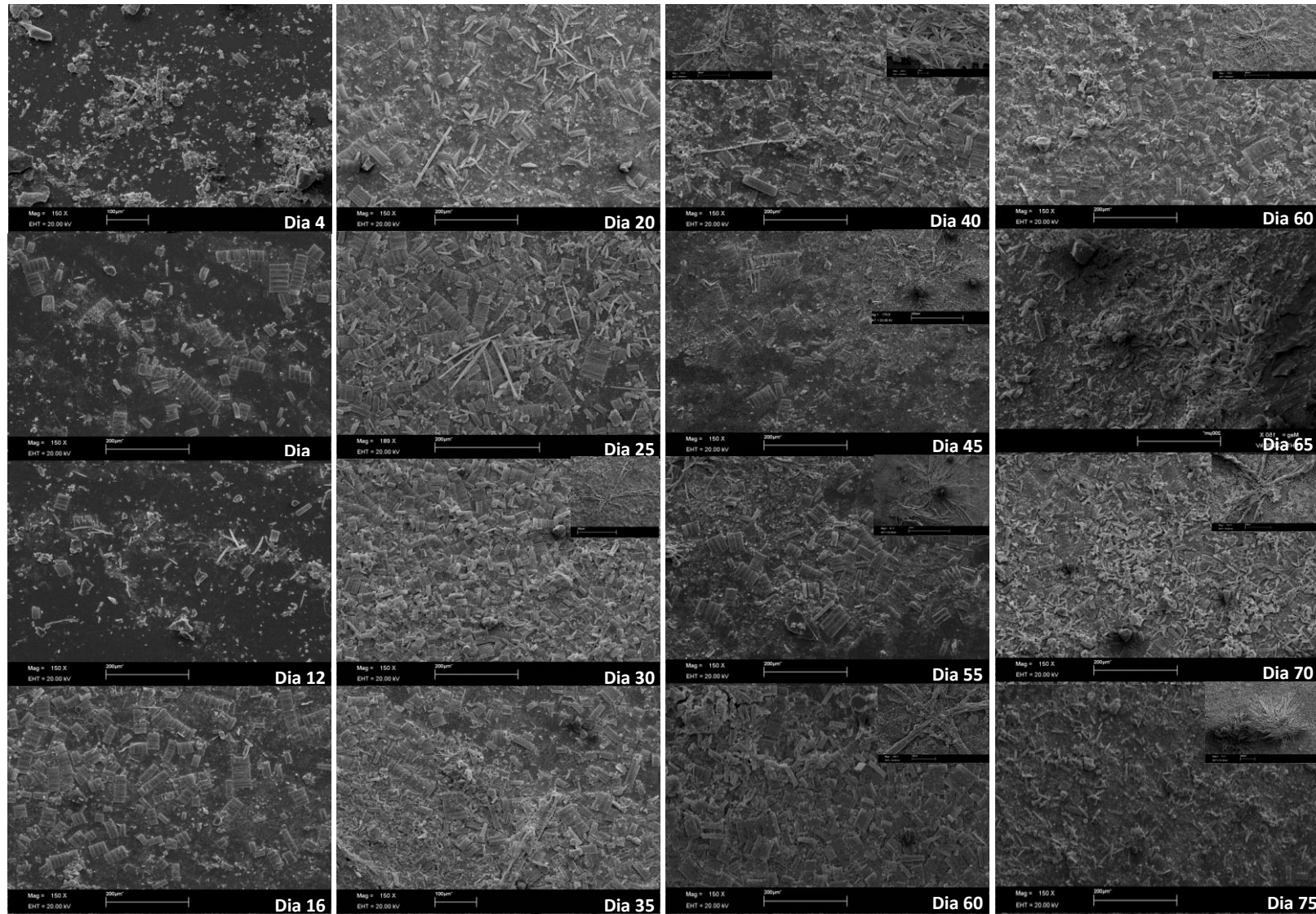


Figura 6. Microscopia de varredura das amostras de um riacho representante do Grupo 2 (riacho 5) em diferentes momentos temporais ao longo de todo o período experimental dos estudos das relações biológicas entre as micro e macroalgas.

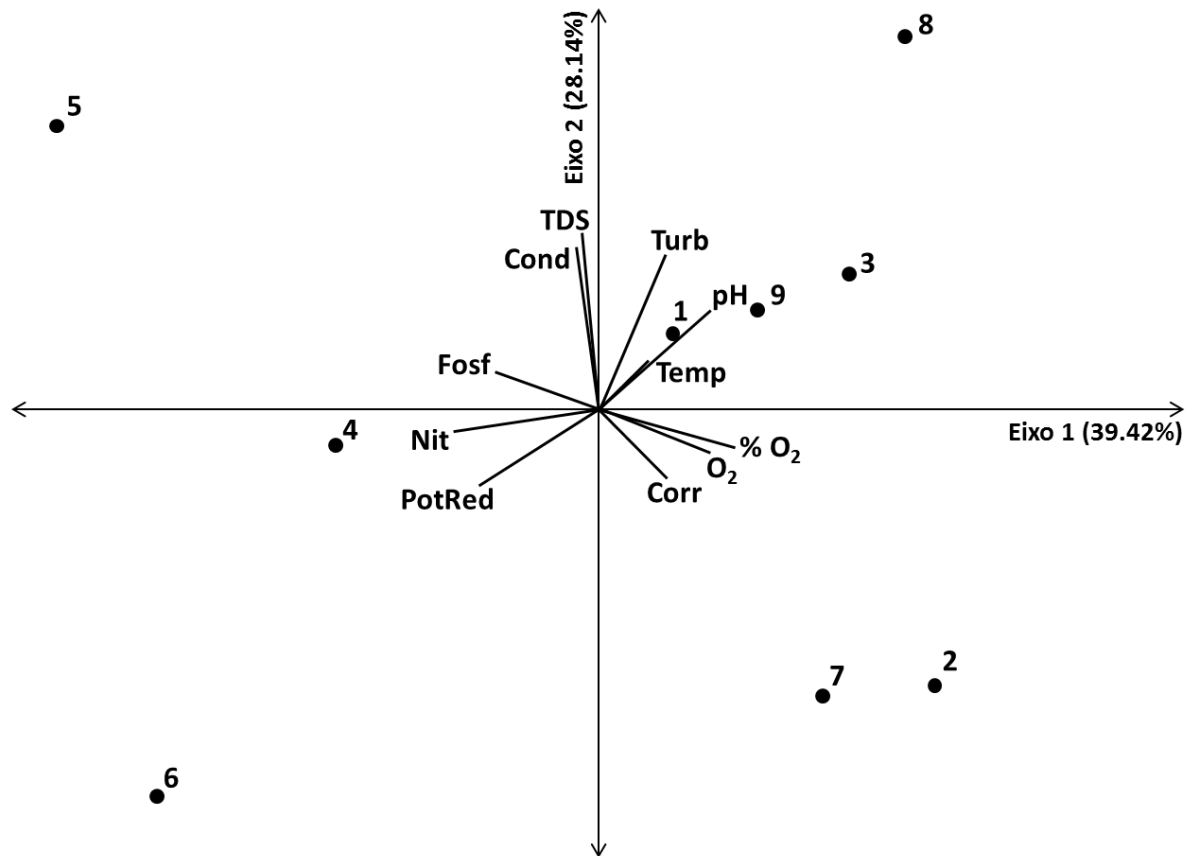


Figura 7. Resultado da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os riachos utilizados nos estudos experimentais das relações entre micro e macroalgas. Os vetores representam as variáveis utilizadas na análise e os números dos riachos.

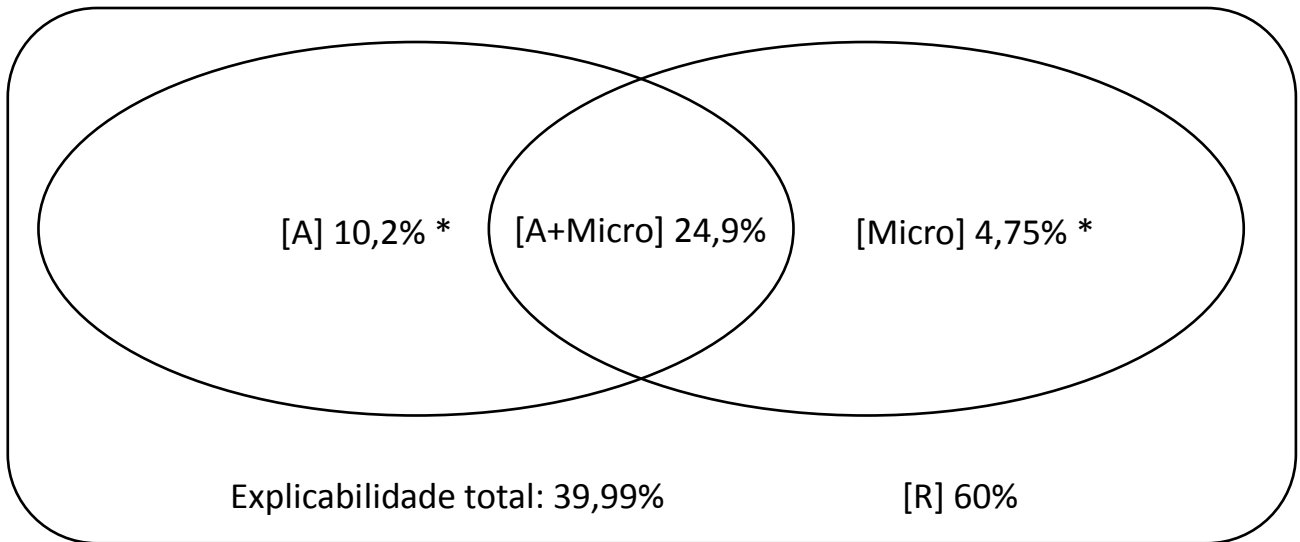


Figura 8. Diagrama de Venn representando a partição de variância da abundância de macroalgas explicada pelas variáveis ambientais e as microalgas. Os seguintes componentes estão indicados: [A], variância explicada pelo efeito puro do ambiente; [A+Micro], variância explicada pela sobreposição dos efeitos do ambiente e microalgas; [Micro], variância explicada pelo efeito puro das microalgas. São apresentados os valores de R^2 ajustado. * $p < 0,05$.

Capítulo 2

*Efeito cascata (“top-down”) da herbivoria
sobre a comunidade de algas bentônicas no
estabelecimento de macroalgas em
ambientes lóticos*

Resumo

Os efeitos da herbivoria, pelo gastrópode *Biomphalaria* sp., sobre a comunidade de algas bentônicas (micro e macroalgas) foram experimentalmente estudados em um ambiente lótico com total disponibilidade de luz da região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. Através da utilização de substratos artificiais, dois tratamentos foram testados: um com a presença de herbívoros (CH) e outro sem herbívoros (SH). Os substratos permaneceram submersos por um período de 50 dias, sendo que as variáveis ambientais e biológicas (abundância e riqueza) foram obtidas nos dias 15, 30, 40 e 50 após a instalação do experimento. O Test-*t* de Student foi aplicado para verificar possíveis diferenças entre as variações dos valores de clorofila-*a* total entre os tratamentos em cada data. Adicionalmente, o mesmo teste foi usado com os valores de riqueza e densidade de microalgas e com os valores de densidade e porcentagem de cobertura das macroalgas entre os tratamentos. Os resultados mostram que a pressão de herbivoria reduz significativamente todas as variáveis bióticas mensuradas, exceto a riqueza. A maior presença de macroalgas foi relacionada com a maior presença de microalgas nos substratos, indicando uma forte relação entre esses componentes. Dessa forma, a atividade dos herbívoros, pela redução da densidade de microalgas, provocou um efeito negativo indireto sobre as macroalgas, diminuindo significativamente a sua abundância nos estágios mais tardios do desenvolvimento da comunidade de algas bentônicas. Assim, os resultados sugerem que o estabelecimento e o desenvolvimento das macroalgas em ambientes lóticos podem ser, adicionalmente, regulados por um efeito cascata, do tipo “*top-down*”, onde a ação de herbívoros, neste caso o gastrópode raspador *Biomphalaria* sp., sobre as microalgas afeta indiretamente a abundância das macroalgas.

Palavras-chave: herbivoria, microalgas, macroalgas, efeito “*top-down*”.

2.1. Introdução

Um dos principais objetivos da ecologia é tentar compreender como os consumidores controlam a distribuição e abundância dos produtores primários (Alvarez & Peckasky, 2014). Em ecossistemas lóticos, muitos trabalhos têm demonstrado que a herbivoria possui forte influência na redução da biomassa de algas bentônicas (Steinman et al., 1987), no estímulo da produção primária (Lamberti *et al.*, 1987), na estrutura taxonômica das assembleias algais (Tall *et al.*, 2006) e na reciclagem de nutrientes (Mulholland *et al.*, 1983). Apesar da extensiva literatura, poucos trabalhos têm investigado os efeitos das interações algas-herbívoros na determinação dos padrões de distribuição espacial desses organismos (Alvarez & Peckasky, 2005; Alvarez & Peckasky, 2014).

Em ambientes marinhos, Sommer (2000) mostrou que a raspagem espacialmente desigual de gastrópodes resultou em uma maior heterogeneidade de microalgas no ambiente. Alguns estudos têm demonstrado que os herbívoros bentônicos de riachos podem responder pelas variações espaciais das algas bentônicas, de modo a exercer relevante influência na regulação da típica distribuição em mosaico destas algas nos substratos (Flecker & Taylor, 2004). Em uma revisão, Adler *et al.* (2001) concluiu que as variações dos efeitos dos herbívoros sobre a heterogeneidade espacial de plantas depende da seletividade dos herbívoros, sua intensidade e padrão espacial de ambos herbívoros e vegetação. Em riachos, Tall *et al.* (2006) encontraram que diferentes dietas de herbívoros, diante de diferentes camadas/formas de crescimentos de diatomáceas, proporciona a co-ocorrência dos diferentes tipos de invertebrados no ambiente, associada a posição espacial das algas.

A fisionomia das comunidades de algas bentônicas de riachos apresenta grande variação, uma vez que as composições taxonômicas e as relações quantitativas entre os táxons oscilam fortemente tanto no espaço como no tempo (Steinman *et al.*, 1987). Por exemplo, tais comunidades possuem desde representantes das diatomáceas microscópicas (intimamente associadas ao substrato) até indivíduos macroscópicos com estruturas filamentosas que atingem diferentes regiões na coluna d'água. Os herbívoros aquáticos, por sua vez, podem selecionar as algas pelas quais se alimentam, essencialmente, pelo seu tamanho, forma de crescimento e nível de fixação com o substrato (Tall *et al.* 2006). Essa interação entre os herbívoros e as algas influenciam

fortemente o arranjo espacial das comunidades, além de determinar a continuidade de sua paisagem (Pacal, 1987; Sarnelle *et al.*, 1993).

De modo geral, tem sido frequentemente encontrado um declínio das formas de algas macroscópicas diante da atividade de herbívoros (Steinman, 1996). Esses resultados têm sido relacionados com a posição vulnerável desses tipos de talo, de modo que a localização desses organismos em posições mais distante do substrato os tornam susceptíveis ao desprendimento provocado pela herbivoria (Rosemond *et al.*, 1993). As algas incrustantes, por outro lado, por estarem mais intimamente associadas ao substrato não estão tão acessíveis aos efeitos da atividade de herbívoros (Steinman, 1996). Entretanto, esses resultados não são tão previsíveis, uma vez que a grande variedade funcional associada aos diferentes tipos de herbivoria podem conduzir a diferentes resultados (Steinman, 1987).

Neste contexto, a presença de diferentes tipos de herbivoria associados as diferentes formas de crescimento algal durante um processo de colonização pode influenciar a trajetória desse processo. Alguns estudos demonstraram que a colonização algal apresenta uma alteração direcional de uma fisionomia com organismos menores para uma com organismos de maior tamanho (Hoagland *et al.* 1982; McCormick & Stevenson, 1991). Dessa forma, se organismos unicelulares compuserem os colonizadores pioneiros, herbívoros do tipo raspadores do substrato irão manter a comunidade em estágios iniciais, reduzindo portanto as chances do surgimento das macroalgas nos estágios posteriores da colonização (Steinman, 1996).

Neste contexto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da presença do herbívoro *Biomphalaria* sp., um gastrópode raspador, sobre o processo de colonização da comunidade de algas bentônicas em um ambiente lótico tropical, com especial interesse no estabelecimento do componente macroalgal desta comunidade. A hipótese inicial do estudo sugeriu que a presença do gastrópode, que se alimenta principalmente de microalgas (Osenberg & Mittelbach, 1989), iria produzir um efeito cascata (“*top-down*”), de sinal negativo, no estabelecimento das macroalgas durante o processo de colonização dos substratos ao longo do período experimental. Assim, esperava-se que a presença do herbívoro iria afetar indiretamente a ocorrência das algas macroscópicas, uma vez que iria reduzir a abundância das microalgas, pioneiras na colonização dos substratos.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Área de estudo

As investigações sobre os efeitos da herbivoria em comunidades de algas bentônicas lólicas, especialmente sobre as macroalgas, foram conduzidas em um riacho artificial “outlet” localizado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, com alta disponibilidade de luz e substrato estável. Neste ambiente observa-se, além da presença evidente de espécies de macroalgas, a presença constante do gastrópode *Biomphalaria* sp., organismo considerado altamente eficiente na raspagem de substratos (Steinman *et al.*, 1987).

2.2.2. Delineamento experimental

Os efeitos da herbivoria foram investigados sobre o desenvolvimento estrutural da comunidade de algas bentônicas, com foco especial nas macroalgas, durante o processo de colonização de substratos artificiais. Para isso, foram construídos amostradores que permitiram a aplicação da técnica de exclusão, de modo que dois grupos de tratamentos experimentais foram estabelecidos: i) tratamento experimental com presença dos herbívoros e ii) tratamento experimental sem a presença dos herbívoros. Deste modo, foram construídos 42 compartimentos cercados com malha de 0,5 mm de porosidade de modo a garantir a passagem da água pelo interior dos compartimentos e evitar tanto a saída dos raspadores introduzidos como a entrada de outros organismos externos. Em 21 compartimentos, destinados à avaliação do efeito da presença dos raspadores (tratamento rotulado por CH, ou seja, com herbívoros), foram incluídos de 15-17 organismos. A densidade de herbívoros foi estabelecida com base em trabalhos anteriores (Steinman *et al.*, 1987; Lamberti *et al.*, 1987), e o número de indivíduos foi mantido constante durante todo o período experimental. Os 21 compartimentos restantes permaneceram sem nenhum tipo de herbívoro (tratamento rotulado por SH, ou seja, sem herbívoros). Como substrato artificial efetivamente disponível para a colonização das algas bentônicas foram utilizadas lâminas de vidro (Branco *et al.*, 2010), de modo que 12 lâminas de vidro foram fixadas no interior de cada compartimento, totalizando 504 lâminas. O Apêndice A2 descreve em detalhes os procedimentos envolvidos na confecção dos amostradores utilizados neste experimento.

Os amostradores contendo os compartimentos foram instalados no ambiente e ancorados por uma placa de concreto de aproximadamente 20kg, a fim de garantir a maior estabilidade possível. As lâminas destinadas à colonização permaneceram aproximadamente 25 cm acima do fundo do riacho, ao mesmo tempo em que as cercas utilizadas para isolar cada compartimento ultrapassaram o nível da água. Tais providências foram tomadas para evitar que outros herbívoros alcançassem os substratos experimentais ou que houvesse saída dos herbívoros confinados (Feminella & Resh, 1991).

A fim de permitir uma colonização inicial dos substratos artificiais, os herbívoros foram introduzidos nos compartimentos destinados a avaliação do efeito da herbivoria sete dias após a instalação do experimento (Steinman *et al.*, 1987). Por sua vez, as retiradas das lâminas para análise temporal do processo de colonização da comunidade de algas bentônicas foram realizadas 15, 30, 40 e 50 dias após a instalação dos experimentos.

Em cada data de amostragem, seis compartimentos foram analisados, três do tratamento CH e três do tratamento SH. A determinação da ordem dos compartimentos a serem analisados e das lâminas a serem removidas foi feita de forma randômica. Em cada compartimento, três lâminas foram coletadas, sendo estas destinadas à estimativa da riqueza de espécies (fixadas em Formol 4%), a mensuração da densidade de espécies (preservadas em Lugol acético 0,5%) e a quantificação da clorofila-*a*. Sempre que as macroalgas estiveram presentes foram feitos registros fotográficos das lâminas para mensuração da porcentagem de cobertura desses organismos no substrato (Tonetto *et al.*, 2012). Adicionalmente, na última data de experimentação, foi obtido um registro fotográfico de um compartimento inteiro, ou seja, considerando as 12 lâminas, a fim de quantificar a porcentagem de cobertura das macroalgas em uma área maior do que uma única lâmina (Tonetto *et al.*, 2012; Tonetto *et al.*, 2014). O uso deste procedimento foi adotado para ilustrar melhor a distribuição espacial das macroalgas nos substratos.

Durante o procedimento de contagem das amostras, os táxons comumente reportados como macroscópicos (geralmente espécies filamentosas) foram agrupados para compor separadamente os valores de densidade micro e macroalgal. O método para a contagem dos indivíduos seguiu os trabalhos de Utermöhl (1958) e Lund *et al.* (1958) e a identificação das espécies abundantes (superior a densidade média de toda a comunidade, Lobo & Leighton, 1986) foi realizada através de literatura especializada. A clorofila-*a*, por sua vez, foi mensurada através da técnica descrita em Ferragut &

Bicudo (2010). O Apêndice B 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5 depreendem em maiores detalhes as técnicas utilizadas para mensuração das variáveis bióticas utilizadas no estudo.

Além dos dados biológicos, as seguintes variáveis físicas e químicas da água foram mensuradas, diretamente em campo, com o auxílio de um controlador de qualidade da água, marca Horiba, modelo U-52, equipado com sonda multi parâmetros: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, potencial de oxido redução e turbidez. Além dessas variáveis, também foi mensurada a velocidade da correnteza, utilizando-se um correntômetro eletrônico Swoffer 3000. Por fim, em cada ponto, uma amostra de 500 mL de água do próprio riacho foi coletada para a quantificação de Nitrogênio e Fósforo Totais através da utilização de um espectrofotômetro Spectroquant Nova 60 e reagentes específicos. A Tabela 1 mostra os valores das variáveis ambientais mensuradas em cada data de amostragem.

2.2.3. Análises dos dados

Para cada dia de amostragem, foi aplicado o Teste-*t* de Student para amostras independentes, a fim de verificar possíveis diferenças entre os tratamentos CH e SH. A análise foi realizada utilizando-se os valores totais de clorofila-*a*, porcentagem de cobertura das macroalgas, densidade e riqueza de microalgas. Além disso, matrizes de similaridade da composição de espécies com base no índice de Morisita foram construídas para as comunidades de cada tratamento. Com elas, foi realizado um teste de Mantel para verificar a correlação entre essas matrizes. As análises foram executadas no programa Statistica 7.0 e NTSys.

2.3. Resultados

Os valores de riqueza das algas microscópicas não revelaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 1). Porém, o teste de Mantel ($r = -0,26$; $p = 0,10$) mostrou que não houve correlação estatisticamente significativa entre as composições taxonômicas dos tratamentos.

A variação dos valores de clorofila-*a* mensurados em cada dia de coleta está representada na Figura 2, onde observa-se que os valores de clorofila-*a* cresceram em ambos os tratamentos, porém, o tratamento CH se manteve sempre com valores inferiores aos observados no tratamento SH. O Teste-*t* registrou que nas datas 30 ($p < 0,05$) 40 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,05$), essas diferenças foram significativas.

O Test-*t* também mostrou que, para os dados de densidade de microalgas, nas datas 30 ($p < 0,05$) 40 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,05$), houve diferenças significativas entre os tratamentos CH e SH (Figura 3). O tratamento CH registrou uma variação na densidade de 3736 a 12786 ind.cm⁻², enquanto que o tratamento SH esta variação esteve entre 4124 e 18721 ind.cm⁻² (Figura 3). O número de indivíduos macroscópicos apresentou resultado similar. Os compartimentos do tratamento SH apresentaram maior número de macroalgas do que aqueles com presença de gastrópodes (Figura 4), evidenciando que nos substratos com maior número de microalgas também foi reportado maior número de algas macroscópicas. De fato, a porcentagem de macroalgas apresentou valores significativamente maiores no tratamento SH do que no CH (Figura 5). O Test-*t* revelou diferenças nas datas 30, 40 e 50 (todas com $p < 0,01$).

A porcentagem de cobertura quantificada na data da última amostragem permitiu o mapeamento da distribuição de manchas de macroalgas nos compartimentos como um todo (Figura 6). Nesta análise observou-se que nos compartimentos do tratamento CH a colonização das macroalgas ocorreu em manchas espaçadas, enquanto que nos compartimentos do tratamento SH o crescimento foi generalizado, com as macroalgas desenvolvendo-se igualmente por todo o compartimento.

2.4. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que a herbivoria apresenta relevante papel no desenvolvimento da comunidade de algas bentônicas lótic. Os valores de clorofila-*a* foram significativamente maiores no tratamento SH do que no CH. Resultados similares aos reportados no presente estudo têm sido observados em vários trabalhos prévios, nos quais já foi demonstrado que a presença de consumidores reduz a biomassa de algas em riachos (Feminella & Hawkins, 1995). Entretanto, embora exista esta tendência negativa e direta entre a presença de herbívoros e a biomassa algal, outros estudos têm sugerido que os efeitos da herbivoria não são tão claramente previsíveis, uma vez que as comunidades algais possuem diferentes composições taxonômicas e características fisionômicas, bem como os herbívoros também possuem diferentes preferências de consumo e distintas habilidades no forrageio de determinados tipos morfológicos algais, relacionados às especificidades de suas morfologias bucais (Lamberti & Moore, 1984; Steinman *et al.*, 1987). Neste contexto, o sinal e a intensidade da herbivoria sobre a abundância das comunidades algais dependem,

fundamentalmente, da correspondência entre as características das comunidades de algas e de herbívoros que coexistem em um determinado ambiente.

De acordo com a discussão acima, a dinâmica espacial entre as micro e macroalgas pode ser conduzida por mecanismos associados a interação dessas comunidades com o tipo de herbívoro presente no ambiente. Assim, os gastrópodes aquáticos, como os utilizados no presente estudo, alimentam-se principalmente da comunidade bentônica, formada por um conjunto diversificado de microalgas, especialmente diatomáceas (Osenberg, & Mittelbach, 1989). Aqui, a ausência dos gastropodes durante o processo de colonização permitiu que as microalgas atingissem altos valores de densidade. Uma vez que a abundância de macroalgas foi igualmente maior nesses tratamentos, a presença das microalgas parece ser importante para o estabelecimento das macroalgas (Capítulo 1), corroborando nossa hipótese inicial.

Como já discutido no Capítulo 1, a matriz de diatomáceas formada nos estágios iniciais da colonização pode promover o surgimento de uma superfície mais rugosa e heterogênea. Superfícies mais rugosas e heterogêneas, por sua vez, têm sido frequentemente associadas com maior acúmulo algal (Murdock & Doods, 2007), e uma das razões desse tipo de resposta está no aumento da sedimentação e adesão celular (Scardino, 2006). Além disso, esse tipo de condição pode proporcionar uma melhor adesão dos esporos algais (Maggs & Callows, 2002), os quais representam a principal forma de dispersão e colonização de novos substratos na maioria das algas, inclusive as filamentosas macroscópicas (Fletcher & Callow, 1992)(ver Capítulo 1).

Recentemente, crescentes evidências têm sugerido que um mecanismo de cascata trófica pode ter um forte efeito indireto nas propriedades de um ecossistema, alterando a diversidade autotrófica, ao invés de simplesmente afetar a biomassa (Schmitz, 2006). Os resultados do presente estudo permite sugerir que os padrões de distribuição espacial das macroalgas lólicas podem ser influenciados por um efeito “*top-down*” indireto da herbivoria sobre a composição da comunidade de algas bentônicas. Neste contexto, parece que o processo de herbivoria sobre as microalgas bentônicas, representados no presente estudo pelo consumo destas algas por parte dos gastrópodes tem relevante influência, embora indireta, no estabelecimento das macroalgas, uma vez que estas estão, aparentemente, diretamente associadas a prévia presença das algas microscópicas no substrato (como demonstrado no Capítulo 1).

Dessa forma, a presença do herbívoro em uma comunidade jovem pode mantê-la nos estágios iniciais de desenvolvimento, impedindo que as algas com longos

filamentos desenvolvam-se (Steinman *et al.*, 1987). Sabendo-se que o tempo de interação herbívoro-algas pode influenciar os efeitos da herbivoria sobre as variações da comunidade (Steinman, 1996), a fisionomia e arranjo espacial das micro e macroalgas podem estar fortemente associados a esse processo. Por exemplo, o tempo em que uma determinada área permanece livre da atividade de herbívoros pode permitir que a comunidade alcance estágios mais tardios de colonização. Assim, espécies filamentosas (*e.g.*, *Stigeoclonium* sp. e *Oedogonium* sp.) devem realizar uma “corrida contra o tempo” para atingir um tamanho suficientemente grande para escapar dos efeitos da herbivoria (Duggins & Dethier, 1985; Steinamn *et al.*, 1987). Além disso, após alcançar um tamanho tolerante aos herbívoros, a presença deles pode até mesmo melhorar o crescimento dessas algas, uma vez que a raspagem de microalgas epifíticas pode, por exemplo, aumentar a disponibilidade de luz às células do filamento (Dudley, 1992). De modo geral, sugere-se que as comunidades onde a ausência de herbivoria persiste por um tempo maior tendem a apresentar mais abundância de espécies filamentosas do que em comunidades onde a pressão da herbivoria é mais frequente.

Em resumo, a pressão de herbivoria apresentou forte relação com as variações estruturais da comunidade de algas bentônicas em riachos tropicais. Uma vez que, segundo trabalhos prévios, o tipo de herbivoria (tamanho, morfologia bucal), sua densidade e, conseqüentemente, seu tempo de interação com as algas resultam em diferentes influências (Feminella & Hawkins, 1995), estudos futuros envolvendo essas características da herbivoria ajudariam a melhorar a compreensão sobre como as diferentes fisionomias e arranjos das comunidades de algas bentônicas lóticicas se desenvolvem no ambiente.

2.5. Referências Bibliográficas

- Alvarez M & Peckarsky BL. 2005. How do grazers affect periphyton heterogeneity in streams? *Oecologia*. 142: 576-587.
- Alvarez M & Peckarsky BL. 2014. Cascading effects of predatory fish on the composition of benthic algae in high-altitude streams. *Oikos*. 123(1): 120-128.
- Dudley TL. 1992. Beneficial effects of herbivores on stream macroalgae via epiphyte removal. *Oikos*. 65:121-127.
- Duggins DO & Dethier MN. 1985. Experimental studies of herbivory and algal competition in low intertidal habitat. *Oecologia*. 67: 183-191.

- Feminella JW & Resh VH. 1991. Herbivorous caddisflies, macroalgae, and epilithic microalgae: dynamic interactions in a stream grazing system. *Oecologia*. 87:247-256.
- Ferragut C & Bicudo DC. 2010. Periphytic algal community adaptive strategies in N and P enriched experiments in a tropical oligotrophic reservoir. *Hydrobiologia*. 646(1): 295-309.
- Fletcher RL & Callow ME. 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Brit. Phycol. J.* 27: 303–329.
- Lamberti GA & Moore JW. 1984. Aquatic insects as primary consumers. In Resh, VH & Rosenberg. The ecology of aquatic insects. Praeger Publishers, New York.
- Lamberti GA, Ashkenas LR, Gregory SV & Steinamn AD. 1987. Relative effects of three herbivores on periphyton communities in laboratory streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 6: 92-104.
- Lobo EA & Leighton G. 1986. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la Zona Central de Chile. *Rev. Biol. Mar.* 22: 1-29.
- Lund JWG, Kipling C & Le Cren ED. 1958. The inverted microscopy method of estimating of algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11: 143-170.
- Maggs CA & Callow ME. 2002. Algal spores. *Encycl. L. Scien.* 1-6.
- Mulhlland PJ, Newbold JD, Elwood JW & Hom CL. 1983. The effect of grazing intensity on phosphorus spiralling in autotrophic streams. *Oecologia*. 58: 358-366.
- Murdock, JN & Dodds, WK. 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *J. Phycol.* 43(3): 449-460.
- Osenberg CW, Mittelbach GC. 1989. Effects of body size on the predator-prey interaction between pumpkinseed sunfish and gastropods. *Ecol. Monogr.* 59: 405-432.
- Pacal SW. 1987. Neighborhood models of plant population dynamics III. Models with spatial heterogeneity in the physical environment. *Theor. Pop. Biol.* 31: 359-392.
- Scardino AJ, Harvey E & De Nys R. 2006. Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling*. 22: 55-60.
- Schmitz OJ. 2006. Predators have large effects on ecosystem properties by changing plant diversity, not plant biomass. *Ecology*. 87: 1432-1437.

- Sernelle O, Kratz KW & Cooper SD. 1993. Effects of invertebrate grazer on the spatial arrangement of a benthic micro-habitat. *Oecologia*. 96: 208-218.
- Steinman AD. 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. – In: Stevenson R. J. et al. (eds), *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, pp. 341-366.
- Steinman AD, McIntire CD, Gregory SV, Lamberti GA & Ashkenas LR. 1987. Effects of herbivore types and density on taxonomic structure and physiology of algal assemblages in laboratory streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 6(3): 175-188.
- Tall L, Cattaneo A, Cloutier L, Dray S & Legendre P. 2006. Resource partitioning in a grazer guild feeding on a multilayer diatom mat. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 25(4): 800-810.
- Tonetto AF, Branco CCZ & Peres CK. 2012. Effects of irradiance and spectral composition on the establishment of macroalgae in streams in southern Brazil. *Ann. Limnol-Int. J. Limnol.* 48(4): 363-370.
- Tonetto AF, Cardoso-Leite R, Peres CK, Bispo PC & Branco CCZ. 2014. The effects of habitat complexity and hydraulic conditions on the establishment of benthic stream macroalgae. *Fresh. Biol.* 59(8): 1687-1694.
- Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9: 1-38.

2.6. Tabelas e Figuras

Tabela 1. Características físicas e químicas da água do riacho estudado durante o período experimental.

Data de coleta	pH	O ₂ dissolvido (mg L ⁻¹)	Condutividade (mS cm ⁻¹)	Tubidez (NTU)	Temperatura (°C)	Correnteza (cm s ⁻¹)	Potencial Redox	Nitrogênio T (mg L ⁻¹)	Fósforo T (mg L ⁻¹)
Dia 7	7,76±0,2	12,91±0,64	0,09±0,001	1,10±0,285	25,4±0,30	22,87±7,74	149±3,74	0,38±0,01	0,12±0,01
Dia 15	7,15±0,3	12,05±2,3	0,093±0,0001	3,76±0,57	22,28±0,01	35,07±4,48	234,6±49	0,29±0,04	0,09±0,04
Dia 30	6,04±0,7	8,84±1,02	0,097±0,006	2,07±0,17	25,50±0,02	32,09±4,38	347,3±28,1	0,41±0,04	0,13±0,02
Dia 40	7,91±0,27	10,8±1,8	0,085±0,0004	2,56±0,11	26,43±0,04	32,0±4,50	146±47,2	0,37±0,03	0,15±0,03
Dia 50	6,4±0,54	10,70±2,2	0,091±0,004	2,39±0,16	29,28±0,02	31,05±2,53	235,3±10,3	0,39±0,02	0,17±0,02

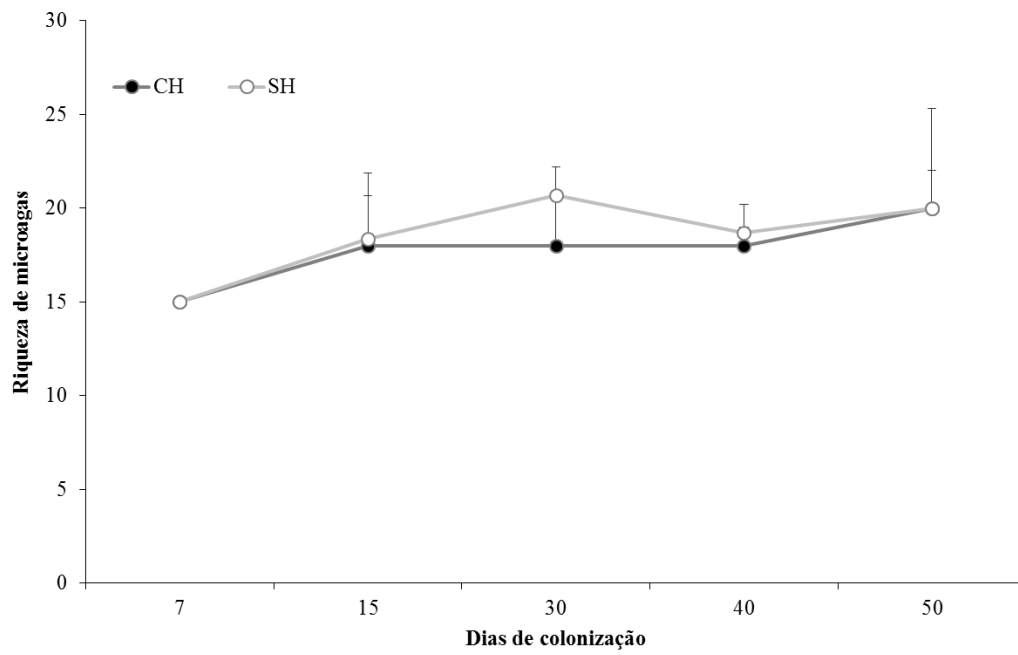


Figura 1. Variação temporal dos valores de riqueza das microalgas presentes nos tratamentos CH e SH.

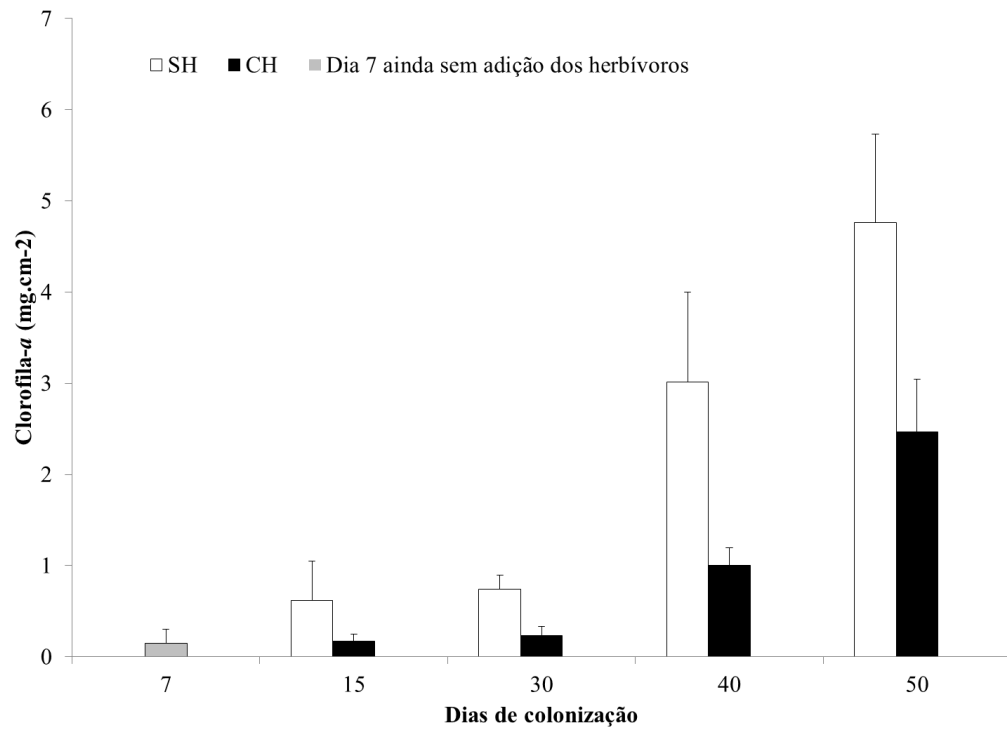


Figura 2. Variação temporal dos valores de clorofila-*a* nos tratamentos CH e SH durante o período experimental.

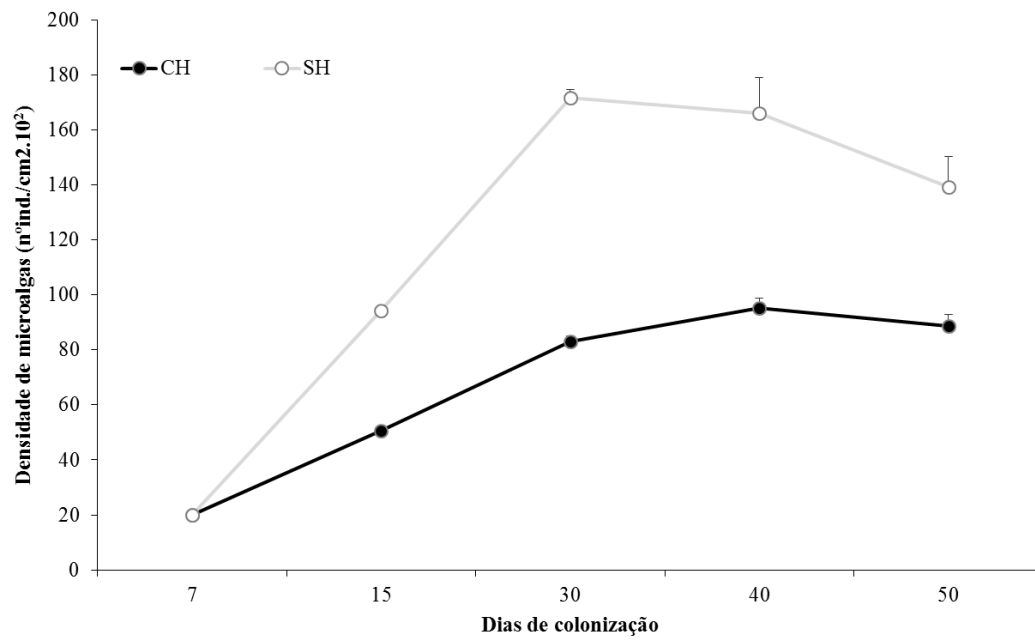


Figura 3. Variação temporal dos valores de densidade das microalgas presentes nos tratamentos CH e SH.

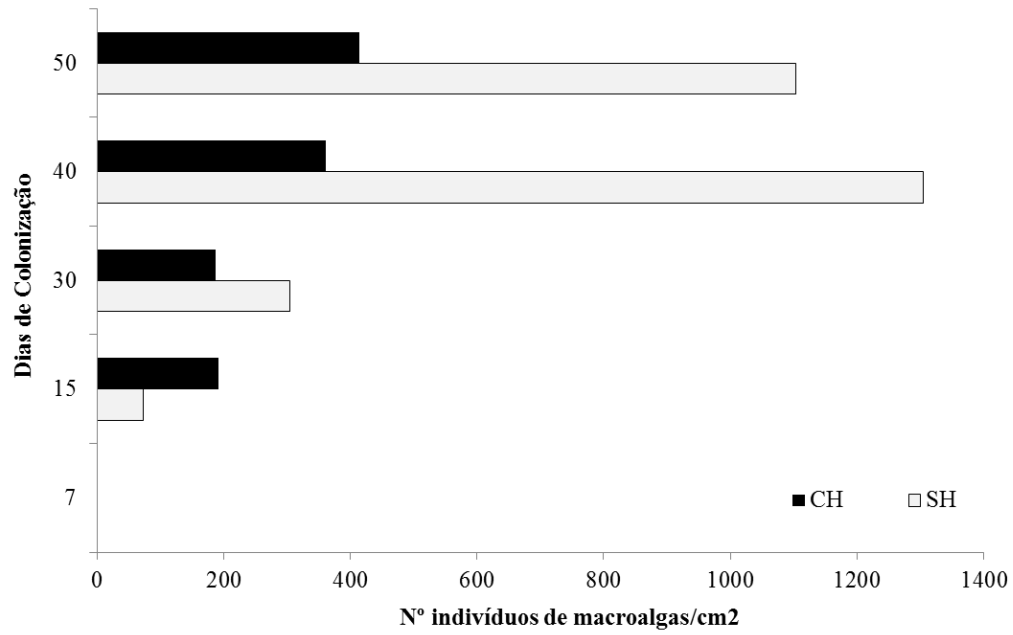


Figura 4. Número de indivíduos tratados com macroalgas ao longo do período experimental nos tratamentos CH e SH. A data 7 ainda não apresentava herbívoros em nenhum compartimento.

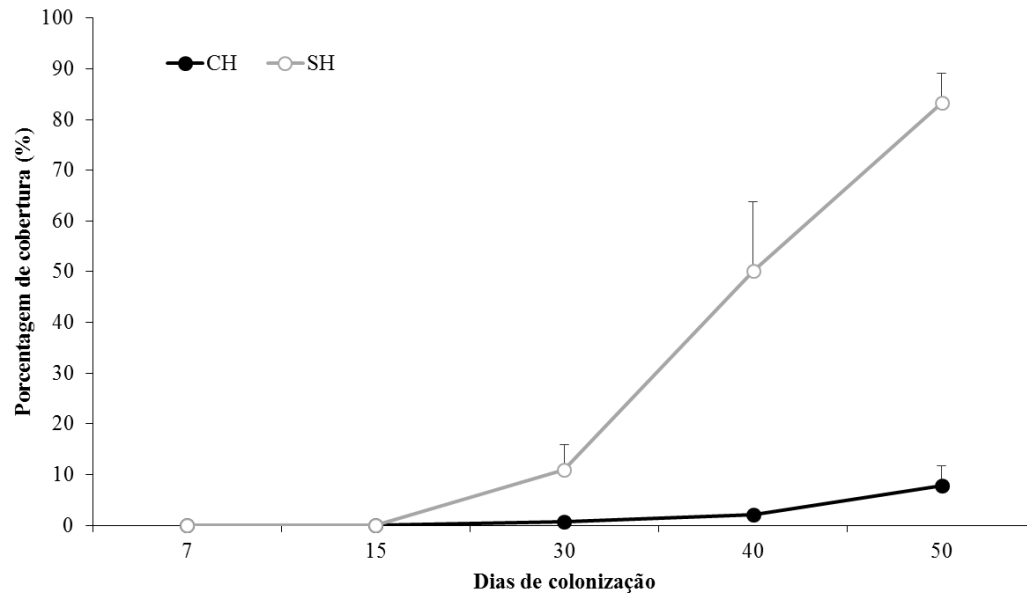


Figura 5. Variação temporal da porcentagem de cobertura de macroalgas em cada tratamento durante o período experimental.

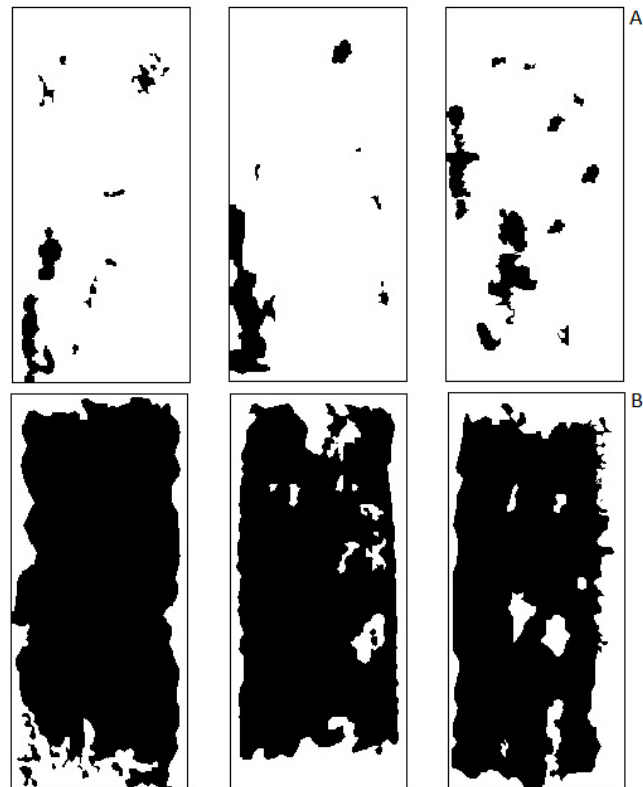


Figura 6. Marcação das manchas com macroalgas aderidas aos substratos artificiais no compartimento como um todo. (A) Três compartimentos com presença de herbivoria; (B) três compartimentos sem a presença de herbivoria. Essa análise foi realizada no ultimo dia de colonização (50° dia).

Considerações Finais

De modo geral, nos capítulos da presente tese foram apresentados e discutidos os resultados de dois experimentos que investigaram as relações entre as micro e macroalgas bentônicas entre si e destas com herbívoros e os seus efeitos sobre o estabelecimento das macroalgas em riachos tropicais. Em ambos experimentos, os resultados mostraram que a ocorrência das macroalgas está intimamente relacionada com a presença prévia das microalgas nos substratos dos sistemas estudados, sugerindo que as microalgas devem propiciar condições que favoreçam o surgimento das algas macroscópicas em um momento sucessional mais tardio. Neste sentido, os resultados indicam que micro e macroalgas compõem uma mesma comunidade de algas bentônicas que se sucedem em função do desenvolvimento da própria comunidade, de modo que as microalgas representam as colonizadoras iniciais e as macroalgas as sucessoras tardias.

Os resultados combinados dos Capítulos 1 e 2 incorporam informações relevantes para melhor compreender o padrão de distribuição espacial em pequena escala das assembleias de macroalgas lólicas, comumente descritos como sendo em “manchas” ou “mosaico”.

Neste contexto, algumas considerações que relacionam conhecimentos prévios e os resultados da presente tese são necessárias. Muitos ecólogos de riachos consideram os distúrbios como sendo o principal fator determinante da estruturação das comunidades bentônicas de riachos (Giller, 1996; Lake, 2000). Townsend & Hildrew (1994) definem distúrbio como qualquer evento capaz de remover os organismos do seu habitat, abrindo espaço e recursos para novos indivíduos. A natureza dos distúrbios que ocorrem em riachos pode variar largamente (Lake, 2000), sendo os mais comuns relacionados às condições da correnteza, limitação ou excesso de recursos (*e.g.*, atividade antrópica) ou a atividade de herbívoros. Independente da natureza, essas perturbações podem se dar de um modo espacialmente heterogêneo sobre a comunidade (Lake, 2000) e a remoção dos organismos pode ocorrer, conseqüentemente, em algumas áreas do substrato e não em outras. Tal relação entre distúrbios e a distribuição em manchas já está plenamente consolidada na ecologia de riachos e é perfeitamente aplicável ao recorrente padrão espacial em pequena escala das macroalgas de sistemas lólicos.

A presente tese, entretanto, acrescenta informações detalhadas e inovadoras sobre o processo de formação dos mosaicos de macroalgas no substrato. Por exemplo,

os resultados do Capítulo 1 e 2 mostram que quando a comunidade de algas bentônicas de riachos registra a ocorrência de espécies macroscópicas, especialmente as filamentosas, quer dizer que os substratos previamente colonizados por microalgas permaneceram um tempo suficiente sob condições ambientais minimamente suportáveis, as quais permitiram o avanço do processo sucessional pela comunidade. Neste contexto, é perfeitamente compreensível que a presença e ausência de macroalgas ao longo dos substratos de um riacho implica na coexistência de estágios sucessionais distintos da mesma comunidade de algas bentônicas, mesmo em locais muito próximos (considerando uma escala centimétrica, ou mesmo milimétrica). Assim, esse cenário não corresponde a manchas de macroalgas e manchas de microalgas separadamente distribuídas e, possivelmente competindo entre si por espaço ou recursos. A conexão sucessional entre micro e macroalgas sugere uma relação positiva entre esses componentes, os quais interagem de forma mais cooperativa do que competitiva.

Este novo corpo de informações pode ser importante para se reavaliar a compreensão de conceitos largamente aplicados às assembleias de macroalgas tropicais. Por exemplo, há pelo menos duas décadas, vários trabalhos têm relatado que, do ponto de vista sazonal, o período compreendido entre o outono e inverno, representa a época do ano com maior riqueza e abundância de macroalgas (Necchi & Pacoloto, 1993; Necchi *et al.*, 1995; Branco *et al.*, 2009; Tonetto *et al.*, 2012; 2014). Frequentemente, a explicação para este padrão sazonal está relacionada com as flutuações temporais de variáveis climáticas e/ou de parâmetros físicos e químicos da água. Com base nas informações da presente tese é possível incorporar também as relações biológicas a tais explicações. Assim, neste período do ano, além da baixa frequência de precipitações diminuir a força de arrasto sobre os talos macroscópicos, ela mantém o padrão do fluxo dos riachos mais estável, proporcionando condições ambientais (em pequena escala) adequadas ao desenvolvimento da comunidade por período de tempo maior do que as outras épocas do ano. Neste cenário, o período entre o outono e o inverno parece ser o mais adequado para que, após a colonização do substrato por microalgas, o processo sucessional conduza a comunidade de algas bentônicas até estágios de colonização mais tardios, caracterizados justamente pela presença das macroalgas.

Em resumo, é importante ressaltar aqui a íntima relação entre as micro e macroalgas presentes nas comunidades de algas bentônicas de riachos. As variações da estrutura dessas comunidades, na verdade, formam um contínuo espaço-temporal indissociável entre os componentes micro e macroscópico, que se relacionam ao longo

do processo de sucessão ecológica. Durante o processo sucessional, o nível de estabilidade das relações entre as algas bentônicas com as variáveis ambientais e com a biota coexistente, tanto no espaço como no tempo, determinam, em última análise, a típica distribuição em mosaico destas comunidades.

Por fim, a condução de trabalhos envolvendo abordagens mais integradoras a respeito das comunidades de algas bentônicas de riachos, incluindo tanto o componente micro como o macroscópico, permitiria o ecólogo de ambientes lóticos encontrar respostas mais consistentes sobre a relação dessas comunidades com as variações espaço temporais do ambiente.

Referências Bibliográficas

- Branco CCZ, Krupek RA & Peres CK. 2009. Distribution of stream macroalgal communities from the mid-western region of Paraná State, southern Brazil: importance of local scale variation. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 52: 379-386.
- Giller PS. 1996. Floods and droughts: the effects of variations in water flow on streams and rivers. *Dist. Rec. Ecol. Syst.* 1-19.
- Lake PS. 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J. N. Am. Benthol Soc.* 19(4): 573-592.
- Necchi OJr & Pascoaloto D. 1993. Seasonal dynamics of macroalgal communities in the Preto River basin, São Paulo, southeastern Brazil. *Arch. Hydrobiol.* 129: 231-252.
- Necchi OJr, Branco CCZ, Simões RCG & Branco LHZ. 1995. Distribution of stream macroalgae in northwest region of São Paulo State, southeastern Brazil. *Hydrobiologia.* 299: 219-230.
- Tonetto AF, Branco CCZ & Peres CK. 2012. Effects of irradiance and spectral composition on the establishment of macroalgae in streams in southern Brazil. *Ann. Limnol.-Int. J Limnol.* 48 (4): 363-370.
- Tonetto AF, Cardoso-Leite R, Peres CK, Bispo PC & Branco CCZ. 2014. The effects of habitat complexity and hydraulic conditions on the establishment of benthic stream macroalgae. *Fresh. Biol.* 59(8): 1687-1694.
- Townsend CR & Hildrew AG. 1994. Species traits in relation to a habitat templet for river systems. *Fresh. Biol.* 31(3): 265-275.

Apêndice A

Os Amostradores

A seguir são descritos os amostradores utilizados nos estudos experimentais envolvendo as investigações das interações biológicas relacionadas ao processo de estabelecimento das assembleias de macroalgas apresentados nos capítulos 1 e 2 da presente tese.

1. Descrição dos amostradores utilizados no estudo envolvendo a investigação das relações biológicas entre micro e macroalgas em ecossistemas lóticos tropicais relatada no Capítulo 1.

O amostrador utilizado no estudo do Capítulo 1 foi construído com materiais simples, de baixo custo e de fácil obtenção, tais como madeira, concreto e lâminas de vidro. O amostrador foi desenhado de modo a ter uma forma plana e espessura fina (ca. de 8 cm) para que as lâminas de vidro (semelhante às utilizadas em microscopia) destinadas a colonização algal permanecessem totalmente submersas, evitando, assim, danos ao desenvolvimento da comunidade algal por efeito de possível dessecação provocado pela emergência acidental dos amostradores. A base do amostrador foi constituída de uma placa de madeira de aproximadamente 50 cm de largura por 50 cm de comprimento e 4 cm de espessura. Sobre essa placa foram instaladas 14 tiras de madeira de 3 cm de largura ladeadas por canaletas, de modo que fosse possível uma fixação adequada e eficiente das lâminas nas tiras de madeiras, ao mesmo tempo que a passagem da água sobre o amostrador fosse livre (Figura 1A). Para a fixação das lâminas de vidro sobre as tiras de madeira, que serviram efetivamente como substrato a ser colonizado pelas algas, foram utilizadas presilhas de metal, que apesar de exercerem grande pressão de aperto sobre as lâminas, também são fáceis de serem removidas.

Após a instalação das lâminas de vidro nas tiras de madeira, a placa de madeira foi unida a uma placa de concreto de aproximadamente 20 kg e aproximadamente 4 cm de espessura, a fim de proporcionar a ancoragem e maior estabilidade ao amostrador (Figura 1B). Além disso, para reforçar a estabilidade, com o auxílio de um arame de aço galvanizado o conjunto foi preso a estruturas firmes (*e.g.*: troncos e rochas) localizadas nas margens do riacho.

Em cada riacho foi instalado um amostrador, contendo 100 lâminas de vidro (Figura 1C). Esse número de lâminas incluiu um excedente de aproximadamente 50% (32 lâminas) do que seria necessário para a realização de todo o programa amostral.

Esse procedimento foi adotado a fim de se evitar o comprometimento do estudo pela perda ocasional desses materiais.

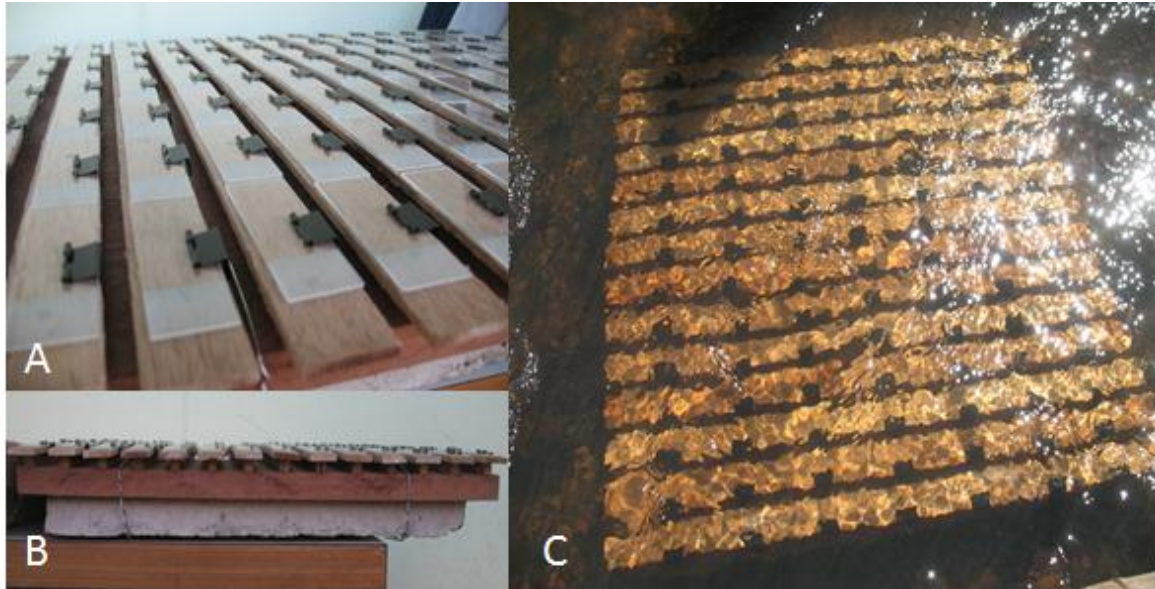


Figura 1. Ilustrações mostrando o amostrador utilizado para fixação das lâminas de vidro utilizadas como substrato artificial no experimento envolvendo a investigação das relações biológicas entre micro e macroalgas em ecossistemas lóticos tropicais. A) Detalhe do amostrador, mostrando as lâminas de vidro presas à base de madeira; B) detalhe do amostrador associado à placa de concreto; e C) visão de um amostrador instalado em um dos riachos utilizados no experimento.

2. Descrição dos amostradores utilizados no estudo envolvendo a investigação do efeito da herbivoria sobre a comunidade de algas bentônicas no estabelecimento das macroalgas em ecossistemas lóticos tropicais relatada no Capítulo 2.

O amostrador desenvolvido para ser utilizado nos experimentos descritos no Capítulo 2 da presente tese também foi construído com materiais simples, de fácil obtenção e baixo custo, tais como placa de madeira, placa de concreto, telas de malha fina, tiras de plástico e parafusos de aço. A base do amostrador foi constituída por uma placa de madeira (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 3 cm de altura), sobre a qual foram fixadas, por intermédio de pregos, tiras de plástico, tipo PVC, de cerca de 1,0 cm de largura paralelas umas em relações às outras, distando aproximadamente 3,0 cm. A distância entre as tiras de plástico (ca. de 3,0 cm) foi estabelecida como o espaçamento necessário para que lâminas de vidro, que serviram como o efetivo substrato artificial disponível para a colonização da comunidade de algas bentônicas, encaixassem-se e permanecessem bem fixas ao amostrador. Para garantir maior estabilidade na fixação do substrato artificial, foram instaladas tachinhas de metal adicionais nos espaços entre duas lâminas de vidro consecutivas.

Paralelamente à construção das bases de madeira, foram preparadas placas de concreto contendo orifícios de dimensões suficientes para a instalação de quatro parafusos de aço de aproximadamente 30 cm de comprimento. Os parafusos foram encaixados tanto na base de concreto como na placa de madeira com o uso de porcas de metal, de modo que foi criado entre essas duas partes do amostrador um espaçamento regulável que permitiu o ajuste da altura da placa de madeira tanto em relação ao fundo do riacho como em relação ao nível da coluna d'água (Figura 2A). Tal espaçamento regulável é importante para garantir que herbívoros bentônicos presentes no substrato natural não invadam os amostradores, além de permitir a submersão total do amostrador independentemente da profundidade da coluna d'água (Figuras 2C e 2D).

Após a união da placa de madeira com a base de concreto, foram instaladas cercas, utilizando-se telas de material plástico com malha de 0,5 mm de porosidade, a fim de separar-se os diferentes compartimentos experimentais necessários para o desenvolvimento do estudo. As cercas foram sustentadas por tiras de aço instaladas nos cantos da placa de madeira. Para manter as cercas esticadas e totalmente presas ao amostrador, foram utilizados grampeadores junto à base de madeira e um sistema de

amarração das telas nas tiras laterais (Figura 2B). Cada amostrador conteve 3 compartimentos (Figura 2C). Quatroze amostradores foram construídos de modo a compor 42 compartimentos: 21 sorteados para incluir os gastrópodes e os 21 restantes para compor o tratamento com ausência do herbívoro (Figura 2D).

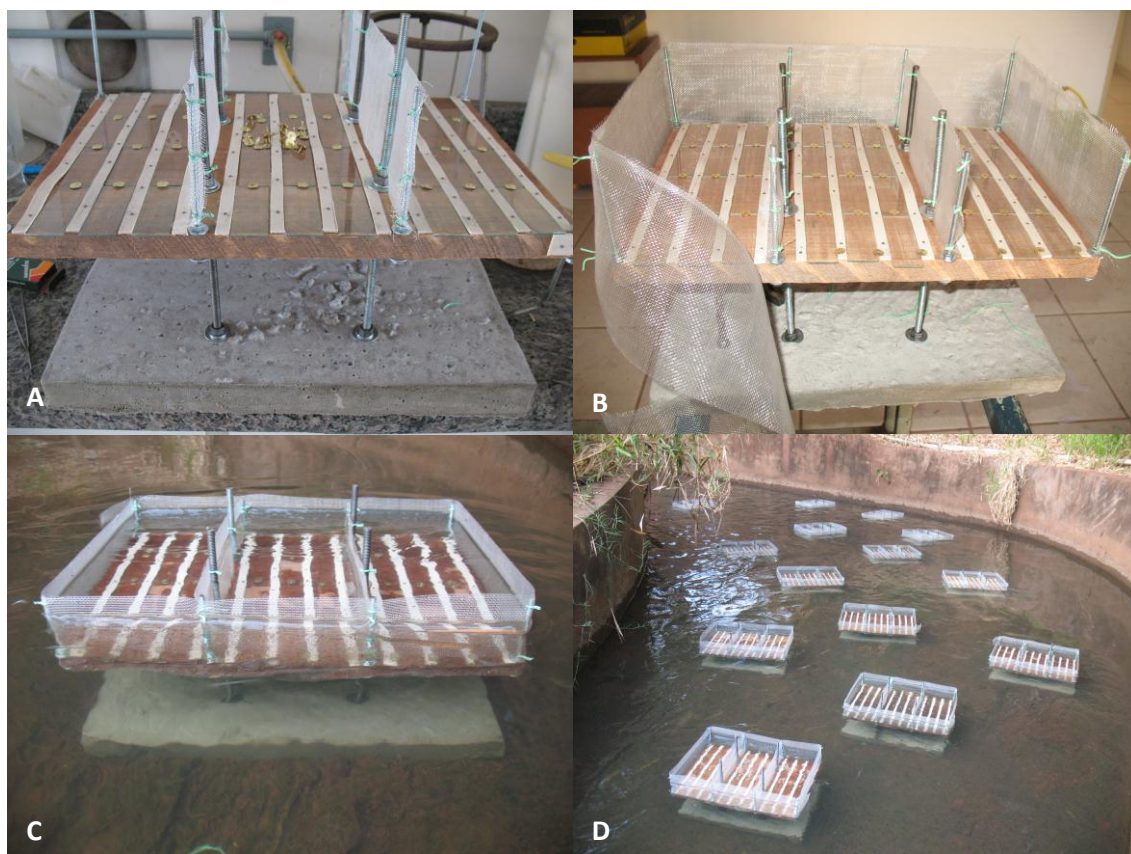


Figura 2. Ilustração dos amostradores usados no experimento envolvendo a investigação do efeito cascata da herbivoria sobre o estabelecimento das assembleias de macroalgas de riachos tropicais. (A) Detalhe do conjunto formado pela base de concreto e pela placa de madeira. (B) Detalhe do cercamento dos compartimentos experimentais, mostrando o modo de instalação das telas. (C) e (D) Ilustração dos amostradores já prontos e instalados no ambiente.

Apêndice B

Análises laboratoriais

1. Análises laboratoriais

As análises descritas aqui foram utilizadas na obtenção de dados dos dois estudos experimentais (Capítulos 1 e 2) apresentados na presente tese.

Após a coleta das lâminas no ambiente, elas foram estocadas em frascos cobertos com papel alumínio (a fim de garantir proteção do material contra a luz) e imediatamente acondicionadas em ambiente refrigerado para o transporte até o laboratório de Biologia Aquática da UNESP-Assis (Figura 1, A e B).

No laboratório, as lâminas coletadas com o objetivo de fornecer dados sobre os descritores da estrutura das comunidades foram removidas do ambiente refrigerado e imediatamente raspadas com auxílio de uma lâmina de barbear e jatos de água destilada. Esse procedimento foi invariavelmente realizado em um ambiente com baixa luminosidade. A solução resultante do processo de raspagem das lâminas retiradas de cada riacho em cada data foi ajustada para um volume de 150 mL e homogeneizada. A partir da solução homogeneizada foram separadas três amostras de 50 mL, uma a ser utilizada para a mensuração da clorofila-*a*, outra para a densidade dos organismos e a terceira para a análise taxonômica.



Figura 1. (A) Ilustrações dos frascos cobertos com papel alumínio onde foram estocadas as lâminas após a retirada dos riachos; e (B) ilustração do recipiente refrigerado onde os frascos com as lâminas foram mantidos durante o transporte dos riachos ao Laboratório de Biologia Aquática da UNESP-Assis.

1.1. Clorofila-*a*

As amostras destinadas ao cálculo da clorofila-*a* foram imediatamente filtradas em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F (0,6-0,7 μm de porosidade), com auxílio de uma bomba a vácuo, sob baixa pressão (0,5 atm) e em ausência de luz direta. Os filtros contendo material retido foram inseridos em tubos de ensaio com tampa esmerilhada contendo 10 mL de etanol 90%, um solvente utilizado na extração da clorofila-*a* sem maceração (Nush & Palme, 1975; Sartory & Grobollar, 1984). Os tubos contendo os filtros mergulhados em etanol 90% foram cobertos com papel alumínio para impedir a incidência direta de luz e, então, levados ao banho-maria (78 °C) por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para um recipiente com gelo durante 5 minutos e, então, mantidos sob refrigeração em uma geladeira por um período de 24 horas. Ao fim desse procedimento as amostras estavam prontas para serem analisadas em espectrofotômetro, no qual são obtidos os valores de absorbância para o cálculo da clorofila-*a* propriamente dito. A leitura espectrofotométrica das amostras processadas seguiu o método monocromático de Lorenzen (1967), descrito em Golterman *et al.* (1978) e Wetzel & Likens (1991). A mesma foi realizada em um espectrofotômetro, marca Femto, modelo 700 Plus, em dois comprimentos de onda (665 nm e 750 nm), antes e após acidificação das amostras. A acidificação foi realizada através da adição de HCl 1 M até que o pH das amostras atingisse um valor entre 2,6-2,8. Após cinco minutos da adição do ácido clorídrico, as leituras das amostras foram repetidas para os dois comprimentos de onda.

Os cálculos para a determinação do conteúdo de clorofila-*a* seguiram as equações propostas por Golterman *et al.* (1978).

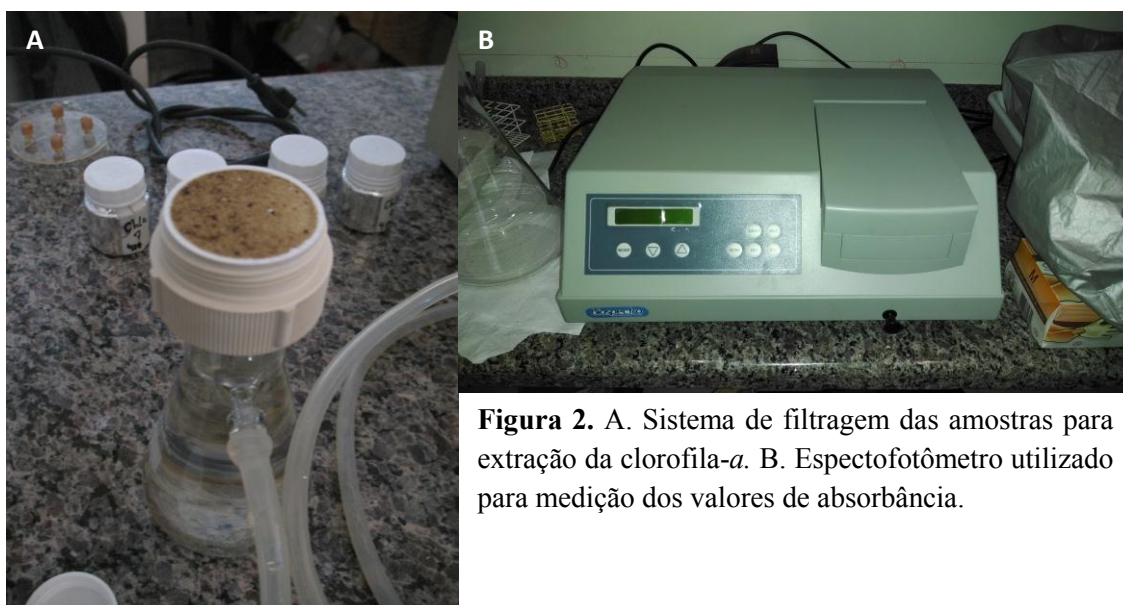


Figura 2. A. Sistema de filtragem das amostras para extração da clorofila-*a*. B. Espectrofotômetro utilizado para medição dos valores de absorbância.

1.2. Densidade

As amostras destinadas para o cálculo da densidade da comunidade foram imediatamente fixadas em solução de lugol acético 0,5%, e mantidas em escuro em temperatura ambiente até a realização das análises (Bicudo, 1990). A quantificação seguiu o método de Utermöhl (1958) e o tempo de sedimentação das amostras nas câmaras seguiu instruções de Lund *et al.* (1958), sendo de 18 h para cilindros de 100 mL, 3 h para os de 10 mL e 1 h para os de 1 mL; ou seja, de três horas para cada centímetro de altura da câmara. Em sequência, a contagem dos indivíduos foi realizada pela análise de transectos horizontais e verticais, sendo que o número mínimo de campos analisados por amostra é determinado pela contagem de no mínimo 100 indivíduos da espécie mais frequente associado a uma curva de rarefação de espécies. A equação para o cálculo da densidade populacional seguiu o proposto por Ros (1979). Foram consideradas espécies abundantes as que superaram a densidade média de cada amostra (Lobo & Leighton, 1986).

1.3. Identificação taxonômica

As amostras destinadas para a identificação taxonômica foram imediatamente fixadas em solução de formalina 4% (Bicudo, 1990) e mantidas em escuro em temperatura ambiente até a realização das análises (Bicudo, 1990). A identificação taxonômica das amostras foi realizada com o auxílio de um microscópio trinocular, marca Leica, modelo DM 1000, com magnitude de aumento de até 2.000x. Para as análises morfométricas foi utilizado um sistema de captura de imagens composto de câmera de vídeo Leica, modelo DFC280, acoplada a um microcomputador com o *software* Leica LAS Interactive Measurements, específico para análise de imagem.

Importante salientar aqui a ajuda de pesquisadores especializados em estudos com assembleias de microalgas. Thiago Rodrigues dos Santos do Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Ecologia, Laboratório da Professora Carla Ferragut. Thiago auxiliou com o reconhecimento das espécies de microalgas. Além disso, a identificação, em nível de espécie das diatomáceas, foi realizada no laboratório de ficologia da UFPR, com o auxílio da pesquisadora Priscila Izabel Tremarin e Thelma Ludwig.

1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras destinadas ao procedimento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permaneceram fixadas em solução de lugol 0.5%. Para adquirir as fotografias com MEV as amostras passaram por um processo de desidratação. Tal processo consistiu da passagem sequencial das amostras em soluções crescentes de acetona, por um período de 10 minutos em cada uma (30, 40, 50, 70 e 90%). Após tal procedimento, o material foi levado ao equipamento responsável pela obtenção do ponto crítico de CO₂ (CPD 030 Balzers, Figura 2). Sucintamente, esse aparelho aplica CO₂ líquido em uma câmara isolada contendo a amostra e, após algumas lavagens em meio ainda líquido (temperatura variando de 0 a 5 °C), aumenta-se a temperatura para 40-45 °C. Nesse momento, o aumento da temperatura provoca o aumento da pressão da câmara, fazendo com que a solução converta-se para gás, atingindo, assim, o ponto crítico e a desidratação total da amostra.

Em sequência, as amostras podem ser metalizadas através do sistema de “sputtering” no metalizador SCD 050 Bal Tec. Ao final desse processo, as amostras adquirem uma película de ouro cobrindo toda sua extensão. Tal película permite a varredura da amostra com feixes de elétrons em câmara a vácuo no microscópio eletrônico de varredura (LEO435-VP). Foram registradas fotografias em aumentos semelhantes entre todas as amostras, de modo a representar a estrutura da comunidade em uma mesma escala. Ainda, para isso, não adotamos um aumento muito grande, mas sim um aumento que permitisse uma visão mais panorâmica da comunidade. Toda a metodologia referente ao MEV foi realizada no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, Esalq, Piracicaba, São Paulo.



Figura 3. A. Equipamento utilizado para obtenção do ponto crítico de CO₂. B. Imagem ilustrativa das amostras metalizadas e prontas para registro fotográfico em MEV. C. Microscópio eletrônico de varredura utilizado para obtenção das fotos.

1.5. Porcentagem das macroalgas

A quantificação, especialmente das macroalgas, foi baseada na técnica descrita por Tonetto *et al.* (2012), a qual mensura a porcentagem de cobertura de macroalgas em substratos artificiais. O procedimento é similar aqueles utilizados em outras áreas de pesquisa científica, que são baseadas em análise de imagens digitais, como os que avaliam a área foliar das plantas (Godoy *et al.*, 2007; Rico-Garcia *et al.*, 2009) ou a cobertura do dossel de áreas florestadas (Canham, 1988; Englund, 2000).

A técnica consiste basicamente de registros fotográficos dos substratos em que as algas estão aderidas. As imagens devem ter uma alta resolução para garantir uma boa visualização das algas presentes no substrato. Para a padronização, as fotos foram tomadas com a câmera a 15 cm de altura das lâminas colonizadas. Para ajudar na análise de imagens no laboratório, mapeamos as lâminas em notas de campo. Isso é muito útil para procurar por espécies em determinadas imagens. O processo leva menos de 5 minutos de modo a evitar danos para as comunidades de algas devido à dessecação.

Após esse procedimento, as fotos dos substratos artificiais foram analisadas por meio de um *software* (AutoCad®), com o objetivo de quantificar a comunidade e cada espécie individualmente. Para isso, a área de colonização para cada espécie (em cada fotografia) foi marcada e avaliada em termos de porcentagem da área total do substrato (ver Figura 2). A fim de calibrar o método de quantificação, estabelecemos a mesma escala para todas as imagens.

Esse método é mais preciso para determinar a área ocupada pela flora de macroalgas, o que representa um avanço quando comparado à técnica de estimativa visual, comumente aplicada. Embora a análise de cobertura percentual seja um método semi-quantitativo, ele não é destrutivo, o que garante ausência da perda de biomassa algal. Dessa forma, o acompanhamento da variação temporal das assembleias de macroalgas é mais realista, já que a mesma comunidade é periodicamente avaliada em vez de diferentes amostras coletadas em datas separadas.

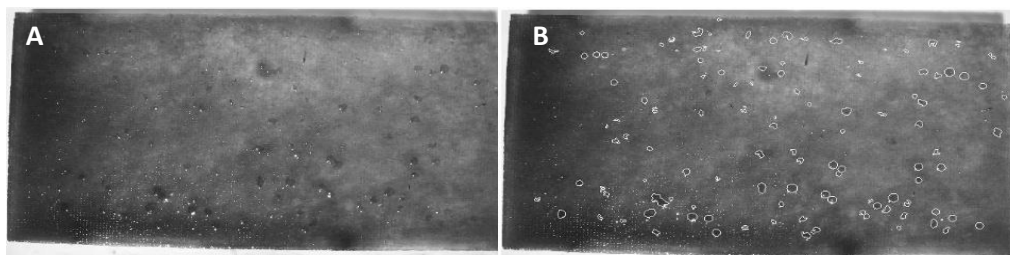


Figura 4. A. Lâmina contendo espécimes de macroalgas. B. Espécimes marcados para mensuração da área.

Referências

- Bicudo DC. 1990. Considerações sobre metodologias de contagem de algas do perifiton. *Acta Limnol. Bras.* 3: 459-475.
- Canham CD. 1988. An index of understory light levels in and around canopy gaps. *Ecology*. 69: 1634-1703.
- Englund SR, O'Brien JJ & Clark DB. 2000. Evaluation of digital and film hemispherical photography and spherical densiometry for measuring forest light environments. *Can. J. For. Res.* 30: 1999-2005.
- Godoy LJG, Yanagiwara RS, Bôas RLV, Backes C & Lima CP. 2007. Análise da imagem digital para estimativa da área foliar em plantas de laranja "Pêra". *Rev. Bras. Frutic.* 29(3): 420-424.
- Golterman HL, Clymo RS & Ohmstad MAM. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. 2ª edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications. International Biological Program. 213p.
- Lobo E & Leighton G. 1986. Estructuras de las fitocenosis planctônicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. *Rev. Biol. Mar.* 22(1): 143-170.
- Lorenzen CJ. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- Lund JWG, Kipling C & Lecren ED. 1958. The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*. 11: 143-170.
- Nush EA & Palme G. 1975. Biologische Methoden für die Praxis der Gewässeruntersuchung. Bestimmung des Chlorophyll a und Phaeopigmentgehaltes in Oberflächenwasser. *GFWasser/Abwasser*. 116: 562-565.
- Rico-García E, Hernández-Hernández F, Soto-Zarazúa GM & Herrera-Ruiz G. 2009. Two new Methods for the Estimation of Leaf Area using Digital Photography. *Int. J. Agr. Biol.* 11(4): 397-400.
- Ros J. *Prácticas de Ecología*. Barcelona. Ed. Omega, 1979. 181p.

- Sartory DP & Grobbelaar JE. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*. 114: 177-187.
- Utermöl H. 1958. Zur Vervollkommen der quantitative phytoplankton: methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9:1-38.
- Wetzel RG & Likens GE. 1991. *Limnological Analyses*. New York: Springer Verlag. 331p.