

Tiago Nascimento Bernabé

Influência do Aquecimento nas Interações entre Detritívoros e
Decompositores Aquáticos e no Funcionamento do Ecossistema
Bromelícola

São José do Rio Preto
2014

Tiago Nascimento Bernabé

Influência do Aquecimento nas Interações entre Detritívoros e
Decompositores Aquáticos e no Funcionamento do Ecossistema
Bromelícola

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Ecologia e Comportamento, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Quevedo
Romero

São José do Rio Preto
2014

Bernabé, Tiago Nascimento.

Influência do aquecimento nas interações entre detritívoros e decompositores aquáticos e no funcionamento do ecossistema bromelícola / Tiago Nascimento Bernabé. – São José do Rio Preto, 2014

76 f. : il., gráfs, tabs.

Orientador: Gustavo Quevedo Romero

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia aquática. 2. Ecossistemas aquáticos. 3. Plantas - Efeito da temperatura. 4. Mudanças da temperatura global. 5. Bromélia. 6. Biodegradação. I. Romero, Gustavo Quevedo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Data da defesa: 27/03/2014

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

PROF. DR. Gustavo Q. Romero (Orientador) _____

Universidade Estadual de Campinas

PROF. DR. José Francisco Gonçalves Júnior _____

Universidade de Brasília

PROF. DR. Vinícius Fortes Farjalla _____

Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUPLENTE

PROF. DR. José Roberto Trigo _____

Universidade Estadual de Campinas

PROF. DRA. Simoni Aparecida Vieira _____

Universidade Estadual de Campinas (NEPAM)

AGRADECIMENTOS

Eu não conseguiria terminar esta dissertação se não tivesse a ajuda de muitas pessoas, portanto gostaria de agradecer imensamente a todos que de alguma forma contribuiu para a execução deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

À Maria da Penha, Ednei, Felipe, Eduardo, Márcia, Soraria, Didi, Marquinhos e demais familiares pelos votos de confiança e incentivo sempre.

Ao Prof. Dr. Gustavo Quevedo Romero que aceitou me orientar e teve paciência para lidar com as minhas limitações. A você Gustavo, agradeço por disponibilizar parte do seu tempo com algumas conversas e discussões sobre ecologia.

Aos moradores e funcionários da Ilha do Cardoso por estarem sempre dispostos a ajudar principalmente prestando auxílio quando minha glicose baixava durante o trabalho de campo.

Ao Jonas, proprietário da Casa Verde Hostel e Camping por me receber durante quatro meses e partilhar bons momentos de cerveja, futebol.

À Prof^a. Valéria Maia, doutoranda Virgínia e Viviane Piccin, pelas análises microbiológicas.

Aos meus amigos do departamento de Biologia Animal principalmente pelos momentos de descontração fundamentais durante esses dois anos.

Aos amigos de São José do Rio Preto: Felipe, Zezão, Elizeu e Michel por me receberem sempre que precisava passar um tempo em Rio Preto.

Aos colegas de laboratório Gustavo Cauê, Andressa, Bárbara, Alexandre Supertramp, Décio, Ana Z, Thais, Fátima, Sandra, Adriano Magrelo pelo apoio na execução do

experimento e nas discussões de laboratório ou de bar mesmo, de onde saíram algumas ideias para este trabalho.

À Aline (Fish) por discutir a metodologia a ser realizada com as bactérias e a Tânia do laboratório de Engenharia de Alimento da UNESP por me auxiliar nos teste de antibiograma.

À Camila Vieira por sempre estar disponível para discutir meus dados de DGGE, mesmo quando estava muito ocupada.

Ao Pablo Antiqueira, pelas boas discussões e sugestões para desenvolver o meu trabalho e pela ajuda no campo.

Ao Gustavo Migliorini “Talharini” pela parceria incondicional, ajudando sempre no campo e na reta final da dissertação.

À Paula Omena uma amiga que nunca me deixou na mão, mesmo quando estava muito ocupada. Agradeço pelo estímulo e pelo suporte nos últimos dias de escrita.

Ao grande amigo e irmão Thiago Gonçalves Souza “Toyoyo”, por sempre apostar em mim e sempre estimular a minha formação. Obrigado pelas discussões, muitas vezes regadas a boas cervejas e pelo suporte irrestrito no fim da dissertação.

Às pessoas que posso ter esquecido sem querer.

Este projeto foi financiado pela CAPES e FAPESP.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO ÚNICO	1
2	INTRODUÇÃO	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
	<i>Área de estudo e organismos</i>	12
	<i>Desenho experimental</i>	15
	<i>Definição e controle dos valores de temperatura (parcela principal)</i>	16
	<i>Definição dos tratamentos das subparcelas</i>	17
	<i>Efeito no funcionamento do ecossistema</i>	17
	<i>Variáveis físico-químicas</i>	19
	<i>Quantificação de micro-organismos</i>	19
	<i>Emersão e sobrevivência de macro-organismos (detritívoros)</i>	21
	<i>Análise estatística</i>	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÃO	31
	LITERATURA CITADA	32
	TABELAS	43
	LEGENDAS DAS FIGURAS	46
	APÊNDICES	58

CAPÍTULO ÚNICO

Influência do Aquecimento nas Interações entre Detritívoros e Decompositores Aquáticos e no Funcionamento do Ecossistema Bromelícola

Tiago N. Bernabé & Gustavo Q. Romero

RESUMO

A temperatura interfere no metabolismo da maioria dos organismos, principalmente ectotérmicos, e afeta conseqüentemente as taxas biológicas, consumo de alimento, crescimento e tempo de desenvolvimento. Esta relação estreita da temperatura com metabolismo é responsável por afetar direta e indiretamente a maioria dos processos ecossistêmicos como, por exemplo, a decomposição, que é um processo chave no funcionamento de ecossistemas aquáticos. Entretanto, os efeitos combinados da temperatura e de macro- e micro-organismos na decomposição e reciclagem de nutrientes ainda estão pouco conhecidos. Neste trabalho procuramos entender se o aumento da temperatura em 4°C em relação a média natural (previsão de aquecimento global para 2100) afeta as relações entre macro- e micro-organismos, bem como sua sobrevivência e seus efeitos para a ciclagem de nutrientes via decomposição de detritos em fitotelmatas de bromélias. Para entender o efeito do aquecimento no sistema aquático bromelícola focamos (i) na sobrevivência e emersão de três espécies de detritívoros pertencentes a três grupos funcionais distintos, (ii) nas comunidades de bactérias e concentração de algas (representantes da base das cadeias alimentares baseadas em detritos e plantas, respectivamente teias alimentares “brown” e “green”), (iii) na interação entre macro- e micro-organismos e (v) funcionamento do ecossistema (decomposição de detritos, produção primária e matéria orgânica colorida dissolvida – MOCD). Observamos efeito negativo do aquecimento sobre a sobrevivência dos detritívoros *Phylloicus bromeliarum* (52,65%) e *Polypedilum marcondesi* (41,65%). Na presença de detritívoros a densidade de bacteriana aumentou em 75%, ao passo que o aquecimento reduziu sua densidade em 33%. A estrutura da comunidade bacteriana foi alterada pela temperatura e pela presença dos detritívoros. A concentração de algas está positivamente relacionada com a presença dos detritívoros e bactérias. A decomposição e produção de MOCD não foram afetadas pela temperatura, porém a atividade bacteriana foi responsável pela diminuição de 60% da matéria orgânica e 30% MOCD. . A atividade bacteriana na decomposição é tão eficiente quanto a atividade combinada dos detritívoros e bactérias. O efeito negativo na sobrevivência e emersão de alguns

detrítivos e na densidade de bactérias demonstra que o aquecimento previsto para 2100 pode ter ultrapassado a temperatura ótima dos organismos, podendo refletir nas modificações da composição da comunidade bacteriana. Em sistema contendo detritívoros e bactérias, a atividade destes dois grupos facilitou a disponibilidade de nutrientes favorecendo uma maior produtividade das algas. Nossos resultados indicam que a temperatura é importante na determinação da comunidade bacteriana e que a atividade desses micro-organismos são cruciais para o funcionamento do ecossistema aquático contribuindo para a manutenção das teias alimentares “brown” e “green” .

Palavras-chave: *temperatura, detritívoros, bactérias, decomposição, funcionamento ecossistêmico.*

ABSTRACT

Temperature affects the metabolism of the majority of organisms, especially the ectotherms and, consequently affects the biological rates, food consumption, growth and development time of organisms. The relationship between temperature and metabolism of organisms affect most of the ecosystem processes, such as decomposition, which is a key functional mechanism in aquatic ecosystems. However, the relationship between temperature and the effects of macro and microorganisms on decomposition is still less understood. In this study, we sought to understand whether a 4°C temperature increase (expected global warming for 2010) affects the relationship between macro and microorganisms, as well as the survival and the consequent effects for the nutrient cycling via detritus decomposition in bromeliad phytotelmata. In order to understand the effects of warming in aquatic bromeliad ecosystem we investigated (i) the survival and adult emergence of detritivore insects from three different functional groups, (ii) the community structure of bacteria (component of the brown food web) and algal concentration (component of the green food web), (iii) the interaction between macro and microorganisms and (iv) the functioning of ecosystem (detritus decomposition, primary production and colored dissolved organic matter - CDOM). We found a negative effect of warming on the survivor of detritivore *Phylloicus bromeliarum* (52,65%) and *Polypedilum marcondesi* (41,65%). The density of bacteria increased 75% in the presence of detritivore, whereas the bacteria density reduced 33% in the presence of detritivore and increase of temperature. The structure of bacteria community was affected by the warming and presence of detritivore. Algae concentration was positively related to the presence of detritivore and bacteria. Decomposition and CDOM production were not affected by the warming; however, the bacterial activity reduced in 60% the organic matter and in 30% MOCD. The bacterial activity on decomposition was as efficient as the combined activity of detritivore and bacteria. The negative effect of warming on the survival of detritivore and adult emergence and, also on the density of bacteria demonstrate that the predicted increase in temperature for 2100 can exceed

the optimum of the organism's temperature, which can mediate changes in bacteria community. We suggest that the presence of detritivore and bacteria increases the availability of nutrients favouring algae productivity. Our results indicate that temperature is important for bacteria community. Moreover, the activity of microorganisms is crucial for the functioning of aquatic ecosystem (decomposition), and also for the maintenance of green and brown food webs.

Keywords: temperature, detritivore, decomposition, bacteria, ecosystem functioning.

INTRODUÇÃO

Compreender as respostas biológicas diante dos impactos causados por mudanças climáticas requer a identificação de como os parâmetros climáticos (e.g. precipitação, temperatura, ventos e correntes oceânicas) afetam desde o crescimento dos organismos até a estrutura de populações e comunidades (IPCC 2007; Staudinger et al. 2012). Por exemplo, as mudanças do clima podem causar alterações na distribuição (Parmesan et al. 1999, Araújo & Luoto, 2007), abundância (Pounds et al. 2006, Hart & Gotelli 2011), e fenologia (Crick et al. 1997) de organismos bem como modificações em estrutura de habitats (O'Connor et al. 2007) e dinâmica de comunidades (Petchey et al. 1999; Lensing & Wise 2006). As respostas biológicas às alterações no clima podem ser idiossincráticas, baseadas em características morfológicas, fisiológicas e comportamentais dos organismos (Bellard et al. 2012; O'Connor et al. 2012), portanto dependem das alterações climáticas. Tem sido demonstrado que algumas espécies respondem positivamente as modificações do clima e se ajustam às mudanças, enquanto outras espécies têm resposta negativa e declinam (Staudinger et al. 2012). Em geral, os estudos têm demonstrado que a temperatura representa um dos principais causadores de modificações direta e indireta no meio biótico (Petchey et al. 1999; Daufresne et al. 2009; Hart & Gotelli 2011). As previsões de mudanças neste parâmetro climático para o ano de 2100, no Brasil, indicam um aumento de 2 – 6 °C na temperatura média (IPCC 2007; Marengo 2007).

O aumento na temperatura acelera o metabolismo dos organismos e esta nova demanda metabólica pode ocasionar um maior consumo de recursos, além de acelerar o desenvolvimento dos indivíduos, afetando desse modo sua associação com outros

organismos e com o meio (Brown et al. 2004; Barton 2010). De fato, como previsto na teoria metabólica, a variação na taxa metabólica (i.e., taxas de troca de energia e matéria) é uma informação essencial para entender a dinâmica dessas interações entre organismos e entre os organismos e seus ambientes (Brown et al. 2004, Sibly et al. 2012). A maioria dos organismos aquáticos é ectotérmico, que possui taxas metabólicas determinadas principalmente pela temperatura e tamanho corporal (Woodward 2009, Woodward 2011). Por exemplo, Fraus et al. (2002) observaram uma diminuição no tempo de desenvolvimento e tamanho corporal em larvas de *Chironomus crassicaudatus* (Chironomidae) quando submetidos a temperaturas elevadas. Assim como as modificações do clima (e.g., aumento da temperatura) afetam a distribuição de macro-organismos, estudos recentes demonstraram diversos efeitos nas comunidades de micro-organismos (Flury & Gessner 2011, Dang et al. 2009). Em geral, micro-organismos são dependentes da temperatura, pois a taxa metabólica responde rápida e positivamente ao aumento da temperatura (Sibly et al. 2012). Por exemplo, tem sido demonstrado que a temperatura afeta a densidade, biomassa e tamanho celular de fungos e bactérias (Daufresne et al. 2009; Hoekman 2010; Flury & Gessner 2011). Alguns estudos evidenciam que a taxa metabólica e a estequiometria explicam, conjuntamente, que a variação em características abióticas (e.g., temperatura, disponibilidade e demanda de nutrientes nitrogênio, fósforo, carbono) podem modificar a composição química dos organismos devido a mudanças na alocação dos nutrientes nas células e desta forma causar efeitos em cadeia para todo um ecossistema (Sterner & Elser 2002; Sardans et al. 2012; de Senerpont Domis et al. 2014).

Esta relação entre princípios físicos, químicos e biológicos formam o pilar da Teoria Metabólica da Ecologia e essas relações empíricas são utilizadas amplamente para caracterizar padrões e entender processos de diversas áreas da ecologia (Sibly et al. 2012; Ott et al. 2012). Utilizar organismos ectotérmicos e com tamanho corporal pequeno, desta forma, podem ser ferramentas interessantes e relevantes para o entendimento de questões e processos ecológicos envolvendo fatores bióticos e abióticos (Woodward et al. 2011). Dossena et al. (2012) demonstraram que o aumento de 4°C pode alterar profundamente o tamanho e estrutura de comunidades aquáticas, modificando a biomassa de diferentes grupos tróficos, além de perturbar a sucessão fenológica da comunidades de macro-invertebrados. Estes efeitos passam a afetar processos ecossistêmicos como a decomposição e refletem desta forma no funcionamento do ecossistema (FE). Recentemente, trabalhos como o de Dossena et al. (2012) passaram a avaliar os efeitos do aquecimento nos padrões de diversidade e distribuição de macro- e micro-organismos, evidenciando que as alterações geradas sobre estas propriedades ecossistêmicas podem afetar processos que direcionam o FE (Petchey et al. 1999; Hart & Gotelli 2011; Greig et al. 2012).

Para entender o FE é necessário conhecer os processos e propriedades que estão agindo nos ecossistemas. Propriedades são componentes de uma medida de estado do ecossistema como riqueza de espécies, biomassa disponível, resistência e resiliência diante de perturbação (Hooper et al. 2005; Naeem 2009; Stachowicz et al. 2007). Processos ecossistêmicos englobam fluxos biogeoquímicos de energia e matéria dentro e entre os ecossistemas, dentre os principais estão, a produção de biomassa, decomposição, respiração, mineralização e ciclagem de nutrientes (Naeem 2009; Hector

& Wilby 2009). Em ecossistemas aquáticos os processos de decomposição e ciclagem de nutrientes são considerados medidas-chaves para o FE (Woodward et al. 2011, O’Gorman et al. 2012). As participações de macro- e micro-organismos nestes processos são muito importantes em ecossistemas aquáticos, bem como as inter-relações entre estes dois grupos (Gessner et al. 2010). Os micro-organismos (i.e. bactérias e fungos) iniciam o processamento da (MO) realizando o condicionamento do detrito, quebrando os compostos complexos (i.e. recalcitrantes) e disponibilizando o detrito em condições lábeis, facilitando o processamento pelos detritívoros (Webster et al. 1986; Gessner et al. 1999). Os detritívoros passam a contribuir na fragmentação do particulado grosso e disponibilização do particulado fino no sistema, além de contribuir com a dispersão dos micro-organismos sobre os fragmentos (Cummins et al. 2005; Prather et al. 2013). Por fim, a microbiota volta a agir no sistema, porém desta vez interagindo com os produtores primários, via facilitação e/ou competição, pois a mineralização da matéria orgânica dissolvida disponibiliza nutrientes essenciais tanto para a microbiota como para as algas (Daufresne & Loreau 2011). Esta atividade microbiana é capaz de promover a conexão entre a teia alimentar baseada em detritos “brown” e a teia baseada em plantas “green” (Butler et al. 2008). Outros estudos também demonstram que interações bióticas como predação, competição e facilitação podem atuar como mecanismos controladores, responsáveis por modificar processos ecossistêmicos direta ou indiretamente, levando a alterações ou estabilidade do FE (Feminella & Resh 1991; Cardinale et al. 2002; Daufresne et al. 2009; Starzomski et al. 2010). Porém, poucos trabalhos avaliaram como estas relações podem ser afetadas por componentes abióticos (e.g. aquecimento). Além disso, a maior parte dos estudos utilizou micro-organismos

como organismos modelo (Petchey et al. 1999; Dang et al. 2009; Flury & Gessner 2011), ao passo que até onde sabemos nenhum estudo abordou o efeito do aquecimento sobre a interação entre macro- e micro-organismos e qual o papel relativo de ambos no FE aquáticos.

Um dos grandes desafios para estudos em sistemas de água doce é trabalhar com ferramentas capazes de detectar os impactos do aquecimento em sistemas naturais complexos, com múltiplas escalas e níveis de organização (Woodward 2010). A maioria dos estudos abordando FE e aquecimento são conduzidos em microcosmos artificiais em laboratório (Petchey et al. 1999; Petchey 2000; Dang et al. 2009), poucos são realizados em sistemas naturais (Hogg et al. 1995; Barlocher et al. 2008). Portanto, para avaliarmos o efeito da temperatura sobre macro- e micro-organismos, bem como sobre as interações entre organismos e ecossistema, utilizamos microcosmos naturais em bromélias. Nos trópicos, as bromélias abrigam um importante ecossistema aquático baseado em detritos, onde os detritos em forma de folhas geralmente são a principal fonte de energia que sustenta uma enorme gama de macro e micro-organismos (Benzing 200; González et al. 2013; Dèzerald et al. 2014). Srivastava et al. (2004) ressaltam que microcosmos naturais são tão versáteis como os microcosmos artificiais, porém tão complexos e biologicamente realistas quanto os outros sistemas naturais. Microcosmos naturais, portanto, mostram potencial para pesquisas sobre biodiversidade e funcionamento do ecossistema.

Embora nenhum trabalho tenha utilizado bromélias para testar efeito de aquecimento em ecossistemas aquáticos, trabalhos recentes utilizando bromélias como modelo de microcosmo natural vêm respondendo questões ecológicas importantes sobre

FE. Por exemplo, tamanho do habitat afeta produção primária e ocorrência de predadores (Srivastava et al. 2008; Marino et al. 2011), incidência de luz e entrada de detritos determina diversidade de macroinvertebrados (Dèzerald et al. 2014), algas como complemento alimentar em uma “brown food web” (Brouard et al. 2011), bactérias aumentam a absorção de nutrientes em bromélia e são afetadas pelo pH (Goffredi et al. 2011; Gonçalves et al. 2014). Portanto, decidimos utilizar esta ferramenta em conjunto com os organismos ectotérmicos e de tamanho corporal pequeno, para esclarecer questões envolvendo aquecimento e processos ecossistêmicos em um ecossistema aquático. No presente trabalho, utilizamos larvas aquáticas de artrópodes detritívoros e micro-organismos (i.e. bactérias e algas), que vivem associados aos fitotelmatas de bromélias, para testarmos o efeito do aquecimento de 4°C em relação a média natural na: (1) sobrevivência e emersão (i.e. indivíduo que completou o desenvolvimento até a forma adulta) de detritívoros, (2) densidade e composição bacteriana e na (3) Decomposição. A teoria metabólica destaca que o aumento na temperatura promove um aumento exponencial nas reações bioquímicas, taxas metabólicas e demais atividades biológicas (Brown et al. 2004). Portanto, esperamos que a aceleração do metabolismo nos detritívoros, bactérias e algas, aumente a demanda por recursos, além de acelerar o tempo de desenvolvimento e crescimento dos organismos, o que pode afetar a sobrevivência dos mesmos. A sensibilidade a mudanças de temperatura dos organismos ectotérmicos e as possíveis interações de facilitação entre macro- e micro-organismos no sistema bromelícola sugerem que o processamento da matéria orgânica será maior em temperatura aquecida, o que favorece maior disponibilidade e aproveitamento de nutrientes por parte dos organismos

envolvidos incluindo as bromélias (Fig.1). Nossas hipóteses são: (1) Detritívoros em temperatura elevada têm maior sobrevivência e emersão, (2) Aquecimento beneficia bactérias e algas, (3) A atividade bacteriana na decomposição é mais importante do que as atividades dos detritívoros, (4) A decomposição é maior em bromélias aquecidas. Especificamente buscamos responder as seguintes perguntas: (i) A temperatura altera os parâmetros físico-químicos (pH e MOCD) presentes na água das bromélias? (ii) O aquecimento aumenta a sobrevivência e emersão de detritívoros? (iii) O aquecimento modifica a composição e aumenta a densidade bacteriana, bem como aumenta a concentração de algas nas bromélias? (iv) A atividade bacteriana no processamento da matéria orgânica em bromélias é mais relevante do que os detritívoros? (v) O aquecimento aumenta a decomposição no fitotelmata das bromélias?

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e organismos

Realizamos este estudo em uma área de restinga fechada no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), município de Cananéia, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo (25°03'S, 48°05'W). O clima da região não possui estação seca definida, com precipitação média anual de 3.000 mm (Funari *et al.*, 1987) e temperatura média anual de 21°C (Moraes & Domingos, 1997). A restinga fechada caracteriza-se pela presença de dossel contínuo e árvores com aproximadamente 9 m de altura, grande quantidade de epífitas e estrato herbáceo composto predominantemente por bromélias e

orquídeas (Bernardi *et al.*, 2005). Utilizamos a bromélia *Quesnelia arvensis* Mez. (Bromeliaceae) que é uma das espécies mais abundantes da restinga fechada. Esta espécie abriga uma grande diversidade de artrópodes aquáticos em seus fitotelmatas, principalmente larvas de insetos de diversos grupos funcionais como detritívoros fragmentadores (e.g., Tipulidae e Trichoptera), raspadores (Scirtidae), coletores (e.g., Chironomidae, Syrphidae, Psychodidae), e filtradores (e.g., Culicidae) (Romero & Srivastava 2010). Além dos macroinvertebrados, são encontrados micro-organismos como bactérias, fungos e algas (Romero & Srivastava 2010; González *et al.* 2013; G. Q. Romero e D. Srivastava, dados não publicados).

Antes da realização do experimento coletamos artrópodes, nos tanques das bromélias, dos seguintes grupos funcionais: fragmentadores (espécie *Phylloicus bromeliarum*, Trichoptera: n = 91), raspadores (*Scirtes* sp., Scirtidae: n = 406), e coletores-catadores (*Polypedilum marcondesi*, Chironomidae: n = 448) (Cummins *et al.* 2005). Para manutenção do experimento fizemos coletas adicionais de cada espécie. No tratamento com detritívoros (veja abaixo) adicionamos 32 indivíduos de *Po. marcondesi*, 29 *Scirtes* sp. e 7 *Ph. bromeliarum* em cada bromélia. O número de indivíduos total de cada espécie utilizada no experimento foi estimado a partir de uma fórmula de regressão considerando como x o volume de água da bromélia e y abundância de cada espécie de acordo com dados obtidos em um estudo na mesma área (G. Q. Romero e D. Srivastava, dados não publicados). A estimativa do número de indivíduos foi calculada a partir do volume médio de 500 ml

Utilizamos as algas como produtores primários (i.e., base da teia alimentar “green”, baseada em plantas) e bactérias como representantes da cadeia alimentar

“brown”, baseadas em detritos, e responsáveis por iniciar o condicionamento da matéria orgânica, degradando compostos complexos e difíceis de serem processados, além de participarem da mineralização da matéria orgânica dissolvida (Gessner et al. 1999; Haubrich et al. 2009; Butler et al. 2008).

Coletamos as bromélias na restinga fechada e lavamos minuciosamente cada planta com jato de água durante 10 min para remover todos os organismos e detritos presentes no fitotelmata. Em seguida, penduramos as bromélias com os tanques virados para baixo durante dois dias, para remover possíveis organismos não retirados na primeira lavagem. As raízes foram mantidas umedecidas com papel absorvente embebido em água para evitar dessecação das plantas (Apêndice 3a). Após dois dias todas as bromélias foram tratadas com 500 ml da solução de Ciprofloxacina (Cip) (5 µg/ml em água deionizada), para homogeneizar a condição inicial da planta em relação à presença de bactérias (Apêndice 3). Dos 500 ml de solução, 100 ml foram borrifados diretamente na planta (exceto as raízes) e 400 ml foram adicionados nos tanques. As bromélias foram plantadas em vasos com solo coletados na mesma restinga em que coletamos as plantas. Utilizamos cobertura de tecido organza com malha de 100 µm de diâmetro para evitar entrada de detritos e de detritívoros. As bromélias foram mantidas nos vasos por três dias (Apêndice 3b). No quarto dia, retiramos as plantas dos vasos, lavamos com água corrente, deixamos secar por um dia e replantamos em vasos. As bromélias foram então organizadas em sete blocos de acordo com o volume de água retido, que variou entre 401 a 716 ml. O período de aclimação das plantas nos vasos foi de 10 dias.

Após a aclimação, adicionamos nas bromélias 50% de água deionizada e 50% de água retirada dos tanques de outras bromélias da restinga fechada. Utilizamos água de bromélias da natureza para garantir uma colonização por micro-organismos e reduzir o impacto na população natural de bromélias. A água das bromélias foi previamente filtrada com peneira geológica de 125 µm de abertura para evitar a presença de outras larvas aquáticas e detrito grosso. O nível da água dos fitotelmatas de cada planta foi vistoriado diariamente e, a cada cinco dias, adicionamos água deionizada para completar os tanques de todos os tratamentos.

Desenho experimental

Conduzimos o experimento na Casa Verde Hostel e Camping localizado no município de Cananéia – SP (~7 km da área de estudo), o qual apresenta características similares às encontradas na Ilha do Cardoso. Neste experimento avaliamos o efeito do aquecimento sobre (1) a sobrevivência e emersão de macroinvertebrados e (2) densidade e composição de micro-organismos, (3) as interações entre os macro- e micro-organismos, (4) o processamento da matéria orgânica (MO) nas base das cadeias alimentares “brown” e “green”. Distribuímos aleatoriamente 42 bromélias em sete blocos, cada bloco contendo bromélias com volumes variando de 400 a 716 ml. Para cada bloco utilizamos um desenho em parcelas subdivididas, com temperatura como principal parcela de tratamento (com dois níveis: aquecido e natural) e mais três níveis de tratamento (i.e. controle, bactérias, bactérias + detritívoros) como subparcelas dos níveis de temperatura (Figs. 2 a, b). O experimento teve duração de 60 dias.

Definição e controle dos valores de temperatura (parcela principal)

Para determinar os valores da temperatura do experimento registramos em campo a temperatura da água em 10 bromélias tanto no período da manhã quanto de noite. Utilizamos 10 *dataloggers* durante quatro dias (Apêndices 4 a, b). Estabelecemos os valores médios da temperatura para o nível de temperatura natural nos períodos do dia (25°C) e da noite (24°C). Para o nível de temperatura aquecido acrescentamos 4°C nos valores das médias máximas nos períodos do dia ($27,5^{\circ}\text{C} + 4^{\circ}\text{C} = 31,5^{\circ}\text{C}$) e da noite ($26^{\circ}\text{C} + 4^{\circ}\text{C} = 30^{\circ}\text{C}$) (Fig. 2a). O aumento de 4°C foi baseado nas previsões para 2100 sugerida por Marengo et al. (2010). Mantivemos a temperatura nos microcosmos com controladores (NOVUS - N1040), um para cada nível, conectados a uma termorresistência e a dois aquecedores (1W – 110V). Cada aquecedor foi inserido em uma bromélia, submersos nos copos mais periféricos (Apêndice 5a). As termorresistências foram acondicionadas no copo central, com rodízio entre as 21 bromélias de cada nível de temperatura para diminuir possível viés, uma vez que utilizamos apenas uma termorresistência por nível de temperatura. Esterilizamos as termorresistências com álcool e água deionizada quando o rodízio foi efetuado evitando a contaminação entre tratamentos. Essa distribuição dos aquecedores e da termorresistência nas axilas e no copo central foi escolhida a partir de estudo piloto que demonstrou que o aquecimento da água foi mais homogêneo entre todos os fitotelmatas (dados não demonstrados). Os aquecedores foram envoltos com pedaços de folhas de bromélias para evitar o contato direto e diminuir danos às folhas das plantas do experimento (Apêndice 5b). As folhas de proteção foram substituídas a cada 15 dias.

Definição dos tratamentos das subparcelas

No tratamento controle não adicionamos os detritívoros e aplicamos o antibiótico Cip (5 µg/ml) para remover as bactérias; o antibiótico foi aplicado a cada cinco dias. No tratamento bactérias não adicionamos detritívoros e permitimos o crescimento natural de colônias de bactérias sem adicionar antibiótico. No tratamento bactérias + detritívoros adicionamos os três grupos funcionais de detritívoros (fragmentadores, raspadores e coletores) e permitimos o crescimento natural de bactérias. Um quarto tratamento sem bactérias e com detritívoros não foi possível de ser executado devido ao efeito negativo dos antibióticos nos artrópodes aquáticos (G. Q. Romero e D. Srivastava, com. pess.), uma vez que micro-organismos fazem parte da dieta e/ou participam da digestão no intestino desses macro-invertebrados (Martin, 1981, Pinder, 1986, Cook et. al., 2013). Em todos os tratamentos não controlamos o crescimento de algas e fungos. A cada cinco dias fazíamos a reposição do volume perdido pela evaporação, adicionando 50 % do volume de cada bromélia, totalizando 12 reposições durante os 60 dias de experimento.

Efeito no funcionamento do ecossistema

Avaliamos a perda de biomassa (i.e., biomassa final - biomassa inicial) da matéria orgânica (MO) adicionando em cada bromélia 0,5 g de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) enriquecidas com ¹⁵N e 0,5 g de folhas não enriquecidas. Adicionamos 0,5g de *E. uniflora* enriquecida, pois inicialmente faríamos a análise da ciclagem de nutrientes, porém por atraso laboratorial não foi possível realizar essa análise. As folhas foram previamente coletadas e secadas em estufa por 48h a 60°C.

Além disso, antes do início do experimento, as folhas ficaram imersas em água deionizada por dois dias para lixiviar compostos complexos retidos nas folhas. Distribuímos as folhas em toda a planta, desde copo central até o quarto copo. Ao final do experimento retiramos as folhas de *E. uniflora* de cada bromélia, secamos em estufa por 48 horas e a 60°C, e pesamos em balança de precisão (0,0001 g) para obter o valor da biomassa final. A decomposição de MO foi calculada diminuindo a biomassa final pela biomassa inicial das folhas.

Quantificamos a concentração de clorofila *a* para avaliar o efeito da temperatura e dos tratamentos (detritívoros e bactérias) sobre a produção primária (representada pela concentração de clorofila *a*). Amostramos 30 ml de água no início do experimento, depois amostramos outros 30 ml de cada planta após 30 e 60 dias de experimento. Antes de retirar a alíquota de 30 ml de água, a água acumulada no fitotelmata foi misturada e coletada com uma pipeta de 30 ml. . A amostra de 30 ml foi decantada por 15 minutos em potes coletores estéreis de 80 ml e, em seguida, coletamos uma nova alíquota de 6 ml de água retirada especificamente do meio da coluna d'água até a superfície, para abranger os extratos vertical de ocorrência das algas (G. Q. Romero e D. S. Srivastava, dados não publicados). Utilizamos Fluorímetro e Turbidímetro AquaFluo - Turner Designs modelo 8000-010 para quantificar a clorofila *a*. Os valores de fluorescência emitidos pelo fluorímetro foram transformados para concentração utilizando a fórmula de regressão: Clorofila *a* (µg/ml) = 0.204 x Fluorescência (Multon et al. 2009).

Variáveis físico químicas

Para avaliar o efeito do aquecimento e dos tratamentos sobre as variáveis potencial hidrogeniônico (pH) e matéria orgânica colorida dissolvida (MOCD) amostramos 30 ml da água inicial antes de ser adicionada nas bromélias do experimento. Coletamos a mesma alíquota após 30 e 60 dias de experimento. Assim como na amostragem da água para medir a quantidade de clorofila *a*, utilizamos pote coletor estéril de 80 ml para mensurar os níveis de pH e MOCD (pHmetro portátil – Instrutherm e Fluorímetro e Turbidímetro AquaFluo - Turner Designs modelo 8000-010). Os níveis de pH foram aferidos imediatamente após a coleta e as amostras de MOCD realizadas após 15 min de decantação.

Quantificação de micro-organismos

Comparamos a densidade e composição de bactérias entre temperaturas aquecida e natural e entre tratamentos. As amostras para quantificar e identificar as colônias de bactérias foram obtidas a partir de 30 ml de água de todas as bromélias coletadas no início e após 30 e 60 dias de experimento. Coletamos 9 ml de cada amostra (previamente misturada e homogeneizada) e armazenamos em tubos estéreis de 15 ml contendo 1 ml de solução de bórax saturado. Congelamos todas as amostras imediatamente após a fixação. Ao fim do experimento, coletamos e congelamos amostras dos sedimentos (particulado fino) e água para análise de composição bacteriana. Para as análises microbianas, utilizamos somente as amostras de 60 dias de experimento, porque as amostras iniciais e as de 30 dias não ficaram prontas a tempo. Para análise de densidade, as amostras foram descongeladas e levadas ao vortex por 1

min para desprender as células bacterianas dos sedimentos. Em seguida, realizamos a homogeneização das amostras e montagem das lâminas: 20 µL em triplicata (volume total = 60 µL) e fixamos as amostras secando as lâminas no bico de Bunsen. Em ambiente escuro adicionamos a cada lâmina 20 µL de solução de DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) (Hobbie et al 1977; Courtois et al. 2001) e reservamos por 30 min em temperatura ambiente. Por fim, a observação e quantificação foram realizadas com microscopia de fluorescência (Microscópio trinocular Zeiss AXIO IMAGER A2) com jogo de filtro 49 para DAPI (Excitação 365 nm; Emissão 445/50 nm), e câmera digital científica colorida Zeiss, Modelo "AXIOCAM MRC" e Software "AXIOVISION 4.8" para aquisição e edição de imagens. Para quantificar a presença/ausência de fungos utilizamos microscópio com lentes objetivas de 10x (aumento total 100x) e a quantificação de bactérias foi realizada com objetiva de 40x (aumento total de 400x). Uma vez que a concentração de bactérias no tratamento bactérias e detritívoros foi muito alta, diluímos a amostra na proporção 1:10 para melhorar a quantificação das bactérias

Para identificar a composição de bactérias extraímos o DNA total da comunidade utilizando uma alíquota das amostras, incluindo água e detritos e levamos ao agitador vortex para homogeneizar as amostras. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit de extração PowerSoil DNA Isolation Kit (Mbio) de acordo com as instruções do fabricante. Para amplificação do gene RNA ribossomal 16S, realizamos reações de PCR com DNA extraído das amostras, utilizando o par de primers 968f, acoplado a um grampo com alto conteúdo de GC (968f-GC) e 1401r (Heuer et al. 1997), homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bactéria. Nas análises

de DGGE os amplicons (produto de PCR) foram sujeitos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante no sistema Ingeny phor U-2 (Ingeny International BV[®]), onde 15 µL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% a uma voltagem de 50 V por 16 horas. O gradiente desnaturante (uréia e formamida) do gel utilizado para separação dos fragmentos de DNA foi de 40% a 65%. Após a eletroforese, o gel foi corado com 10 µL de solução contendo 2,5 µL de SYBR Green I (Invitrogen[®]) em tampão TAE 1 X por 1 hora no escuro.

Emerção e sobrevivência de macro-organismos (detritívoros)

Avaliamos a sobrevivência e emergência dos detritívoros monitorando diariamente todas as bromélias pertencentes ao tratamento bactérias + detritívoros, as emergências e mortes foram contabilizadas durante os 60 dias de experimento. Semanalmente fazíamos a reposição de organismos baseada no número de emergências e mortes para manter o número de indivíduos total (i.e., 32 *Po. marcondesi*, 29 *Scirtes sp.*, 7 *Ph. bromeliarum*). Para a reposição as larvas foram previamente aclimatadas (~ 7 dias) em potes com água natural de outras bromélias fora do experimento. No fim do experimento medimos com proveta de 500 ml o volume de a água acumulada nas bromélias. Então, removemos todas as folhas e lavamos cada planta para a triagem por procura visual dos artrópodes aquáticos visíveis a olho nu. A triagem foi realizada em bandejas brancas e os insetos fixados em álcool 70%.

Análise estatística

Para os dados de perda de biomassa da MO (i.e., decomposição) utilizamos uma análise de variância (ANOVA) em parcelas subdivididas considerando blocos como efeito aleatório e as variáveis independentes níveis de temperatura (aquecida e natural) e os tratamentos bactérias, bactérias + detritívoros e controle como efeitos fixo. Avaliamos as respostas quanto à concentração de Clorofila *a*, MOCD e níveis de pH através de uma ANOVA de medidas repetidas utilizando como variáveis dependentes a Clorofila *a*, MOCD e pH e como variáveis independentes a temperatura e tratamentos, e o tempo (zero 30 e 60 dias de experimento) como fator de repetição. Utilizamos ANOVA de dois fatores para avaliar a porcentagem de sobrevivência e emersão dos detritívoros, com blocos como efeito aleatório e variáveis independentes níveis de temperatura e espécies de detritívoros como efeito fixo. Para a densidade bacteriana também utilizamos ANOVA de dois fatores com blocos como efeito aleatório e as variáveis independentes níveis de temperatura e tratamentos como efeito fixo. Analisamos a quantidade de fungos através de presença e ausência nas amostras de águas das bromélias, utilizando GLM binomial para avaliar a resposta dos fungos diante dos níveis de temperatura e tratamentos. Utilizamos visualização gráfica para avaliar a variância e distribuição normal dos resíduos. Para a análise de medidas repetidas utilizamos o pacote *biology* (Logan, 2008). Nós rodamos as análises utilizando a linguagem estatística R (Core Team 2012).

Para testar se a diversidade beta (composição) de bactérias varia entre tratamentos realizamos uma análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA), utilizando a função *adonis* do pacote *vegan* (Anderson 2006).

Quando as diferenças foram detectadas, realizamos contraste para comparar as diferenças na composição de espécies entre os tratamentos e dentro de tratamentos entre temperaturas diferentes. As análises foram realizadas utilizando a linguagem estatística R com o pacote *vegan* e função *betadisper* (Anderson 2006). Utilizamos a análise de coordenadas principais (PCoA) para visualizar as similaridades e dissimilaridades entre os tratamentos.

RESULTADOS

Efeito do aquecimento nos macro e micro-organismos

Demonstramos que no tratamento aquecido a sobrevivência de todos os detritívoros foi 40,62% menor do que no tratamento com temperatura natural. Os grupos funcionais dos fragmentadores (*Ph. bromeliarum*) e coletores (*Po. marcondesi*) foram os mais sensíveis ao aumento da temperatura (Fig. 5, Tabela 2), com diminuição de 52,65% e 41,56%, respectivamente. A espécie *Po. marcondesi* foi o único grupo em que a emersão foi afetada pela temperatura, com um decréscimo de 21,6% nas emersões (Fig. 6, Tabela 2). A temperatura diminuiu a densidade bacteriana apenas no tratamento onde os detritívoros estavam presentes (Fig. 7, Tabela 2). Na presença dos detritívoros a densidade bacteriana foi 36% maior quando comparada ao tratamento que contém somente micro-organismos. A comparação entre bactérias e fungos demonstram a forte participação das bactérias nesse sistema (Apêndice 6) após 60 dias de experimento. Com base nos géis de DGGE, a estrutura da comunidade respondeu sensivelmente à

temperatura e aos tratamentos, com modificação na composição de bactérias entre temperaturas e entre os tratamentos (Fig. 8, Apêndice 7 e 8).

Efeito do aquecimento nas variáveis físico-químicas

A quantidade de matéria orgânica colorida dissolvida (MOCD) entre os tratamentos bactérias e bactérias + detritívoros não diferem entre si, porém ambos têm quantidade de MOCD 30% menor do que no tratamento sem a presença das bactérias. (Fig. 3a, Tabela 1). O pH do tratamento aquecido foi maior (mais básico – 7,0) do que o pH do tratamento com temperatura natural (pH levemente ácido – 6,1; Fig. 4, Tabela1).

Efeito do aquecimento no funcionamento do ecossistema

A decomposição da matéria orgânica não diferiu entre tratamento aquecido e com temperatura natural (Tabela 2). Embora o aquecimento não tenha isoladamente afetado a decomposição da matéria orgânica, a interação entre os níveis de temperatura e os tratamentos indicam efeito positivo sobre a decomposição (Tabela 2). Além disso, a presença de bactérias aumentou em 14,5% a perda de biomassa nos fitotelmatas de *Q. arvensis*, independente da presença de detritívoros (Fig. 9, Tabela 2). Após 60 dias de experimento a concentração de clorofila *a* aumentou no tratamento bactéria + detritívoros no nível de temperatura natural em comparação aos demais (Fig. 3b, Tabela 1).

DISCUSSÃO

O aumento da temperatura afetou negativamente a sobrevivência e emersão de macro-organismos e a densidade e composição de micro-organismos. Porém, apesar de ter um efeito claro sobre os macro- e micro-organismos, o efeito do aquecimento na decomposição da matéria orgânica foi evidente somente quando combinado com grupos de detritívoros e bactérias que vivem no fitotelmata. Além disso, nossos resultados demonstraram que as bactérias têm papel fundamental para o funcionamento do ecossistema aquático bromelícola, uma vez que aumentaram em 60% a decomposição da matéria orgânica, independente da presença de detritívoros. Esses resultados ressaltam que o aquecimento pode causar mudanças drásticas em comunidades de pequenos corpos d'água e, que bactérias podem ser o principal micro-consumidor de MO no sistema bromelícola, ao contrário de outros sistemas aquáticos maiores que geralmente têm como principal grupo de micro-consumidor os fungos (Hieber & Gessner 2002, Gessner et al. 2010).

Efeito do aquecimento nos macro-organismos (detritívoros)

A diminuição de 41,56% na sobrevivência e 21,67% na emersão de *Po. marcondesi* sugere que o cenário de aquecimento previsto para 2100 será potencialmente mais negativo para esta espécie. Apesar de pouca informação na literatura sobre a relação térmica dos organismos aquáticos utilizados neste experimento, sugerimos que o aumento de 4°C ultrapasse o limite térmico de *Po. marcondesi*, uma vez que houve diminuição de emersões e da sobrevivência. Resultados semelhantes foram encontrados para espécies do gênero *Chironomus* (Frous et al. 2002;

Stevens 2003). Além do efeito negativo claro do aumento da temperatura, o aumento da concentração de algas e bactérias, que fazem parte da dieta de Chironomidae (Armitage et al. 1995), podem contribuir para a maior sobrevivência e emergência desses organismos em bromélias com temperatura natural. Os níveis de pH apresentados em bromélias aquecidas (6,9) e naturais (6,3) sugerem que não haja influência direta desta variável físico-química, uma vez que *Po. marcondesi* pertence a tribo Chironomini, a qual as espécies apresentam tolerância alta a uma variação grande de pH (i.e., de 6,0 a 9,0) (Pinder 1986) demonstrando que a diferença apresentada entre os níveis de temperatura não ultrapassa o limiar apresentado por Pinder.

Assim como no grupo funcional coletor (*Po. marcondesi*), o aquecimento diminuiu em aproximadamente 52% a sobrevivência de *Ph. bromeliarum* (Trichoptera). O valor de temperatura esperado para os próximos 100 anos provavelmente ultrapassa o valor térmico ótimo para esta espécie de fragmentador (Pritchard & Berté 1987). Além disso, como o aquecimento tem efeito negativo na densidade de fungos e bactérias, que são responsáveis pelo condicionamento das folhas, a diminuição da sobrevivência pode estar relacionada com a redução no consumo e disponibilidade de matéria orgânica. Todavia, o aquecimento não refletiu no número de emergências desse grupo. Sugerimos que o tempo de experimento pode ser um fator que explique a ausência de emergências em *Ph. bromeliarum*, pois o tempo de desenvolvimento para algumas espécies desse grupo é longo (aproximadamente 115 dias: Norwoodand & Stewart 2002) e, portanto, superior aos 60 dias de duração do experimento.

Também demonstramos que o aquecimento não afetou a sobrevivência e emersão de indivíduos *Scirtes sp.* (Scirtidae). Os indivíduos desse grupo têm um comportamento peculiar em relação às outras espécies utilizadas no experimento, a capacidade de se locomover entre diferentes fitotelmatadas da bromélia. Desse modo, sugerimos que a mobilidade das larvas seja fundamental para que os organismos encontrem condições mais amenas dentro de uma mesma planta. Além disso, verificamos que as variações encontradas no pH, em função do aquecimento, não afetaram a sobrevivência e emersão dos Scirtidae. Paradise & Kuhn (1999) demonstraram que em poças com pH elevado (i.e., 7,0) a espécie *Helodes pulchella* (Scirtidae) consome maior quantidade de MO e tem maior taxa de crescimento. Deste modo, o pH elevado (6,9 no nível aquecido) pode ter favorecido a sobrevivência dos *Scirtidae*.

A maior sobrevivência dos detritívoros aliada a maior densidade bacteriana apresentada no nível de temperatura natural sugere a ocorrência de facilitação por parte das bactérias no tratamento bactéria + detritívoros uma vez que, a possível atuação das bactérias no condicionamento da matéria orgânica possa estar favorecendo os detritívoros (Gessner et al. 1999).

Efeito do aquecimento nos micro-organismos

O aquecimento da água acumulada no fitotelmata das bromélias no tratamento com bactérias não afetou a densidade de bactérias, enquanto a composição de bactérias diferiu entre bromélias aquecidas e controle (Figs. 7, 8, Apêndice 7 e 8). Porém, no tratamento bactérias + detritívoros a densidade de bactérias em temperatura aquecida foi

33% menor e a composição diferiu entre os níveis de temperatura (Figs. 7, 8, Apêndice 7 e 8), o que sugere que a presença de macro-organismos influenciam a resposta microbiana ao aquecimento. Ao compararmos a média dos dois tratamentos, é possível observar que a presença dos detritívoros promoveu um crescimento na ordem de 17×10^3 na densidade bacteriana. Este resultado indica que as bactérias aderidas ao corpo dos invertebrados, a atividade de fragmentação exercida pelos mesmos e as fezes liberadas nos tanques contribuem para o aumento na quantidade e diversidade de bactérias (Wotton & Malmqvist 2001; Prather et al. 2013). Desse modo, é possível que haja uma facilitação por parte dos macro-organismos aquáticos.

Uma explicação alternativa para a variação na densidade e composição de bactérias pode estar relacionada à variações nos níveis de clorofila *a* e MOCD encontrados nos tratamentos. Bactérias são geralmente melhores ou iguais competidoras por nutrientes do que as algas. Além disso, tanto algas quanto bactérias são limitadas pela disponibilidade de carbono, nitrogênio e fósforo (Daufresne et al. 2008). Porém, no tratamento bactérias + detritívoros a concentração de clorofila *a* diferiu entre os níveis de temperaturas.

A média dos pHs apresentados, neutro (i.e 7,0 no tratamento aquecido) e levemente ácido (6,1 no tratamento com temperatura natural), possivelmente afetam pouco o crescimento e a estrutura da microbiota quando comparado com pHs ácidos encontrado em rios e em fitotelmatas de troncos e bromélias (Mulholland et al. 1987; Paradise 2001; Goffredi et al 2011).

Encontramos densidades muito baixas de bactérias no tratamento controle, tais bactérias são possivelmente aquelas resistentes à ação do antibiótico. Nossos resultados demonstraram que o efeito da temperatura foi importante para estruturação da comunidade bacteriana resistente ao antimicrobiano (Fig. 8, Apêndice 7 e 8). Além disso, observamos maiores densidades de fungos no tratamento com densidade de bactéria reduzida. Sugerimos que a maior quantidade de fungos manteve a produção de MOCD, uma vez que os fungos fazem parte do processo inicial de decomposição da matéria orgânica. A produção, por meio da atividade dos fungos, e o consequente acúmulo de MOCD no tratamento controle pode estar relacionado com as baixas densidades de bactérias, uma vez que estes microorganismos são os principais responsáveis por mineralizar a MOCD (Daufresne & Loreau 2011).

Efeito do aquecimento no funcionamento do ecossistema

Mostramos que o aquecimento afeta a sobrevivência e emersão de macro-organismos e a densidade e composição de bactérias. Porém, ao contrário do esperado, o efeito do aquecimento na decomposição não está diretamente relacionado com o impacto sobre os macro- e micro-organismos. Após 60 dias, a perda de biomassa da matéria orgânica (detrito foliar) foi maior em tratamentos com bactérias do que no tratamento sem bactérias. Alguns estudos têm demonstrado que a atividade bacteriana e a de fungos possui um papel conjunto fundamental no condicionamento da matéria orgânica, o que melhora a palatabilidade do detrito e contribui para o melhor processamento por parte dos detritívoros (Webster 1986; Gessner et al. 2010; González et al 2013). Entretanto, a menor decomposição em tratamentos sem bactérias ressalta a

importância desses organismos no funcionamento do ecossistema bromelícola, uma vez que fungos são normalmente considerados os principais decompositores dos sistemas de água doce (Gessner et al. 1999; Pascoal & Cássio 2004; Graça et al. 2005).

Embora a variação na temperatura tenha afetado a densidade e composição bacteriana, os padrões de decomposição mantiveram-se semelhantes. Apesar das diferenças na comunidade bacteriana, possivelmente o aquecimento promoveu uma substituição por espécies com desempenho similar no processo de decomposição. Os padrões similares no processamento da matéria orgânica entre os tratamentos com presença de bactérias sugere a ocorrência de redundância funcional para estes microorganismos. Yin e colaboradores (2000) demonstraram que a redundância funcional de bactérias presentes no solo mantém o funcionamento dos ecossistemas com relação à produtividade. Neste contexto, acreditamos que a redundância em bactérias pode ser crucial para a manutenção de processos ecossistêmicos chave, como a decomposição, frente às mudanças climáticas.

Temperatura e pH não apresentaram relação com a decomposição nos tratamentos bactérias e bactérias + detritívoros. No entanto, alguns estudos sugerem que pHs mais elevados podem favorecer o consumo de matéria orgânica por microorganismos e invertebrados e assim aumentar a perda de biomassa da matéria orgânica (Mulholland et al. 1987; Paradise & Kuhn 1999; Paradise 2001).

Outro fator importante que contribui para o funcionamento do ecossistema é a MOCD produzida. Vários organismos estão diretamente envolvidos com a liberação de MOCD dentre eles estão às bactérias, fitoplâncton e os detritívoros (Thomas 2003). A

ação bacteriana passa então a ser responsável por finalizar esse processo ecossistêmico, mineralizando a matéria orgânica dissolvida e disponibilizando os nutrientes inorgânicos (Naeem et al. 2000; Daufresne et al. 2008). Nossos resultados reforçam a importância das bactérias no controle da MOCD, pois com a remoção de bactérias a quantidade de MOCD aumentou em 30%. Além disso, a mineralização da MOCD aumenta a disponibilidade de nutrientes inorgânicos no ecossistema.

Além de controlar a quantidade de MOCD, as atividades bacterianas e dos detritívoros influenciaram indireta e positivamente a concentração de algas, possivelmente contribuindo para uma maior produção de algas no tratamento bactérias + detritívoros. Estes nutrientes inorgânicos disponibilizados na água são essenciais para a proliferação das algas (Daufresne et al. 2008; Daufresne & Loreau 2001). Assim como demonstrado no trabalho de Butler et al. (2008), sugerimos que a atividade das bactérias presentes na teia alimentar “brown” contribua para a manutenção das algas representantes da teia alimentar “green”.

CONCLUSÃO

Apesar de bromélias representarem um sistema pequeno, nossos resultados demonstraram diversos padrões chave para entender como fatores bióticos e abióticos interagem para determinar o funcionamento de ecossistema aquático. Mostramos que temperatura é um fator fundamental na determinação da sobrevivência e emergência de detritívoros, além de influenciar a composição de bactérias. Ao contrário do esperado

pela Teoria Metabólica, demonstramos que o aquecimento pode ter um efeito negativo sobre os macro e micro-organismos. Destacamos as bactérias como principal agente no processamento da matéria orgânica influenciando a produção primária na cadeia alimentar “green”. Trabalhos focando na ciclagem de nutrientes se fazem necessários para melhor compreensão do efeito sobre as bromélias. Nossos resultados indicam que a temperatura é importante na determinação da comunidade bacteriana e que a atividade desses micro-organismos são cruciais para o funcionamento do ecossistema aquático contribuindo para a manutenção das teias alimentares “brown” e “green” .

LITERATURA CITADA

- Anderson, M.J. 2006. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, 62:245–253.
- Araújo, M. B., & Luoto, M. 2007. The importance of biotic interactions for modelling species distributions under change. *Global Ecology and Biogeography*, 16:743-753.
- Armitage, P. D., Cranston, P. S.; Pinder, L. C. V. 1995. *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Springer Science, 572p.
- Barlocher, F., Seená, S., Wilson, K. P., & Williams D. D. 2008. Raised water temperature lowers diversity of hyporheic aquatic hyphomycetes. *Freshwater Biology*, 53:368-379.
- Barton, T. B. 2010. Climate warming and predation risk during herbivore ontogeny. *Ecology*, 91:2811-2818.

- Benzing, D. H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Courchamp, F. 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15:365-377.
- Bernardi, J. V. E., Landim, P. M. B., Barreto, C. L., & Monteiro, R. C. 2005. Estudo espacial do gradiente de vegetação do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP. *Holos Environment*, 5:1-22.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. 2004. Towards a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85:1771-1789.
- Brouard, O., Le Jeune, A. H., Leroy, C., Cereghino, R., Roux, O., Pelozuelo, L., Dejean, A., Corbara, B., & Carrias, J-F. 2011. Are algae relevant to the detritus-based food web in tank-bromeliads? *PloS One* 6:e20129.
- Butler, J. L., Gotelli, N. J., & Ellinson, A. M. 2008. Linking the brown and green: nutrient transformation and fate in the *Sarracenia* microecosystem. *Ecology*, 89:898-904.
- Cardinale, B. J., Palmer, M. A., & Collins, S. L. 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature*, 415: 426–429.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., & Simonet, P. 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, 3:431-439.

- Cummins K. W., Merritt R. W., & Andrade P. C. N. 2005. The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 40, 69–89.
- Crick, H.Q.P., Dudley, C., Glue, D.E., & Thomson, D.L. 1997. UK birds are laying eggs Earlier. *Nature*, 388, 526.
- Dang, C. K., Schindler, M., Chauvet, E., & Gesser, M. O. 2009. Temperature oscillation coupled with fungal community shifts can modulate warming effects on litter decomposition. *Ecology*, 90:122-131.
- Daufresne, T. & Loreau, M. 2001. Ecological stoichiometry, primary producer-decomposer interactions, and ecosystem persistence. *Ecology*, 82:3069-3082.
- Daufresne, T., Lacroix, G., Benhaim, D., & Loreau, M. 2008. Coexistence of algae and bacteria: a test of the carbon hypothesis. *Aquatic Microbial Ecology*, 53: 323–332.
- Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. 2009. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:12788-12793.
- De Sernepont Domis, L. N., Van de Waal, D. B., Helmsing, N. R. Van Donk, E., & Mooij, W. M. 2014. Community stoichiometry in a changing world: combined effects of warming and eutrophication on phytoplankton dynamics. *ESA preprint*.
- Dézerald, O., Talaga, S., Leroy, C., Carrias, J-F., Corbara, B., Dejean, A. & Céréghino, R. E. 2014. Environmental determinants of macroinvertebrate diversity in small water bodies: insights from tank-bromeliads. *Hydrobiologia* 723:77-86.

- Dossena, M., Yvon-Durocher, G., Grey, J., Montoya, J. M., Perkins, D. M., Trimmer, M., & Woodward, G. 2012. Warming alters community size structure and ecosystem functioning. *Proceedings of The Royal Society B*, 367:2903-2912.
- Feminella, J. W., & Resh, V. H. 1991. Herbivorous caddisflies, macroalgae, and epilithic microalgae: dynamics interactions in a stream grazing system. *Oecologia*, 87:247-256.
- Flury, S., & Gessner, M. O. 2011. Experimentally simulated global warming and nitrogen enrichment effects on microbial litter decomposers in marsh. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:803-809.
- Frouz, J., Ali, A. & Lobinske, R. 2002. Influence of temperature on developmental rate, wing length, and larval head capsule size of pestiferous midge *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(4): 699-705.
- Frouz, J., Ali, A., & Lobinske, R. J. 2002. Influence of temperature on developmental rate, wing length, and larval head capsule size of pestiferous midge *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Economic Entomology*, 95:699-705.
- Gessner, M. O., Swan, C. M., Dang, C. K., McKie, B. G., Bardgett, R. D., Wall, D. H., & Hattenschwiler. 2010. Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology and Evolution*, 25:372-380.
- Goffredi, S. K., Kantor, A. H., & Woodside, W. T. 2011. Aquatic microbial habitats within a Neotropical Rainforest bromeliads and pH-associated trends in bacterial diversity and composition. *Microbial Ecology*, 61:529-542.

- Gonçalves, A. Z., Hoffmann, F. L. Mercier, H., Mazzafera, P., & Romero, G. Q. 2014. Phyllosphere bacteria improve animal contribution to plant nutrition. *Biotropica*, 0:1-5.
- González, J. M. & Graça, M. A. S. 2003. Conversion of leaf litter to secondary production by a shredding caddis-fly. *Freshwater biology* 48: 1578-1592.
- González, A. L., Romero, G. Q., & Srivastava, D. S. 2013. Detrital nutrient content determines growth rate and elemental composition of bromeliad-dwelling insects. *Freshwater Biology*, 59:737-747.
- Greig, H. S., Kratina, P., Thompson, P. L., Palens, W. J., Richardson, J. S., & Shurin. 2012. Warming, eutrophication, and predator loss amplify subsidies between aquatic and terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 18:504-514.
- Hart, E. M., & Gotelli, N. J. 2011. The effects of climate change on density-dependent population dynamics of aquatic invertebrates. *Oikos* 120:1227-1234.
- Haubrich, C. S., Pires, A. P. F., Esteves, F. A., & Farjalla, V. F. 2009. Bottom-up regulation of bacterial growth in tropical phytotelm bromeliads. *Hydrobiologia*, 632:347-353.
- Hector, A., & Wilby, A. 2009. Biodiversity and ecosystem functioning. Page 367. In. Levin, S. A. editor. *The Princeton guide to ecology: biodiversity and ecosystem functioning*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, M., Smalla, K., & Wellington, E. M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 3233-3241.

- Hieber, M. & Gessner, M. O. 2002. Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83(4): 1026-1038.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33:1225-1228.
- Hogg, I. D., Williams, D. D., Eadie, J. M., & Butt, S. A. 1995. The consequences of global warming for stream invertebrates: a field simulation. *Journal of Thermal Biology*, 20:199-206.
- Hoekman, D. 2010. Turning up the heat: temperature influences the relative importance of top-down and bottom-up effects. *Ecology*, 91: 2819-2825.
- Hooper, D. U., Chapin III, F. SEwel, ., J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, J. A., Vandermeer, J., & Wardle, D. A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75:3–35.
- IPCC-AR5. 2007. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland.
- Lensing, J. R., & Wise, D. H. 2006. Predicted climate change alters the indirect effect of predators on an ecosystem process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:15502-15505.
- Logan, M. 2008. *Biology: extending the analysis tool kit for biologists*. R package version 1.0.

- Marengo, J. A. 2007. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente, Brasília-DF. 2ª Ed. 201 pp.
- Marino, N. A. C., Guariento, R. D., Dib, V., Azevedo, F. D., & Farjalla, V. F.. 2011. Habitat size determine algae biomass in tank-bromeliads. *Hydrobiologia*, 678:191–199.
- Moraes, R. M., & Domingos, M. 1997. Elementos minerais em folhas de espécies arbóreas de Mata Atlântica e Mata de Restinga, na Ilha do Cardoso, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, 20:133-138.
- Moulton, T. P., Souza, M. L., Walter, T. L., Krsulovic, A. M. 2009. Patterns of periphyton chlorophyll and dry mass in a Neotropical stream: a cheap and rapid analysis using a hand-held fluorometer. *Marine and Freshwater Research*, 60:224-233.
- Mulholland, P. J., Palumbo, A. V., Elwood, J. W. & Rosemond, A. D. 1987. Effects of acidification on leaf decomposition in streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 6(3): 147-158.
- Norwood, J. C. & Stewart, K. W. 2002. Life history and case-building behavior of *Phylloicus ornatus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in two spring-fed streams in Texas. *Annals of the Entomological Society of America* 95(1): 44-56.
- Staudinger, M. D., Grimm, N. B., Staudt, A., Carter, S. L., Chapin III, S. F., Kareiva, P., Ruckelshaus, M., & Stein, B. A. 2012. Impacts of climate change on biodiversity, ecosystems, and ecosystem services: technical input to the 2013

- national climate assessment. Cooperative Report to the 2013 National Climate Assessment. 296 p.
- Naeem, S. 2009. Biodiversity, ecosystem functioning, and ecosystem services. Pg 584-590. In. Levin, S. A. editor. The Princeton guide to ecology: biodiversity and ecosystem functioning. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Naeem, S., Hahn, D. R., & Schuurman, G. 2000. Producer-decomposer co-dependence influences biodiversity effects. *Nature*, 403:762-764.
- O'Connor, M. I., Selig, E. R., Pinsky, M. L., & Altermatt, F. 2012. Towards a conceptual synthesis for climate change responses. *Global Ecology and Biogeography*, 21:693-703.
- O'Connor, M. I., Bruno, J. F., Gaines, S. D., Lester, S. E., Halpern, B. S., Kinlan, B. P., & Weiss, J. N. 2007. Temperature control of larval dispersal and implication for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:1266-1271.
- O'Gorman, E. J., Pichler, D. E., Adams, G., Benstead, J. P., Cohen, H., Craig, N. et al. 2012. Impacts of warming on the structure and functioning of aquatic communities: individual to ecosystem level response. In Woodward, G., Jacob, U. & O'Gorman. *Advances in ecological research: global change in multispecies systems part II*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Ott, D., Rall, B. C., & Brose, U. 2012. Climate change effects on macrofaunal litter decomposition: the interplay of temperature, body masses and stoichiometry. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 367:3025-3032.

- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C. Hill, J. K., Thomas, C. D., Descimon, H. et al. 1999. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*, 399:579–583.
- Paradise, C. J. & Kuhn, K. L. 1999. Interactive effects of pH and leaf litter on a shredder, the scirtid beetle, *Helodes pulchella*, inhabiting tree-holes. *Freshwater Biology* 41: 43-49.
- Paradise, C. J. 2000. Effects pH and resource on a processing chain interaction in simulated treeholes. *Journal of Animal Ecology* 69: 651-658.
- Petchey, O. L., McPearson, P. T., Casey, T. M., & Morin, P. J. 1999. Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature*, 402: 69-72.
- Petchey, O. L. 2000 Prey diversity, prey composition, and predator population stability in experimental microcosms. *Journal of Animal Ecology*. 69, 874 – 882.
- Pinder, L. C. V. 1986. Biology of freshwater chironomidae. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 1-23.
- Pounds, J. A., Bustamante, R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Puschendorf, R., et al. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439:161-167.
- Prather, C. M., Pelini, S. L., Laws, A., Rivest, E., Woltz, M., Bloch, C. P., Del Toro, I., et al. 2013. Invertebrates, ecosystem services and climate change. *Biological Reviews*, 88:327-348.

- Pritchard, G. & Berté, S. B. 1987. Growth and food choice by two species of limnephilid caddis larvae given natural and artificial foods. *Freshwater Biology* 18: 529-535.
- Romero, G. Q., & Srivastava, D. S.. 2010. Food-web composition affects cross-ecosystem interactions and subsidies. *The Journal of animal ecology*, 79:1122-1131.
- Sardans, J., Rivas-Ubach, A., & Peñuelas, J. 2012. The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: a review and perspectives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14:33-47.
- Sibly, R. M., Brown, J. H. & Kodric-Brown, A. 2012. *Metabolic ecology: a scaling approach*. Willey-Blackwell, Oxford, UK.
- Srivastava, D.S., Kolasa, J., Bengtsson, J., González, A., Lawler, S.P., Miller, T.E., Munguia, P. et al. 2004. Are natural microcosms useful model systems for ecology? *Trends in Ecology and Evolution*, 19:379-384.
- Stachowicz, J. J., Bruno, J. F., & Duffy, J. E. 2007. Understanding the effects of marine biodiversity on communities and ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38:739-766.
- Starzomski, B. M., Suen, D., & Srivastava, D. S. 2012. Predation and facilitation determine chironomid emergence in a bromeliad-insect food web. *Ecological Entomology*, 35: 53-60.

- Sterner, R. W., & Elser, J. J. 2002. Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Stevens, M. M. 1998. Development and survival of *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera: Chironomidae) at a range of constant temperatures. *Aquatic Insects* 20(3): 181-188.
- Srivastava, D. S., Trzcinski, M. K., Richardson, B. A., & Gilbert, B. 2008. Why are predators more sensitive to habitat size than their prey? Insights from bromeliad insect food webs. *The American naturalist*, 172:761–71.
- Webster, J. R., & Benfield, E. F. 1986. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 17:567-594.
- Woodward, G., Perkins, D. M., & Brown, L. E. 2010. Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 356:2093-2106.
- Woodward, G., Perkins, D.M., & Brown, L.E. 2012. Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365, 2093–2106.
- Wotton, R. S. & Malmqvist, B. 2001. Feces in aquatic ecosystems. *BioScience* 51(7): 537-544.

TABELAS

Tabela 1. Anova de medidas repetidas examinando a variação na quantidade de MOCD (matéria orgânica colorida dissolvida), Clorofila *a* e pH em relação aos valores totais e da interação entre variáveis independentes, temperatura (aquecida e natural) e tratamento (controle, bactérias, bactérias + detritívoros), e ao longo do tempo do experimento (30 e 60 dias). Valores significativos ($P \leq 0,05$) estão destacados em negrito.

Variável resposta		df	MS	F	P
MOCD	Temperatura (TE)	1	32442	3,91	0,077
	Tratamento (TR)	2	1872973	225,77	< 0,0001
	Tempo (TP)	1	46126	5,56	0,051
	TE x TR	2	48716	5,87	0,032
	TE x TP	1	7486	0,90	0,222
	TR x TP	2	28874	3,48	0,081
	TE x TR x TP	2	8960	1,08	0,263
	Resíduos	71	8296		
Clorofila <i>a</i>	Temperatura (TE)	1	278263	5,55	0,021
	Tratamento (TR)	2	287915	5,74	0,005
	Tempo (TP)	1	228603	4,56	0,036
	TE x TR	2	18364	0,36	0,694
	TE x TP	1	24627	0,49	0,485
	TR x TP	2	148373	2,96	0,058
	TE x TR x TP	2	2929	0,06	0,943
	Resíduos	71	50123		
pH	Temperatura (TE)	1	14,17	87,84	< 0,0001
	Tratamento (TR)	2	0,247	1,53	0,223
	Tempo (TP)	1	3,086	19,13	< 0,0001
	TE x TR	2	0,097	0,604	0,549
	TE x TP	1	0,241	1,494	0,226
	TR x TP	2	0,087	0,537	0,587
	TE x TR x TP	2	0,007	0,042	0,959
	Resíduos	71	0,161		

Tabela 2. Anova de dois fatores aleatorizada em blocos (Densidade de bactérias, Perda de biomassa, Emersão e Sobrevivência) resumindo valores totais e da interação entre variáveis independentes, temperatura (aquecida e natural) e tratamento (controle, bactérias, bactérias + detritívoros). Valores significativos ($P \leq 0,05$) estão destacados em negrito.

Variável resposta		df	MS	F	P
Densidade de bactérias	Temperatura (TE)	1	88,5	4,87	0,034
	Tratamento (TR)	2	1640,1	90,24	<0,0001
	TE x TR	2	197,9	10,88	0,0002
	Resíduos	34	18,2		
Perda de biomassa	Temperatura (TE)	1	0,004	1,10	0,301
	Tratamento (TR)	2	0,113	29,35	<0,0001
	TE x TR	2	0,012	3,24	0,051
	Resíduos	34	0,004		
Emersão	Temperatura	1	1711,1	49,4	<0,0001
	Espécies	2	506,8	14,63	<0,0001
	Resíduos	37	34,6		
Sobrevivência	Temperatura	1	23095	100,31	<0,0001
	Espécies	3	1947	8,46	<0,0001
	Resíduos	50	230		

Tabela 3. Resultados da Análise de Variância Multivariada (PERMANOVA) comparando a diferença na composição de espécies de bactérias entre temperatura (aquecida e natural), tratamento (controle, bactérias, bactérias + detritívoros) e na interação entre temperatura e tratamento. Contrastes foram utilizados para comparar as diferenças na composição de espécies entre os tratamentos e dentro de tratamentos entre temperaturas diferentes. Valores significativos ($P \leq 0,05$) estão destacados em negrito.

Variável resposta	df	MS	F	P	R²
<i>Composição de bactérias</i>					
Temperatura (TE)	1	2670,4	4,51	<0,0001	0,07
Tratamento (TR)	2	1733,6	2,93	<0,0001	0,09
TE x TR	2	4315,4	7,28	<0,0001	0,24
Resíduos	36	592,4			0,59
<i>Contrastes</i>					
Bactéria vs. Controle	1	1833,7	3,09	0.007	0,05
Bactéria vs. Bactéria+Detritívoro	1	1633,4	2,76	0.009	0,04
Bactéria vs. Temperatura	1	4180,9	7,06	0.001	0,11
Bactéria+Detritívoro vs. Temperatura	1	2742,8	4,63	0.001	0,07
Controle vs. Temperatura	1	4377,5	7,39	0.001	0,12
Resíduos	36	592,4	0,59		0,59

LEGENDA DAS FIGURAS

Fig. 1. Predição do efeito do aquecimento sobre macro- e micro-organismos e funcionamento do ecossistema bromelícola. As setas pretas indicam a direção do efeito positivo (+), que podem ser direto (sólida) e indireto (tracejada). A seta cinza unidirecional indica a ocorrência de facilitação entre bactérias e algas, ao mineralizar a matéria orgânica dissolvida e disponibilizar nutrientes para converter em produção primária. A seta cinza bidirecional indica a facilitação que ocorre entre bactérias e detritívoros, através do condicionamento da matéria orgânica por parte das bactérias e da disponibilidade de recursos por parte dos detritívoros. As setas vermelhas indicam a relevância dos organismos no processo de decomposição, a grossura das setas indica a magnitude dos efeitos positivos (+).

Fig. 2. A) Esquema ilustrando o desenho experimental com as 42 bromélias formando sete blocos de parcelas subdivididas. Temperatura como parcela principal de tratamento, dividida em dois níveis de temperatura, natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite). Em seguida cada nível de temperatura foi subdividido em parcelas contendo três níveis de tratamento: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros, iii) Controle. B) Experimento em andamento, com as três fileiras de tratamentos do lado esquerdo formando o nível natural e as três fileiras de tratamentos do lado direito formando o nível aquecido. Perpendicularmente temos a distribuição dos sete blocos composto pelos três tratamentos de cada nível de temperatura.

Fig. 3. Resultados das variáveis físico-químicas: matéria orgânica colorida dissolvida (MOCD) e Clorofila *a*, presentes na água das bromélias dos tratamentos: i) Bactérias, ii)

Bactérias + Detritívoros e iii) Controle, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite), após 30 e 60 dias de experimento.

Fig. 4. Níveis de pH encontrado nos fitotelmatas da *Quesnelia arvensis* para os tratamentos: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros e iii) Controle, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite), após 30 e 60 dias de experimento.

Fig. 5. Porcentagem de sobrevivência dos organismos detritívoros pertencentes aos grupos funcionais fragmentadores (i.e *Ph. bromeliarum*), raspador (i.e *Scirtes sp.*) e coletor-catador (i.e *Po. marcondesi*) adicionados no tratamento Bactérias + Detritívoros, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite). O item Detritívoros ilustra a resposta de todos os três grupos funcionais juntos. As barras de erro representam média e desvio padrão.

Fig. 6. Porcentagem de emersão (i.e larvas que se desenvolveram até emergirem como adultas) dos organismos detritívoros pertencentes aos grupos funcionais raspador (i.e *Scirtes sp.*) e coletor-catador (i.e *Po. marcondesi*) adicionados no tratamento Bactérias + Detritívoros, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite). O item Detritívoros ilustra a resposta todos dois grupos funcionais juntos. As barras de erro representam média e desvio padrão.

Fig. 7. Densidade bacteriana presentes nos fitotelmatas das bromélias dos tratamentos: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros e iii) Controle, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite).

Fig. 8. PCoA de similaridade entre os perfis de bandas bacteriana das amostras de água das bromélias dos tratamentos: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros e iii) Controle, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite). Dados obtidos a partir da técnica de DGGE.

Fig. 9. Perda de biomassa (i.e. decomposição) de folhas de *Eugenia uniflora* em três diferentes tratamentos: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros, iii) Controle, em temperatura natural (25°C dia/ 24°C noite) e aquecida (31.5°C dia/ 30°C noite).

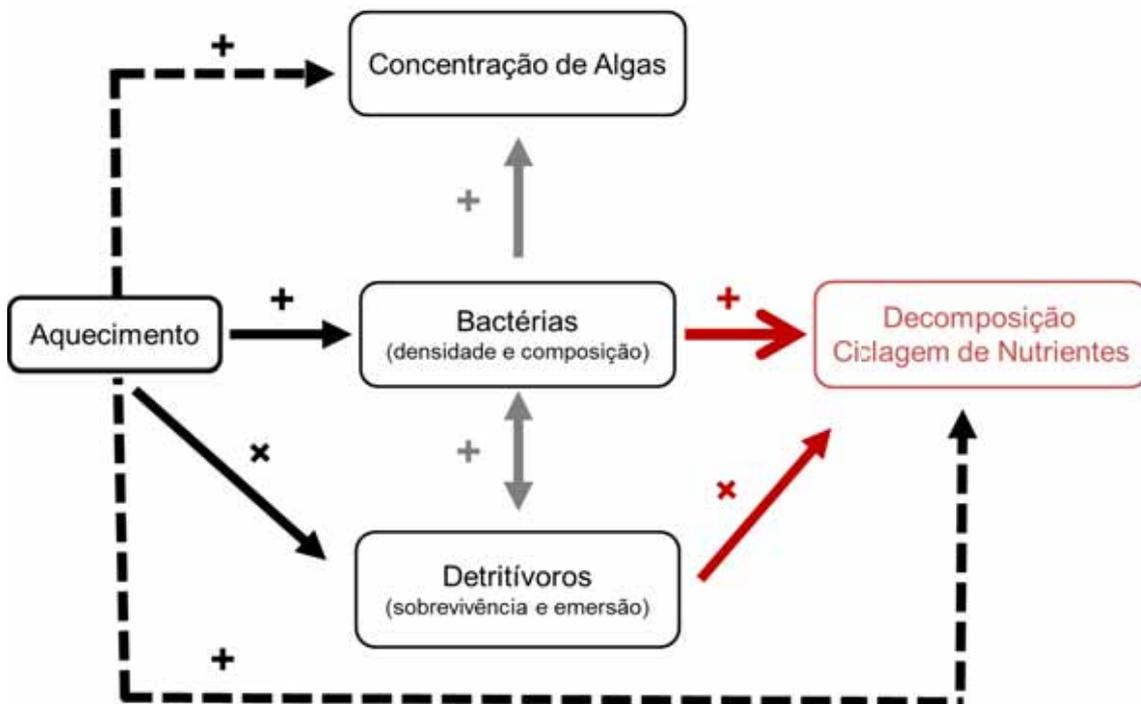


Fig. 1.

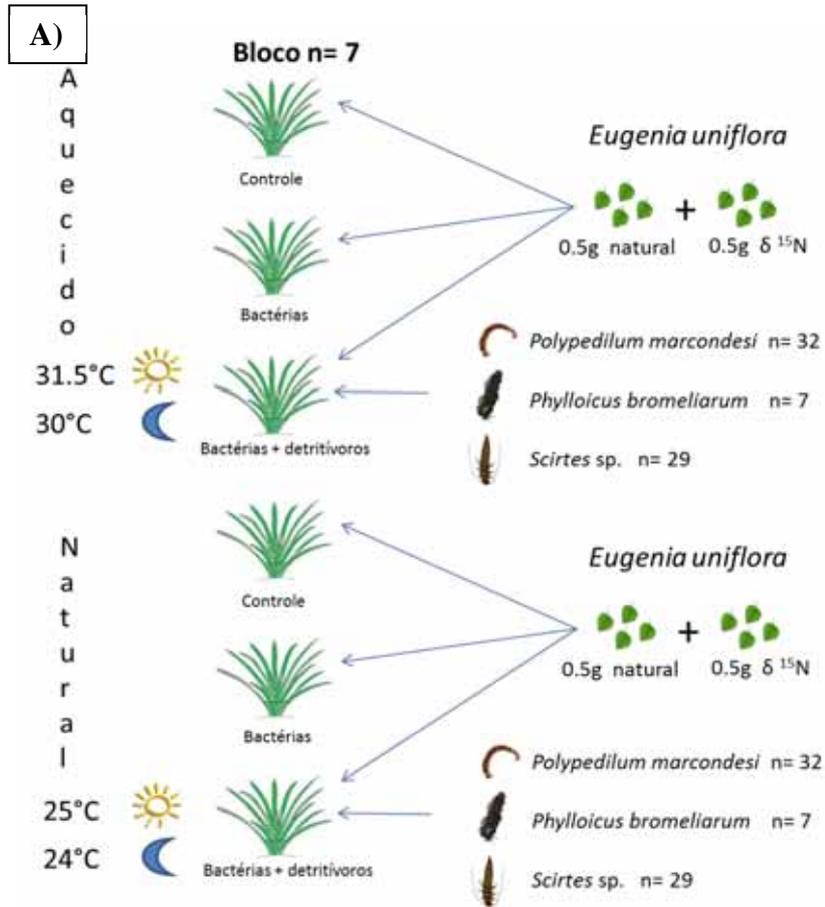


Fig.2.

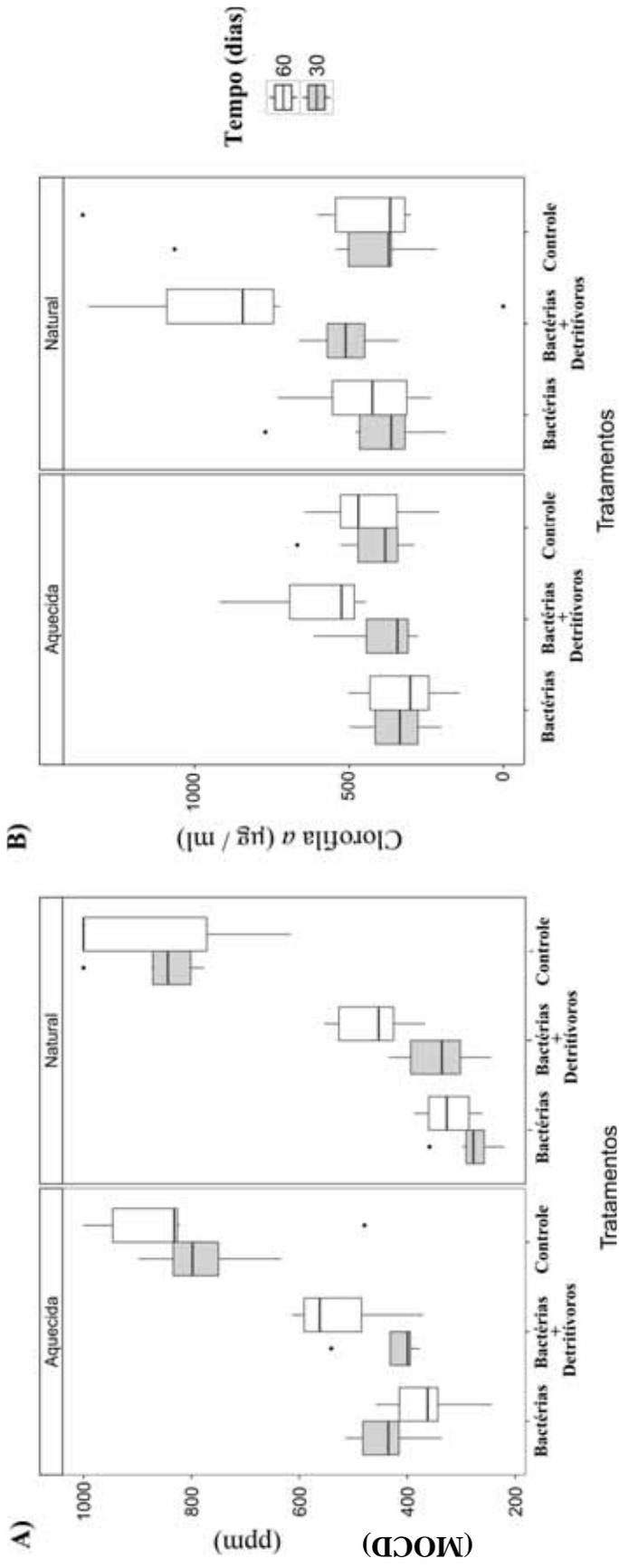


Fig. 3.

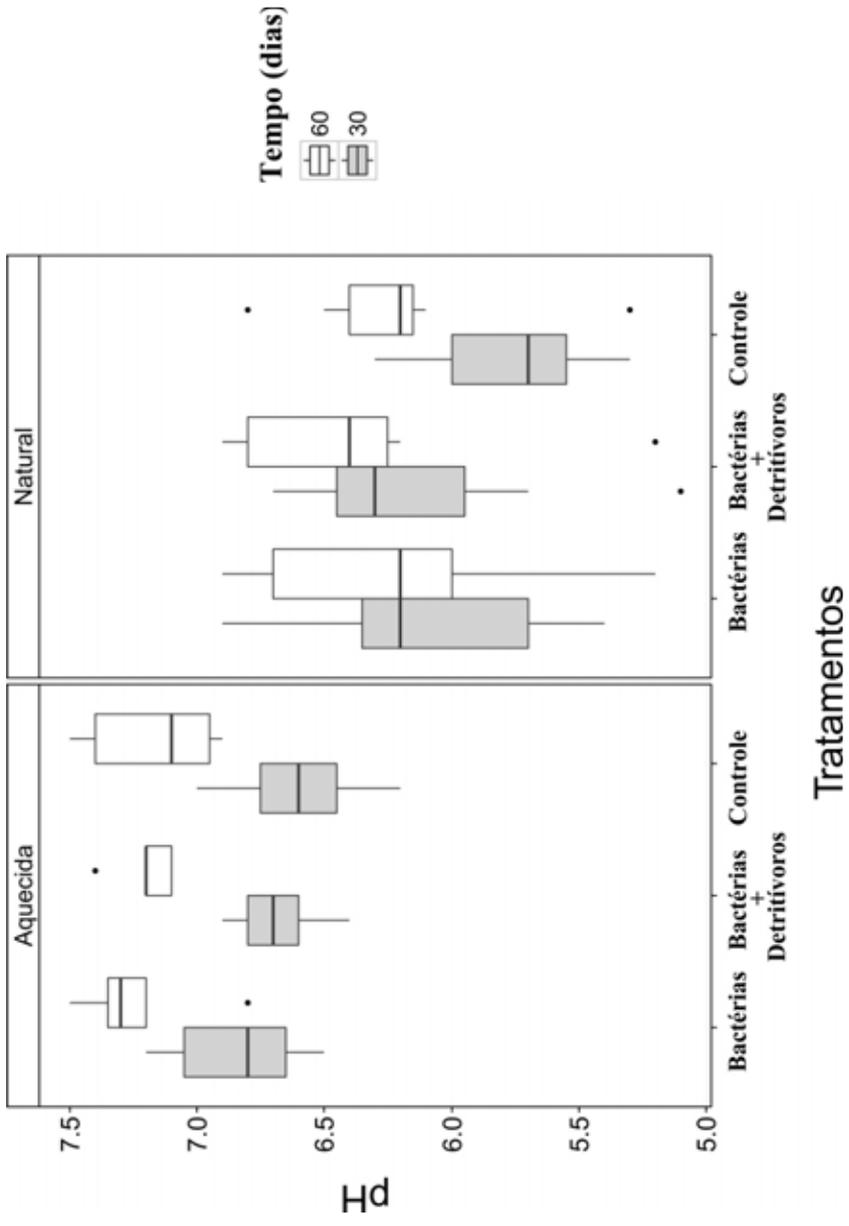


Fig. 4.

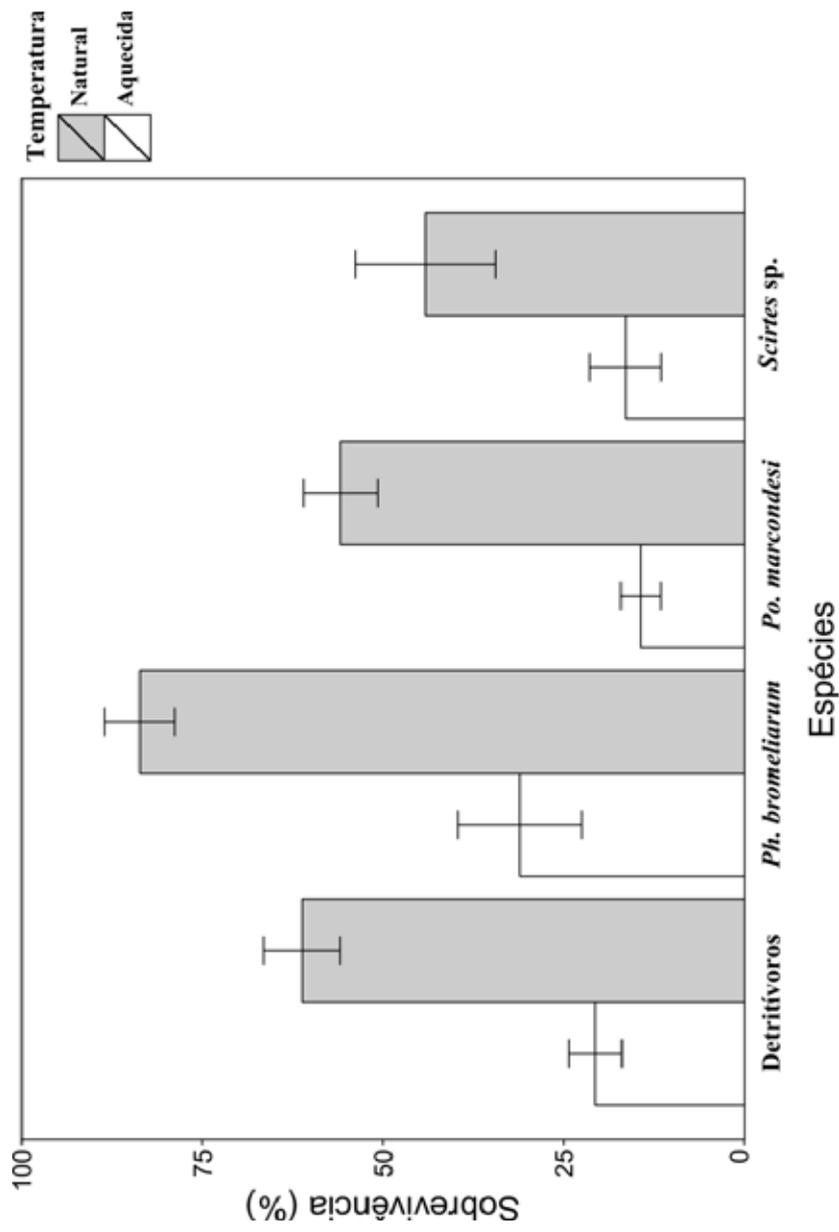


Fig.5.

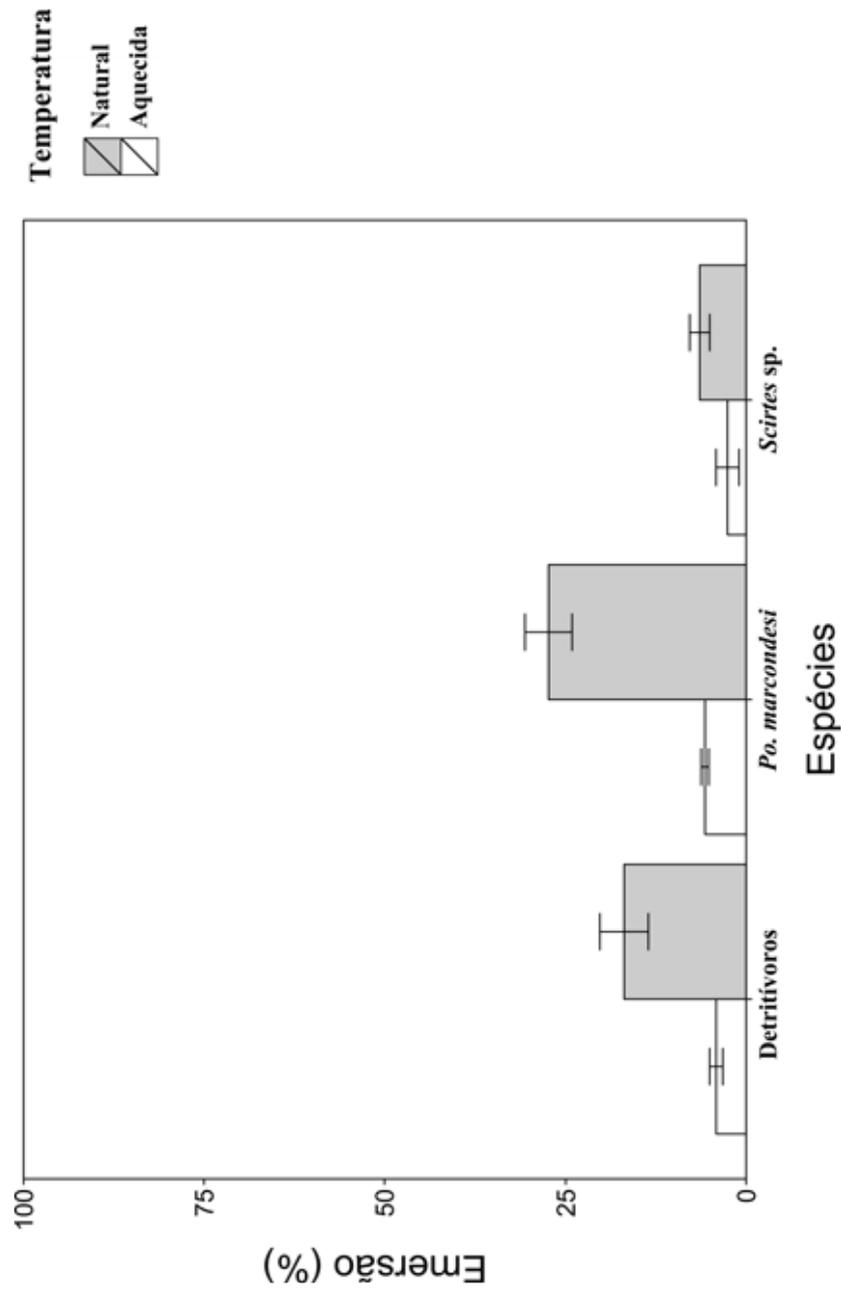


Fig.6.

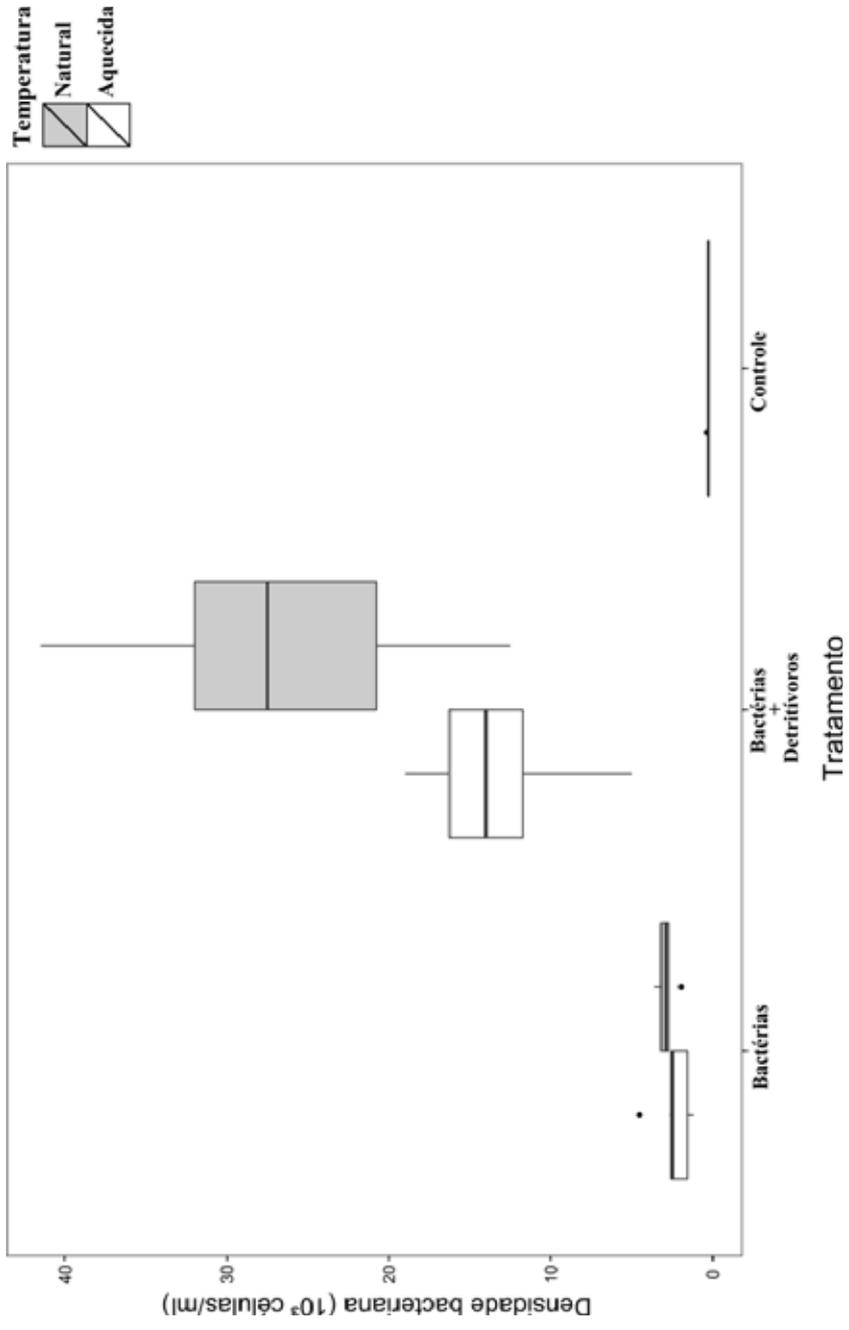


Fig. 7.

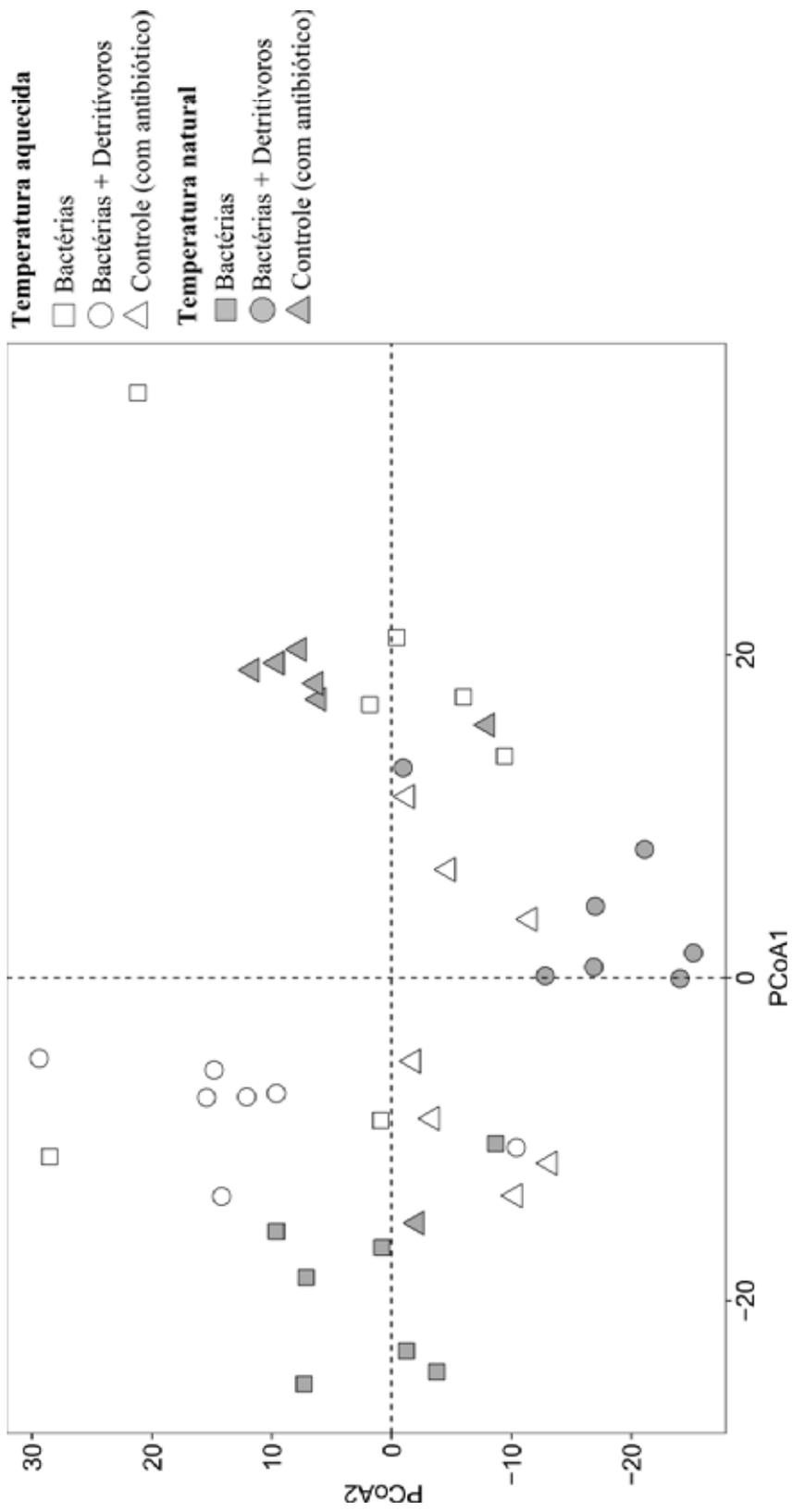


Fig. 8.

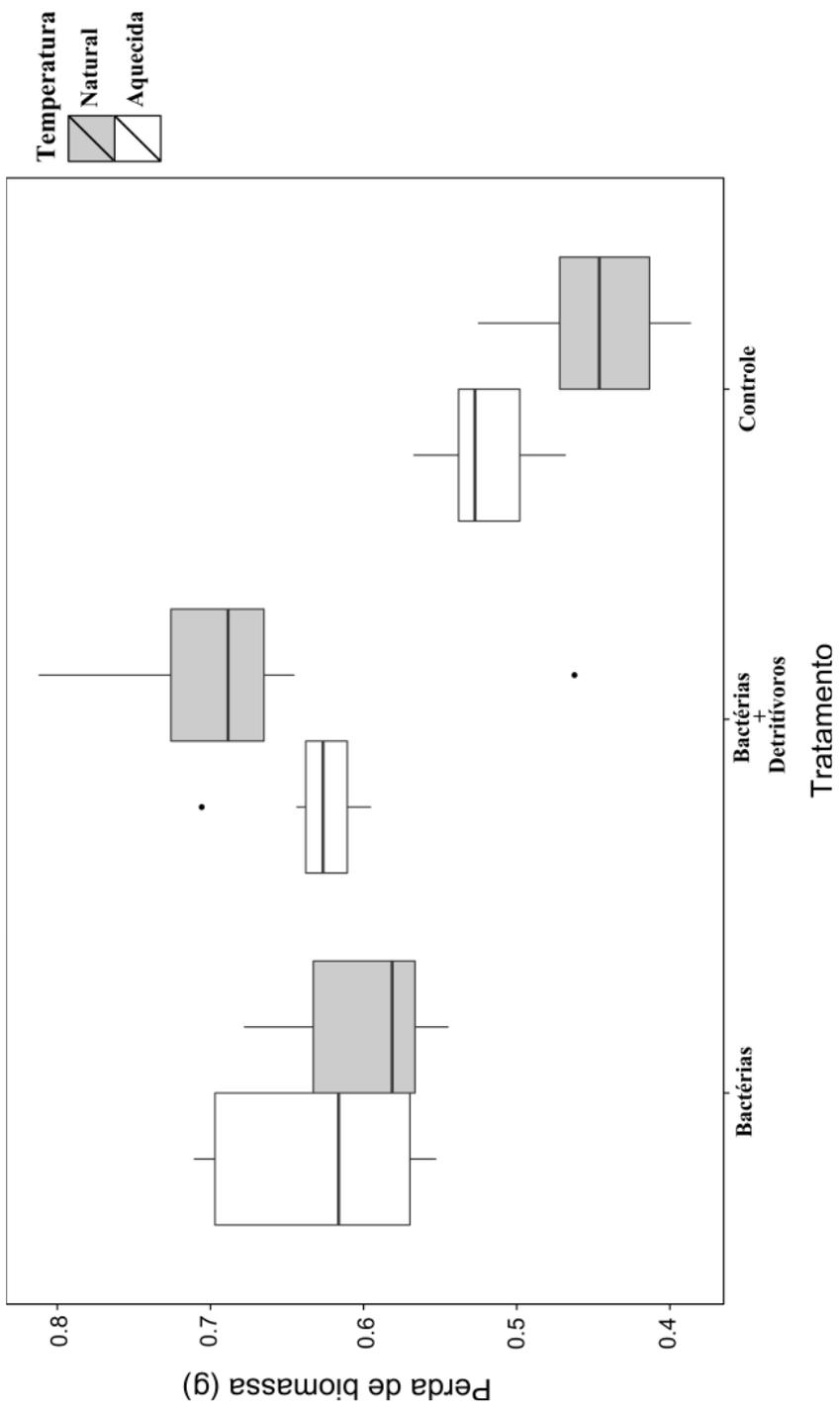


Fig.9.

APÊNDICES

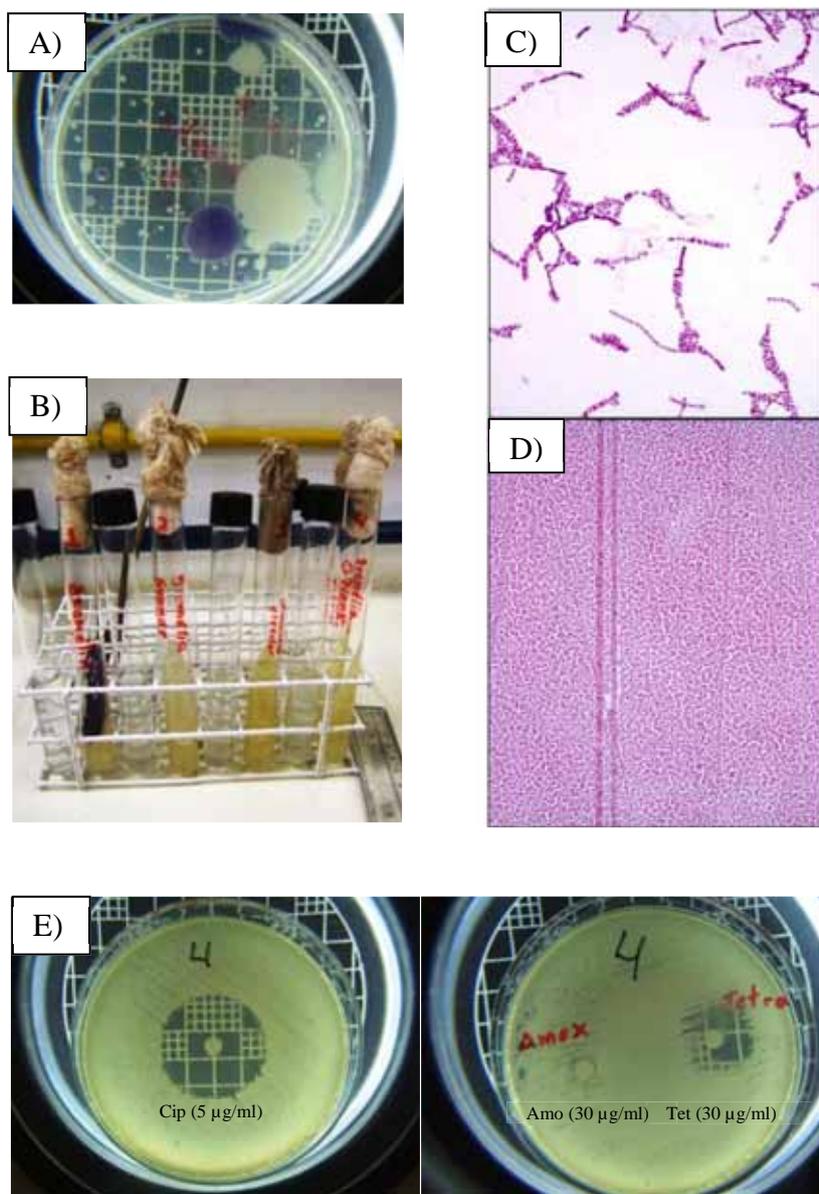
APÊNDICE 1.

Escolha do antibiótico

Para definirmos o antibiótico a ser utilizado, amostramos água de 20 bromélias distribuídas na restinga fechada. Coletamos, com auxílio de pipetas e baldes previamente desinfetados com álcool a 70%, a água de cada bromélia e após homogeneização, recolhemos duas amostras de 15 ml em tubos estéreis. Os tubos foram armazenados em ambiente refrigerado e encaminhado para o laboratório de engenharia de alimentos no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Em laboratório as amostras foram homogeneizadas, diluídas, em duplicatas, até 10^{-2} , fizemos o plaqueamento por profundidade em PCA e incubamos as amostras por 48 horas a 35 °C. As colônias foram diferenciadas, a olho nu, segundo o tipo de morfologia de cada uma; isolamos cinco colônias e as submetemos ao teste de coloração de Gram segundo Martins et al. (2001) (Apêndice 1a e b). Das cinco colônias, três representavam bactérias gram-negativas e duas gram-positivas.

Após a identificação, quanto à coloração, submetemos as cinco colônias ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizando o método disco de difusão, recomendado pela CLSI (2012). Preparamos os cinco inóculos na escala 0.5 McFarland (Apêndice 1 b) e semeamos em Ágar Mueller-Hinton (MHA) totalizando seis placas (100 x 20 mm) estéreis para cada inóculo. Para o teste de sensibilidade, utilizamos discos de difusão de três tipos diferentes de antibióticos, dois gram-negativos (Tetraciclina e Ciprofloxacina) e um gram-positivo (Amoxicilina) baseado nos trabalhos de Gonçalves et al. (2014) e Nishi et al. (2012).

Produzimos, manualmente, os discos de 6 mm de diâmetro devidamente esterilizados. Testamos cada disco contendo a concentração padrão de cada antibiótico, estipulada pela CLSI (2012). Além destas concentrações, simulamos a ação conjunta dos antibióticos gram-positivo e gram-negativo em três concentrações diferentes partindo da concentração padrão e aumentando 20 vezes a concentração (Apêndice 2 - Tabela 1). Utilizamos discos industrializados de Ciprofloxacina e Tetraciclina como controle sobre a eficácia dos discos produzidos manualmente. As amostras foram incubadas a 35 °C por 18-24 horas. O antibiograma demonstrou que a Ciprofloxacina em sua menor concentração foi mais eficiente que os demais antibióticos mesmo quando estes estavam atuando em conjunto. Não houve diferença entre os alos de inibição formados para Ciprofloxacina em concentrações maiores (Apêndice 1 e) e, portanto foi definida a concentração de 5 µg/ml como padrão a ser utilizado no experimento.



Apêndice 1. A) Placa de petri com diluição 10^{-2} disposta sobre contador de colônias. B) Colônias isoladas com inóculos na escala 0.5 McFarland à esquerda. C) Fotos de bactéria gram-positiva, retirada em microscópio eletrônico, após teste de coloração. D) bactéria gram-negativa. E) Resultado do antibiograma para a quarta colônia isolada. À esquerda o disco de difusão padrão com alo de inibição de 35 mm para o antibiótico Ciprofloxacina (Cip) e à direita os discos de difusão padrão sem alo de inibição para Amoxicilina (Amo) e com alo de 13 mm para Tetraciclina (Tet).

Apêndice 2 - Tabela 1: Susceptibilidade aos antimicrobianos Ciprofloxacina (Cip), Tetraciclina (Tet) e Amoxicilina (Amo). Controle são os discos industrializados. Padrão são discos que seguem a concentração estipulada pela CLSI (2012). S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

Antibióticos (µg/mL)	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5
Cip (5 µg/mL) Controle	S	S	S	S	S
Tet (30 µg/mL) Controle	S	S	S	S	S
Amo (30 µg/mL) Padrão	S	R	S	R	S
Tet (30 µg/mL) Padrão	S	R	S	I	I
Cip (5 µg/mL) Padrão	S	S	S	S	S
Amo + Tet (30 µg/mL+30µg/mL)	S	I	S	I	S
Amo + Tet (50 µg/mL+50 µg/mL)	S	R	S	I	S
Amo + Tet (70 µg/mL+70 µg/mL)	S	R	S	I	S
Amo + Cip (30 µg/mL + 5µg/mL)	S	S	S	S	S
Amo + Cip (50µg/mL+25µg/mL)	S	S	S	S	S
Amo + Cip (70µg/mL+45µg/mL)	S	S	S	S	S

APÊNDICE 3

Efeito do antibiótico sobre o crescimento da bromélia

Para avaliar se o antibiótico escolhido afeta o crescimento das bromélias, realizamos um experimento piloto onde coletamos 12 bromélias, na restinga fechada, com volumes médios de 390 ml e tamanhos semelhantes. Todas as plantas foram minuciosamente lavadas com jato de água durante 10 min com o intuito de remover todos os organismos e detritos presentes no fitotelmata. Após a limpeza, mensuramos com auxílio de uma fita métrica, o comprimento de uma folha do copo central e uma folha do terceiro copo, a partir da base até a extremidade foliar, e contabilizamos o número de folhas do copo central incluindo as mais jovens no centro do tanque para avaliar o crescimento da bromélia. Em seguida, penduramos as bromélias com os tanques virados para baixo por dois dias, visando manter a bromélia seca e eliminar a possibilidade de permanência de algum artrópode aquático. As raízes foram mantidas umedecidas com papel absorvente embebido em água para evitar dessecação das plantas (Apêndice 3a). Depois, plantamos as bromélias em vasos com solo proveniente da restinga e dividimos, aleatoriamente, em dois tratamentos. O tratamento controle (sem antibiótico) e o tratamento com antibiótico, ambos com seis bromélias. Preenchemos cada bromélia com 390 ml de água deionizada e no tratamento com antibiótico adicionamos 5 µg/ml de Ciprofloxacina. Em seguida, cobrimos as plantas com mosquiteiros e deixamos por 60 dias no Camping, em baixo de uma tenda para evitar a entrada de água da chuva (Apêndice 3 b e c). Adicionamos 195 ml de água deionizada nos tanques das bromélias, a cada cinco dias, com o intuito de repor a água perdida por evaporação. A água adicionada no tratamento com antibiótico continha o antimicrobiano diluído para manter a concentração constante. Após 60 dias, o comprimento das folhas não

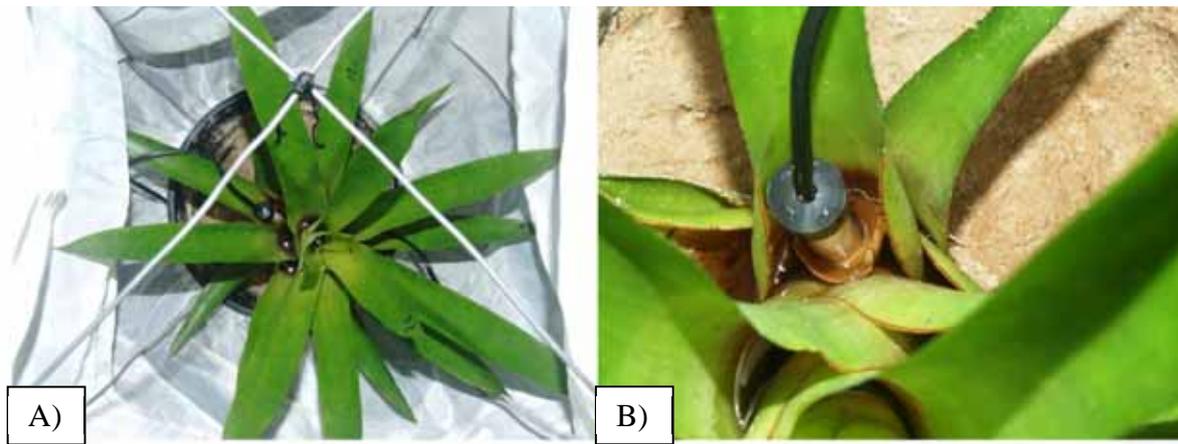
diferiu entre o tratamento com e sem antibiótico ($t= 0.616$; $p= 0.552$), entre todas as réplicas somente uma folha nova foi produzida no tratamento com e sem antibiótico. Os resultados desse bioensaio demonstraram que o antibiótico não afeta o desenvolvimento da *Q. arvensis*.



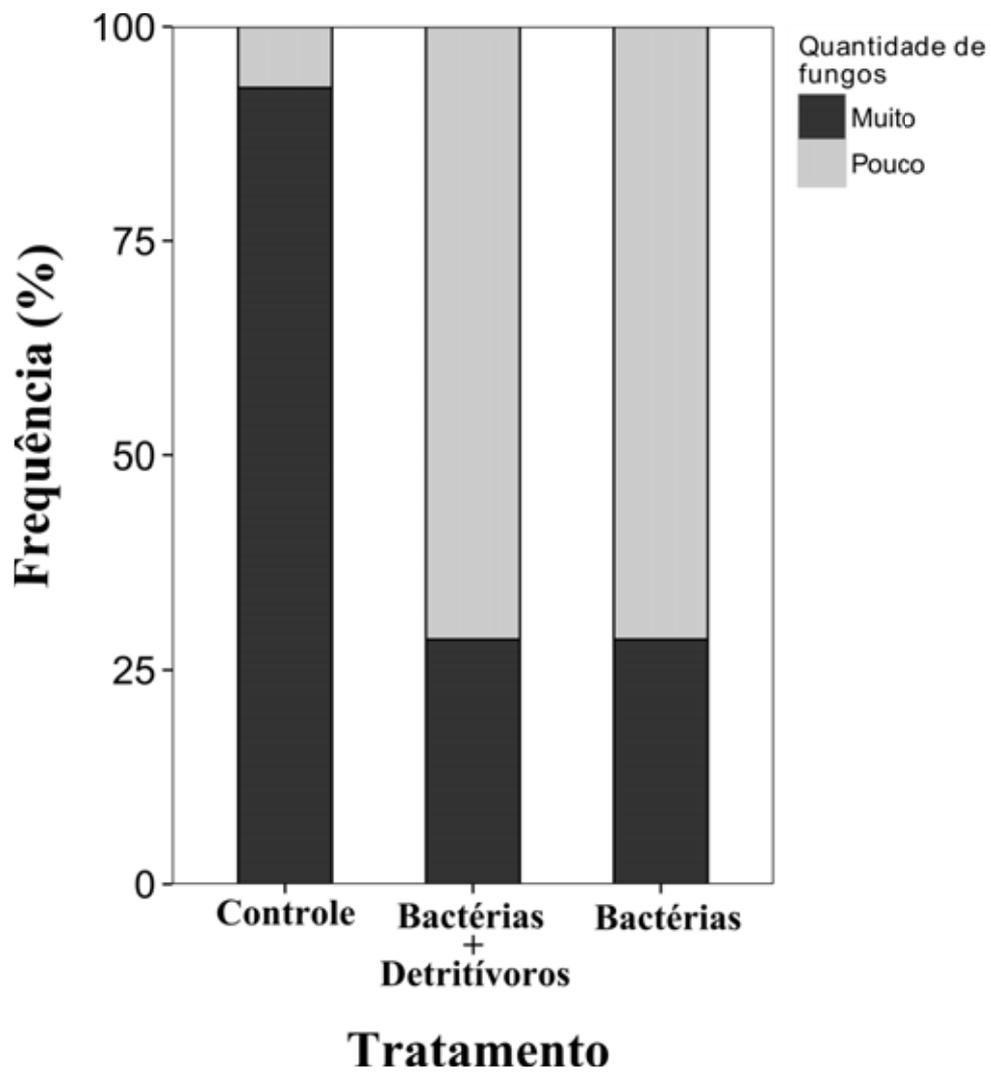
Apêndice 3. A) bromélias secando com as raízes enroladas em papel umedecido; B) bromélia replantada com mosquiteiro protegendo contra colonização; C) Foto do teste piloto com as 12 bromélias para avaliar o efeito do antibiótico na bromélia.



Apêndice 4. A) *Datalogger* utilizado para medir a temperatura da água nos tanques das bromélias. B) Os *dataloggers* foram colocados no tanque central da bromélia *Quesnelia arvensis* durante o período de quatro dias, registrando as temperaturas de hora em hora.

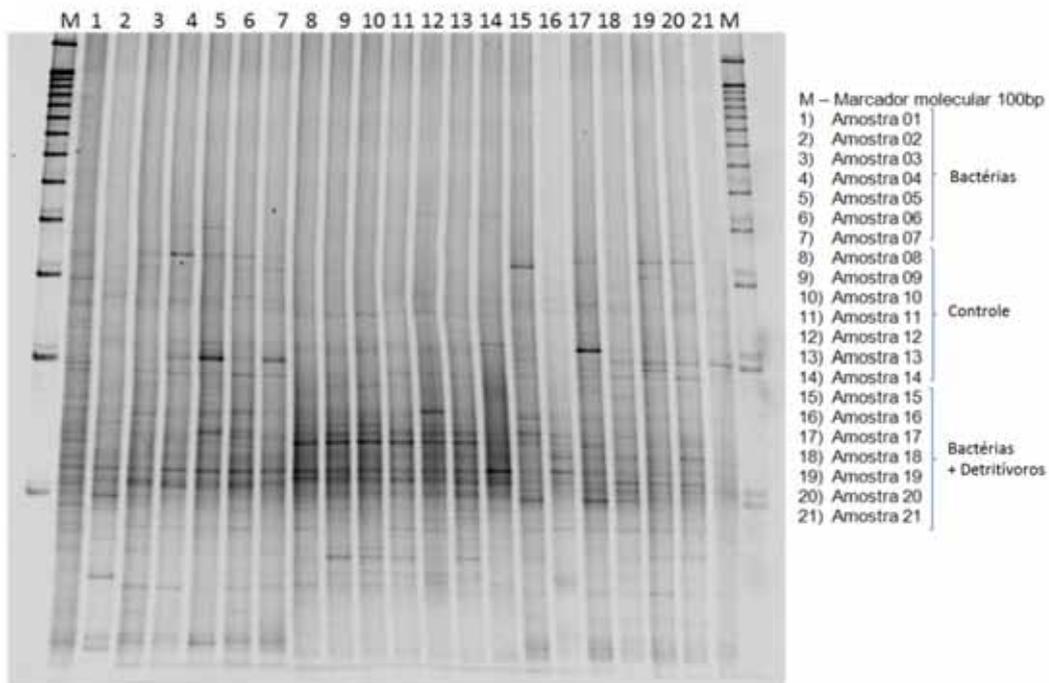


Apêndice 5. A) Distribuição dos dois aquecedores nos fitotelmatas do copo periférico. B) Aquecedor envolto com pedaços de folhas da bromélia *Q. arvensis*.

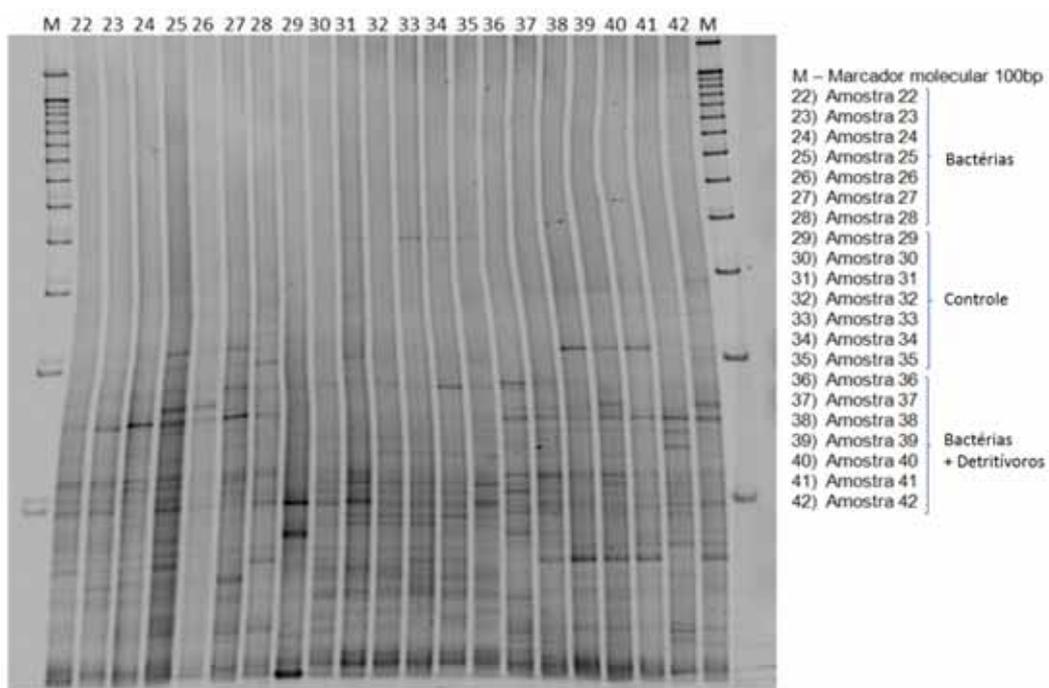


Apêndice 6. Frequência da quantidade de fungo nos tratamentos Controle, Bactérias e Bactérias + Detritívoros.

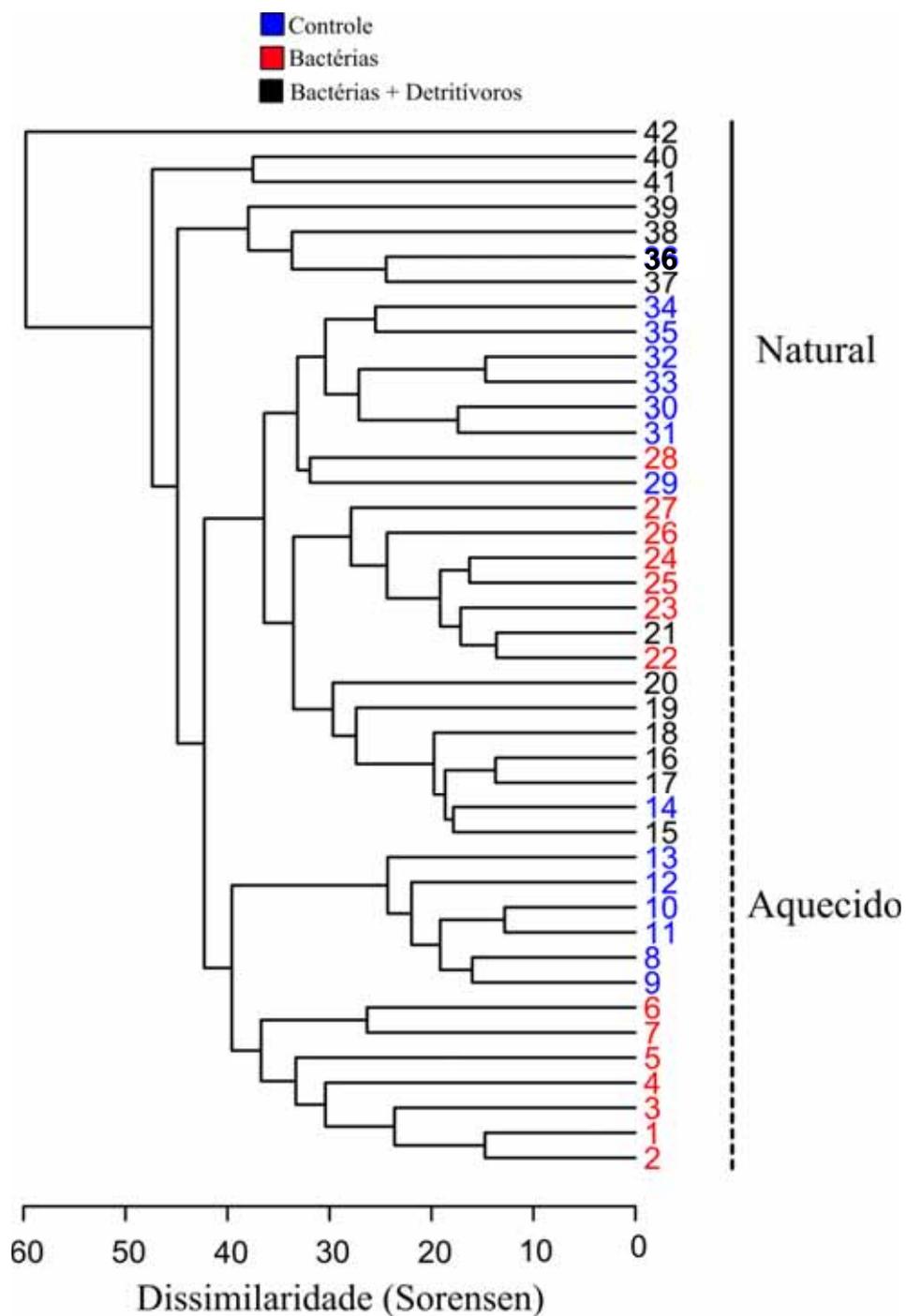
A)



B)



Apêndice 7. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) demonstrando a estrutura da comunidade bacteriana nas amostras de água dos fitotelmatas de bromélias submetidas ao aquecimento (A) e à temperatura natural (B). A descrição das amostras correspondentes às canaletas está detalhada ao lado das figuras.



Apêndice 8. Dendograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras de água dos fitotelmatas das bromélias dos níveis de temperatura aquecida e natural e dos três níveis de tratamento: i) Bactérias, ii) Bactérias + Detritívoros, iii) Controle.