

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS
CONTINENTAIS

Processamento de matéria orgânica em riachos tropicais: o papel dos microrganismos e de espécies exóticas de plantas

LARYSSA HELENA RIBEIRO PAZIANOTO

Orientadora: Dra. Evanilde Benedito

Maringá, 2016

1. INTRODUÇÃO/FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Entre os diversos fatores que influenciam o metabolismo de ecossistemas aquáticos lóticos destaca-se a decomposição da matéria orgânica, onde a matéria particulada grossa é convertida em moléculas menores através de processos físicos, químicos e biológicos (Farjalla *et al.*, 1999), tornando-se então disponível para as diferentes comunidades aquáticas, que contribuem diretamente para o fluxo de energia dos ecossistemas (Griffiths *et al.*, 2012). Em corpos aquáticos de pequeno porte, como riachos de baixa ordem ou cabeceiras, o aporte de matéria orgânica da vegetação ripária, principalmente as folhas, merece especial atenção, uma vez que nestes ambientes o metabolismo heterotrófico é dominante (Esteves & Gonçalves, 2011). Neste contexto, a composição e manutenção da vegetação ripária são de importância crucial, uma vez que representa a principal fonte de energia desses ambientes (Tank *et al.*, 2010).

A composição de espécies da vegetação ripária está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade da matéria orgânica que é depositada no riacho (Kominoski *et al.*, 2011), contribuindo para o estabelecimento de uma determinada dinâmica de processamento e fluxo de energia. Dessa forma, alterações na composição de espécies, pela retirada de indivíduos ou pela entrada de uma espécie exótica, por exemplo, afetará diretamente as características do detrito produzido, influenciando consequentemente a diversidade, estrutura trófica e dinâmica das comunidades aquáticas (Reinhart & Vande Voort, 2006; Going & Dudley, 2008; Hladysz *et al.*, 2011). Diversos estudos têm dedicado atenção especial à influência de espécies exóticas de plantas sobre o funcionamento dos ecossistemas aquáticos quando invadem áreas ripárias, evidenciando os efeitos negativos sobre as comunidades e a importância de medidas de manejo dessas espécies (Serra *et al.*, 2013; Freund *et al.*, 2013; Claeson *et al.*, 2014).

A magnitude dos efeitos tem relação direta com características anatômicas e fisiológicas das folhas das espécies vegetais, muitas vezes mais do que com sua origem. Neste contexto, algumas espécies poderiam ser consideradas alvo em planos de manejo e conservação, por apresentarem características que as tornam potencialmente invasoras, como maior resistência a estresse hídrico e elevada incidência luminosa, permitindo a chegada e estabelecimento das mesmas em áreas ripárias que sofrem com a retirada da vegetação nativa. Além da baixa concentração de nutrientes e presença de compostos recalcitrantes ou inibidores de atividade microbiana, como taninos e polifenóis, que afetam a colonização e a dinâmica das cadeias alimentares.

Sendo assim, torna-se necessário um maior entendimento do papel de espécies exóticas sobre os processos ecossistêmicos de ambientes aquáticos, já que podem afetar sobremaneira o fluxo de energia e as interações nestes ambientes. Neste ponto de vista, destaca-se a necessidade de compreender o efeito das exóticas sobre o processamento da matéria orgânica quando em mistura com espécies nativas, bem como os principais responsáveis e fatores reguladores da sua decomposição e conseqüente transferência da sua energia pelo ambiente. Muito se conhece sobre o efeito de fatores abióticos como, por exemplo, velocidade (Ferreira *et al.*, 2006), temperatura (Webster & Benfield, 1986) e pH (Mulholland, *et al.* 1987) da água sobre os coeficientes de decaimento de matéria orgânica. Entretanto, ainda permanece incerto o real papel dos organismos aquáticos sobre estes processos, principalmente em ambientes tropicais (Hieber & Gessner, 2002).

De acordo com o Conceito do Rio Contínuo (RCC - Vannote *et al.*, 1980), em riachos temperados, cabe aos insetos aquáticos raspadores e trituradores o papel central no processamento da matéria orgânica alóctone que atinge estes ambientes. Por outro lado, para riachos tropicais, há relatos da ausência ou escassez de tais insetos (Mathuriau & Chauvet, 2002; March & Pringle, 2003), destacando-se a atuação de macroconsumidores como camarões (March *et al.*, 2002; Benstead *et al.*, 2009) e peixes (Wantzen *et al.*, 2008) e também dos microorganismos (Findlay, 2010). Estes últimos são considerados por alguns autores como os principais reguladores do processamento de matéria orgânica em riachos de pequeno porte de regiões tropicais (Dobson *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2006; Boyero *et al.*, 2012), e fundamentais para as interações tróficas destes ambientes, uma vez que as cadeias alimentares microbianas (“*microbial loop*”) são responsáveis pela remineralização da matéria orgânica, e pela maior parte da ciclagem de nutrientes nos ecossistemas aquáticos (Thomaz, 1999). Por outro lado, dado as dificuldades logísticas, metodológicas e muitas vezes financeiras que envolvem o estudo dos microrganismos, ainda existe uma escassez de dados sobre esta comunidade (Findlay, 2010; Gonçalves-Jr. *et al.*, 2014).

Os microrganismos, notadamente fungos e bactérias, desempenham papel crucial nos processos de decomposição, principalmente pela capacidade de incorporarem nutrientes em seu metabolismo para a produção secundária e assim, aumentam a palatabilidade e o valor nutricional dos detritos, de modo que os mesmos se tornam disponíveis e podem ser utilizados por invertebrados e macroconsumidores (peixes e camarões) (Abelho, 2001; Graça *et al.*, 2001). No entanto, a importância de cada grupo e as interações entre os mesmos ainda é pouco compreendida e em alguns casos controversa. Alguns trabalhos têm relatado uma maior importância das bactérias nos estágios iniciais de decomposição, devido à capacidade de

mineralizarem a matéria orgânica, metabolizando proteínas e açúcares simples (Gulis & Suberkropp, 2003). Nas etapas seguintes as bactérias seriam substituídas pelos fungos aquáticos, capazes de decompor polímeros complexos restantes na parede celular vegetal, como celulose e lignina (Gonçalves *et al.*, 2006). Entretanto, um padrão ainda não foi estabelecido, uma vez que outras pesquisas apontam maior importância de bactérias nos estágios finais da decomposição (Hiebe & Gessner 2002; Das *et al.*, 2007).

Cabe destacar que até mesmo os microrganismos podem alterar sua atividade de acordo com as características nutricionais e bioquímicas do material em decomposição (Gonçalves-Jr. *et al.*, 2014). A dureza das folhas, por exemplo, está relacionada com a presença de elevados teores de compostos estruturais como lignina e celulose. Estes compostos acabam por agir como uma barreira física à colonização por microrganismos, já que nem todos possuem enzimas capazes de processar proteínas de elevada complexidade (Graça, 2001). A quantidade de nutrientes, por sua vez, é essencial na qualidade do detrito, já que os microrganismos tendem a consumir preferencialmente e crescer mais em folhas ricas em nutrientes, notadamente em nitrogênio (Friberg & Jacobsen 1999). Por fim, a presença de inibidores químicos (compostos fenólicos) também diminui a colonização microbiana, pois inibem a ação de enzimas digestivas e o consequente consumo dessas folhas, devido sua toxicidade e impalatabilidade (Graça, 2001; Monteiro, *et al.* 2005).

Dessa forma, o presente projeto tem por objetivo geral investigar o papel dos microrganismos (bactérias e fungos) no processamento de plantas nativas e exóticas de distintas composições químicas, bem como o efeito da entrada de plantas exóticas sobre os processos de decomposição de riachos Neotropicais, através de experimentos de processamento foliar *in situ*. Para isso o projeto será dividido em dois capítulos, cada um abordando os diferentes experimentos que serão realizados.

1.1 Hipóteses/Predições

- **Capítulo 1:** Papel dos microrganismos no processamento de plantas nativas e exóticas de distintas composições químicas

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) definir as diferenças estruturais e químicas de plantas nativas e exóticas;
- 2) avaliar se a atividade e composição de espécies de microrganismos que atuam sobre plantas nativas e exóticas influenciam o seu processamento;
- 3) investigar possíveis diferenças nas taxas de processamento de plantas nativas e exóticas.

H₁: A atividade dos microorganismos (fungos e bactérias) é maior em folhas das plantas nativas do que em plantas exóticas.

Predição 1: espera-se que a espécie de planta exótica selecionada possua maior concentração de compostos recalcitrantes e inibidores das atividades microbianas do que as espécies nativas, resultando em maior atividade dos microorganismos em plantas nativas.

Predição 2: espera-se que a atividade de microorganismos seja maior nos períodos iniciais do processamento nas folhas nativas, e mais tardia (comparativamente) em folhas da espécie exótica, devido à presença dos compostos recalcitrantes.

H₂: a espécie de planta exótica é colonizada com maior frequência por microorganismos adaptados ao processamento de compostos estruturais (lignina e celulose), representados por organismos zoospóricos (fungos) e bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Cellulomonas*.

Predição 1: espera-se que os fungos e bactérias que colonizam plantas nativas ocorram em baixa abundância e frequência na espécie exótica, ou seja, ocorre uma substituição de espécies.

H₃: As taxas de processamento da matéria orgânica são maiores nas plantas nativas.

Predição 1: devido às diferenças de composição estrutural e química, composição de espécies e atividade de microorganismos entre as espécies nativas e exóticas, as taxas de processamento são maiores nas plantas nativas.

- **Capítulo 2:** Efeito de uma planta exótica sobre o funcionamento de riachos tropicais

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) investigar o efeito de uma espécie exótica sobre o processamento da espécie nativa mais abundante;
- 2) verificar possíveis diferenças nas comunidades de macroinvertebrados e macroconsumidores (peixes e camarões) associados às plantas nativas e exótica;

H₁: A atividade dos microorganismos (fungos e bactérias) é maior quando a espécie nativa ocorre sozinha (*packs* individuais).

Predição 1: espera-se que a mistura de espécies nativa e exótica apresente menor atividade de microrganismos devido à presença dos compostos recalcitrantes e inibidores da decomposição da espécie exótica.

H₂: a abundância e riqueza de espécies de macroinvertebrados e macroconsumidores é maior nos *packs* individuais do que nos mistos.

Predição 1: devido às características estruturais e químicas da plantas exótica espera-se uma abundância e riqueza de espécies menor nos *packs* em que a mesma ocorrer.

H₃: as taxas de processamento da planta nativa são maiores quando a mesma ocorre sozinha (*packs* individuais).

Predição 1: devido às características estruturais e químicas da planta exótica a taxa de processamento da nativa será reduzida nos *packs* mistos, quando comparados com os *packs* individuais, em decorrência de uma menor atividade e ocorrência de microrganismos, macroinvertebrados e macroconsumidores.

2. METAS A SEREM ALCANÇADAS

- Definir as diferenças físicas e químicas de espécies de plantas nativas e exótica;
- Obter os coeficientes de decaimento (*k*) para espécies de plantas nativas e exótica;
- Avaliar a atividade e colonização temporal de bactérias e fungos em espécies de plantas nativas e exótica em experimentos de decomposição *in situ*;
- Identificar as espécies de bactérias, fungos, macroinvertebrados e macroconsumidores presentes em folhas de plantas nativas e exóticas em experimentos de decomposição *in situ*;
- Verificar a redução das taxas de decaimento (*k*) de espécies nativas quando em mistura com a espécie exótica.

3. METODOLOGIA

3.1 Escolha dos locais e espécies de plantas

A escolha dos riachos, bem como das espécies de plantas a serem utilizadas no presente projeto foram baseadas em resultados preliminares obtidos em um projeto de Doutorado conduzido no Laboratório de Ecologia Energética do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Esses resultados possibilitaram a identificação das espécies vegetais nativas dominantes das zonas ripárias, bem como a presença conspícua da exótica *Psidium guajava* L. (goiabeira), além da definição da composição de espécies animais que ocorrem nos diferentes ambientes, favorecendo assim a logística e viabilidade da atual proposta.

Pretende-se usar como espécies nativas as arbóreas *Trichilia pallida* Swartz, *Guarea kunthiana* A.Juss., *Nectandra cuspidata* Nees, *Cariniana estrellensis* Mart. O. Ktze., *Endicleria paniculata* (Spreng) Macbride e *Inga* sp. e como exótica *Psidium guajava* L. Estas espécies foram escolhidas por ocorrerem em grande parte dos riachos da região Noroeste do Paraná, sendo de fácil acesso e obtenção, além de fácil manuseio.

3.2 Obtenção das folhas e análise de composição foliar

Para a realização dos dois experimentos as folhas utilizadas serão coletadas através de redes de nylon instaladas na zona riparia. Serão instaladas cerca de 20 redes por riacho, próximas as espécies selecionadas e fixadas a aproximadamente 1,5 m do chão. As redes serão constantemente revistadas e as folhas recolhidas. Estas folhas serão colocadas em caixas de papelão e mantidas no laboratório em temperatura ambiente ate inicio dos experimentos. Procurou-se evitar a secagem em estufa em temperaturas mais elevadas, devido à possibilidade deste processo alterar as taxas naturais de decomposição (Gessner & Dobson, 1993). Para as análises de composição foliar serão obtidas três amostras de $3\pm 0,2$ g de folha de cada espécie. Essas folhas serão secas por 48 horas a 60°C, moídas em macerador de esferas, acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da UEM para a realização das análises de nutrientes (C, N e P), teor de lignina, celulose, fibras, dureza, taninos e polifenóis.

Com os resultados das análises de nutrientes e compostos estruturais as espécies serão classificadas de acordo com a qualidade do detrito em três categorias: 1) detrito de alta qualidade nutricional (espécies que apresentarem maiores valores de nutrientes e menores valores de compostos estruturais), 2) detrito refratário (espécies que apresentarem menores

valores de nutrientes e maiores valores de compostos estruturais) e 3) detrito intermediário (valores intermediários entre as duas categorias anteriores).

3.3 Variáveis abióticas e análise de nutrientes da água

No momento de instalação do experimento serão tomadas as seguintes variáveis abióticas: concentração de oxigênio dissolvido (mg/l e %), condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, turbidez (UNT) e temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) com auxílio de oxímetro digital portátil (YSI[®] 550A), potenciômetros digitais portáteis (Digimed[®]), turbidímetro digital portátil (LaMotte[®]) e termômetro analógico. Para a investigação física do hábitat serão tomadas a profundidade e largura do canal com auxílio de uma trena, enquanto velocidade, volume e vazão da água com fluxômetro (General Oceanics[®]), bem como a utilização de um Protocolo de Avaliação do Ambiente (Cionek *et al.*, 2011).

A fim de caracterizar os riachos quanto à concentração de nutrientes, nove amostras de água de cada riacho serão tomadas em frascos de polietileno de 500 ml esterilizados, quando da instalação do experimento. Das nove amostras coletadas, três serão destinadas para análise de nutrientes totais (nitrogênio total e fósforo total) amostradas diretamente do riacho e congeladas, e três para nutrientes dissolvidos (NO_3^- , NH_3^+ e ortofosfato), amostradas, mantidas em refrigeração para filtração em filtro de fibra de vidro, e então congeladas. Essas análises serão realizadas em parceria com o Laboratório de Limnologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As três amostras restantes serão enviadas para análise de Carbono Orgânico Dissolvido (COD), realizadas pelo laboratório Ambientale, Maringá – PR.

Os filtros utilizados para a filtração de água serão previamente calcinados e pesados. O conteúdo retido nos filtros será utilizado para determinação do material em suspensão na água. Para tanto os filtros serão submetidos à secagem por 48 horas a 60°C , pesagem para determinação do peso total, e então submetidos à calcinação em forno mufla por 4 horas a 500°C e pesagem final para determinação da fração inorgânica contida no material em suspensão. A fração orgânica é obtida pela subtração da fração inorgânica do peso total. A concentração de clorofila-a ($\mu\text{g}/\text{l}$) será obtida com auxílio de fluorímetro portátil a fim de obter uma medida indireta da produção primária local.

3.4 Capítulo 1 – Experimento 1

OBJETIVO GERAL: investigar o papel dos microorganismos (bactérias e fungos) sobre o processamento de plantas nativas e exótica de diferentes composições químicas.

3.4.1. Área de estudo

A área de estudo compreende três riachos de 1ª ordem, localizados sob domínio da Formação Arenito Caiuá e fitossociologia de Floresta Estacional Semidecidual. Dois riachos drenam fragmento de vegetação na região do distrito de Cristo Rei – PR. O terceiro riacho (riacho Scherer) nasce e drena a Estação Ecológica do Caiuá (EEC) no município de Diamante do Norte – PR.

Estes riachos foram escolhidos por apresentarem as espécies de plantas nativas selecionadas em co-ocorrência, garantindo a validação do objetivo geral do experimento, uma vez que o ambiente permite o desenvolvimento e adaptação dos microorganismos com as espécies de interesse.

3.4.2. Delineamento experimental

A obtenção das folhas para os experimentos seguirá a metodologia já descrita acima (Ver tópico 3.2 Obtenção das folhas e análise de composição foliar).

Para a realização do experimento 1 serão confeccionados *packs* de $15 \pm 0,2$ g para cada espécie. Para a confecção de cada *pack* as folhas serão presas por um fio de algodão, permitindo assim a contabilização do material remanescente após cada retirada (será considerado material remanescente apenas o que estiver preso ao fio de algodão ao final de cada retirada). Após confeccionados, os *packs* serão colocados em *litter bags* de abertura de malha de 0,5 mm (exclusão total), a fim de permitir a entrada e o desenvolvimento apenas dos microorganismos (bactérias e fungos).

Os *litter bags* confeccionados serão dispostos em locais com maior acúmulo de folhas e menor velocidade de água (remansos), com aproximadamente 0,5 m de distância um do outro no dia 0, e retirados em três réplicas por espécie, aleatoriamente, nos tempos pré-determinados (dias 1, 7, 14, 28, 42, 67, 92 e 117). Em cada retirada, os *litter bags* serão colocados em sacos plásticos, individualmente lacrados e transportados até o laboratório em caixas térmicas com gelo. As amostras permanecerão resfriadas a aproximadamente 4° C.

Serão confeccionados três *packs* de cada espécie para correção de transporte. Esses *packs* serão mantidos no carro durante toda a instalação do experimento e no último riacho serão submersos por cerca de 10 segundos, colocados de volta no carro, levados ao laboratório e processados da mesma forma que as outras amostras. O peso seco dos fragmentos das folhas

perdidos durante o transporte e manipulação será registrado e posteriormente utilizado como fator de correção.

3.4.3. Atividade dos microrganismos e Massa Seca Livre de Cinzas (MSLC)

Em laboratório após cada retirada as folhas serão lavadas com água destilada esterilizada em fluxo lento para remoção do excesso de detrito e material fracamente aderido. Posteriormente serão extraídos 21 discos de 10 mm de diâmetro de cada *pack*. Desse total, cinco serão destinados às análises de ATP ($\mu\text{mol ATP g}^{-1}$ de peso seco) para determinação da atividade microbiana total, seguindo Abelho (2005), cinco discos para análises de ergosterol ($\mu\text{mol ergosterol g}^{-1}$ de peso seco) para determinação de atividade fúngica de acordo com Gessner & Newell (2002) e cinco discos para obtenção da Massa Seca Livre de Cinzas (MSLC). Os seis discos restantes serão destinados para o isolamento dos microrganismos, sendo três para fungos e três para bactérias (Ver tópico seguinte).

Após remoção, os conjuntos de cinco discos para as análises de ATP e ergosterol serão colocados em envelopes de papel alumínio devidamente identificados e mantidos congelados a -20°C , até realização das análises, que serão feitas no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

Posteriormente à retirada de todos os discos, o material restante das folhas será seco em estufa de ventilação forçada por 48 horas à 60°C e pesado em balança de precisão para obtenção da diferença entre a biomassa seca inicial e a final. Feito isso as folhas serão maceradas em macerador de esferas e queimadas em mufla a 500°C por 4 horas, para obtenção da MSLC, considerando que os organismos não utilizam os compostos inorgânicos da folha. O mesmo procedimento será aplicado a um dos conjuntos de cinco discos retirados inicialmente, para correção da perda de peso devido à retirada dos discos para as análises de ATP, ergosterol e isolamento dos microrganismos. A MSLC final do folheto de cada *pack* será medida através da subtração da massa seca da massa de cinzas (Kimoski *et al.*, 2011).

3.4.4. Obtenção, isolamento e identificação dos microrganismos

- **Comunidade fúngica:** os discos destinados à identificação dos fungos serão novamente fragmentados, submetidos a diferentes métodos de isolamento a fim de se obter os principais grupos envolvidos no processo de decomposição do material foliar:

1) *Fungos ingoldianos*: os fragmentos serão dispostos em placas de Petri contendo água destilada esterilizada e incubados em temperaturas entre 15°C a 20°C durante 5-10 dias (Ingold, 1975);

2) *Fungos facultativos*: os fragmentos serão lavados sob água corrente durante 30 min e em seguida dispostos em placas de Petri contendo papel de filtro úmido esterilizado (câmaras úmidas), que serão incubadas à temperatura ambiente até 30 dias (Castañeda-Ruiz et al., 2005).

3) *Organismos zoospóricos*: os fragmentos serão dispostos em placas de Petri contendo água destilada esterilizada e serão iscados com substratos celulósicos, queratinoso e quitinoso, conforme metodologia descrita em Milanez (1989). Posteriormente, as placas serão incubadas em temperaturas entre 15°C a 20°C durante 5-7 dias;

Nas três situações, durante o período de incubação, regularmente os fragmentos serão colocados entre lâmina e lamínula com gotas de água destilada esterilizada e levados ao microscópio óptico. As estruturas de valor taxonômico detectadas serão medidas, ilustradas em câmara clara e fotografadas para fins de documentação. A identificação das espécies será conduzida por meio de consulta a chaves de classificação e literatura específica (Ingold 1975; Marvanová 1997, entre outros). Serão confeccionadas ainda lâminas permanentes com o meio de montagem PVLG - álcool polivinílico acrescido de lactofenol e glicerina (Morton *et al.* 1993), para depósito em herbário específico. A obtenção de culturas será realizada através da captura e transferência de pequenos fragmentos das folhas colonizadas para meio de cultura (meio de extrato de malte a 2%) contido em placas de Petri. Diariamente a germinação dos conídios será acompanhada. Partes da colônia livre das contaminações serão transferidas para novas placas de Petri contendo meio de cultura, até a obtenção de culturas puras, para possíveis análises moleculares se necessário.

- Comunidade bacteriana:

1) *Microbiota transitória*: para a avaliação da microbiota transitória os discos foliares retirados serão colocados em placas de 24 poços estéreis contendo solução salina 0,85%. Estes discos passarão por cinco lavagens sucessivas, sendo deixadas em repouso por cinco minutos em cada lavagem. Posteriormente, o líquido resultante de cada lavagem será pipetado (100 µl) e plaqueado em superfície de ágar nutriente. As placas serão então incubadas em estufa a 35°C durante 24 horas;

2) *Microbiota aderida*: para a avaliação da microbiota aderida os discos foliares utilizados anteriormente serão colocados em tubos estéreis contendo solução salina 0,85% e submetidos à agitação ultrassônica a 25 KHz por 5 minutos para liberação dos microrganismos aderidos do substrato foliar. O líquido resultante deste processo será então pipetado (100 µl) e plaqueado em superfície de ágar nutriente. As placas serão então incubadas em estufa a 35°C durante 24 horas;

Nos dois casos, ao final do processo de incubação, as colônias que apresentarem diferentes características morfológicas nas placas passarão por coloração de Gram e posteriores provas bioquímicas específicas de acordo com as características morfotintoriais das colônias formadas, possibilitando assim a identificação das espécies. As colônias puras obtidas serão mantidas em refrigeração (4°C) para posterior envio para análises moleculares se necessário.

3.4.5 Análises estatísticas

Para avaliar se a atividade dos microrganismos, dada pela concentração de ATP e ergosterol, é diferente entre as espécies de plantas e ao longo do tempo será aplicada uma ANCOVA, assumindo o tempo de imersão como co-variável e as espécies de planta como categóricas.

O componente riqueza (S) será considerado como o número de espécies de fungos e bactérias na unidade de amostragem definida, no caso os *packs* de cada espécie de planta. Será aplicada uma análise de escalonamento multidimensional não-métrica (NMS – *Nonmetric Multidimensional Scaling*), a fim de investigar se grupos específicos de fungos ou bactérias se relacionam com determinada espécie de planta.

As taxas de processamento da matéria orgânica foliar serão avaliadas pela determinação, através de regressão linear, das taxas de quebra exponenciais (k), com a massa inicial das folhas fixadas em 100%, contra o tempo (Gimenes *et al.*, 2010). Dados para a massa remanescente de folhas serão ajustados a um modelo exponencial negativo, $M_t = M_0 e^{-kt}$, em que M_0 é a massa inicial e M_t é a massa do folheto no tempo t (Petersen & Cummins, 1974). Uma ANCOVA será aplicada aos dados a fim de identificar diferenças nas taxas de processamento de matéria orgânica (k) entre as diferentes espécies de folhas, usando o tempo de imersão como co-variável.

3.5 Capítulo 2 – Experimento 2

OBJETIVO GERAL: investigar o efeito da entrada de uma planta exótica sobre os processos de decomposição de riachos tropicais.

3.5.1. Área de estudo

A área de estudo compreende os mesmos riachos selecionados para o experimento 1.

3.5.2. Delineamento experimental

A obtenção das folhas seguirá a metodologia já descrita no Tópico 3.2 Obtenção das folhas e análise de composição foliar.

Para a realização deste experimento serão confeccionados *packs* de 10 ± 0.2 g para cada espécie, além de *packs* mistos (espécie nativa + espécie invasora - *Trichilia pallida* X *Psidium guajava*, *Guarea kunthiana* X *Psidium guajava*, *Nectandra cuspidata* X *Psidium guajava*, *Cariniana estrellensis* X *Psidium guajava*, *Endicleria paniculata* X *Psidium guajava* e *Inga* sp. X *Psidium guajava*), confeccionados neste caso com 5 ± 0.2 g de cada espécie. Para a confecção de cada *pack* as folhas serão presas por um fio de algodão, permitindo assim a contabilização do material remanescente após cada retirada (será considerado material remanescente apenas o que estiver preso ao fio de algodão ao final de cada retirada). Após confeccionados, os *packs* serão colocados em *litter bags* de abertura de malha de 10 mm, a fim de permitir a entrada e o desenvolvimento de uma parcela significativa dos organismos aquáticos presentes, tanto microrganismos, quanto macroinvertebrados e macroconsumidores (peixes e camarões).

A instalação do experimento, assim como o recolhimento dos *packs* e confecção da correção de transporte serão realizadas da mesma forma como descrita no Capítulo 1.

3.5.3. Obtenção dos demais organismos aquáticos

A fim de atingir o objetivo proposto para este capítulo serão utilizados *litter bags* de malha 10 mm, uma vez que esta abertura de malha permite a entrada dos principais organismos que podem participar do processo de decomposição (microrganismos, macroinvertebrados e macroconsumidores). Os *packs* serão cuidadosamente retirados do riacho, evitando que peixes e camarões que estejam dentro dos *packs* possam escapar. Em laboratório, as folhas serão cuidadosamente lavadas com água da torneira, sobre peneira granulométrica de malha 250 μ m, para remoção de indivíduos fracamente aderidos. O conteúdo do *pack* será também lavado sobre a peneira, para a retenção dos indivíduos que encontrarem-se dentro do *pack*, e armazenados em álcool 70%. As folhas lavadas serão inspecionadas sob microscópio estereoscópio para remoção de organismos, em especial larvas de *Chironomidae*, que encontram-se no parênquima das folhas, fortemente aderidos à elas. Esses indivíduos serão armazenados em álcool 70%, contados e identificados.

3.5.4. Atividade dos microrganismos e Massa Seca Livre de Cinzas (MSLC)

A obtenção de amostras para as análises de ATP, ergosterol e MSLC será realizada como descrito no Capítulo 1, entretanto neste caso não serão retirados discos foliares para isolamento e cultivo dos microrganismos.

3.5.5. Análises estatísticas

Para avaliar se a atividade dos microrganismos dada pelos valores de ATP e ergosterol é diferente entre os *packs* mistos e individuais e ao longo do tempo será aplicada uma ANCOVA, considerando tempo de imersão como co-variável e a mistura (misto ou individual) como categórica.

A diversidade de espécies das assembléias de macroinvertebrados e macroconsumidores será obtida, separadamente, pelo índice de Shannon-Wiener (Pielou, 1975), que relaciona-se ao grau de incerteza na identidade da espécie numa coleta ao acaso. Assim, quanto maior o valor de H' , maior a incerteza, ou seja, a diversidade. A abundância de cada espécie será determinada através da presença dos indivíduos nos *packs*. O componente riqueza (S) será considerado como o número de espécies na unidade de amostragem definida, no caso os *packs* mistos e individuais. Uma ANOVA será aplicada aos dados de abundância e riqueza, a fim de investigar diferenças entre os *packs* mistos e individuais. Será aplicada uma análise de escalonamento multidimensional não-métrica (NMS – *Nonmetric Multidimensional Scaling*), a fim de investigar se grupos específicos de macroinvertebrados e macroconsumidores se relacionam com determinada espécie de planta.

As taxas de processamento da matéria orgânica foliar serão avaliadas pela determinação, através de regressão linear, das taxas de quebra exponenciais (k), com a massa inicial das folhas fixadas em 100%, contra o tempo (Gimenes *et al.*, 2010). Dados para a massa remanescente de folhas serão ajustados a um modelo exponencial negativo, $M_t = M_0 e^{-kt}$, em que M_0 é a massa inicial e M_t é a massa do folhíço no tempo t (Petersen & Cummins, 1974). Uma ANCOVA será aplicada aos dados a fim de identificar diferenças nas taxas de processamento de matéria orgânica (k) entre os *packs* mistos e individuais, usando o tempo de imersão como co-variável.

4. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS (RESULTADOS ESPERADOS)

Com a proposta apresentada espera-se primeiramente, identificar os microrganismos específicos responsáveis pelo processamento da matéria orgânica e consequente ciclagem de

nutrientes em riachos de cabeceira, e assim contribuir com interpretações e dados mais completos sobre essa etapa considerada tão relevante para ambientes tropicais, e, no entanto, pouco investigada devido às dificuldades metodológicas. A proposta contribuirá com a avaliação do impacto da entrada de espécies exóticas sobre o funcionamento de ecossistemas aquáticos, seus efeitos sobre o processamento de espécies nativas e sobre as demais comunidades aquáticas. Pretende-se, também, contribuir com a compreensão do destino dos detritos de plantas exóticas, ainda pouco elucidado e de fundamental importância frente à atual situação de perturbação que sofrem os riachos de cabeceira, invadidos por espécies muitas vezes recalcitrantes, que retardam ou impedem a sucessão vegetacional, tornando-se, desta forma, fontes principais de aporte de matéria orgânica ao sistema aquático. Caso impactos negativos sejam devidamente identificados e comprovados, a proposta contribuirá com a indicação de ações passíveis de serem aplicadas a riachos para mitigar os impactos aos ecossistemas, através de vídeos educativos e cartilhas.

5. ORÇAMENTO

ITENS	VALORES APROXIMADOS
MATERIAL DE CONSUMO (papel alumínio, álcool, formol, frascos, etiquetas, sacos plásticos, fita adesiva, bandejas, <i>litter bags</i> , etc.)	R\$ 8.700,00
MATERIAL PERMANENTE (freezer, estufa, mufla, balança, lupas, bomba a vácuo, medidores portáteis, etc.)	R\$ 42.600,00
IDAS PARA CAMPO (10 dias – diárias para motorista, combustível, alimentação, etc.)	R\$ 1.800,00
PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS (análises de ATP, ergosterol e Carbono Orgânico Dissolvido)	R\$ 8.900,00
TOTAL	R\$ 62.000,00

Obs. Todos os equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento do projeto já se encontram disponíveis.

6. CRONOGRAMA

ANOS	2015						2016						2017						2018	
<i>Bimestre</i>	1º	2º	3º	4º	5º	6º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	1º	2º
Créditos		X	X	X	X	X														
Levantamento bibliográfico		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Preparação do experimento								X												
Instalação do experimento									X											
Desenvolvimento do experimento									X	X										
Processamento das amostras									X	X	X									
Análises de ATP e ergosterol											X	X								
Identificação dos microrganismos									X	X	X	X								
Análise dos dados													X	X						
Redação do EGQ*														X	X					
Defesa do EGQ*																X				
Redação da Tese																X	X	X		
Defesa da Tese																			X	

*EGQ= Exame Geral de Qualificação

7. PARCERIAS

- Análise de composição foliar: Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM);
- Análises de ATP e ergosterol: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB);
- Análises de nutrientes da água: Laboratório de Limnologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM);

8. REFERÊNCIAS

- ABELHO, M. From litterfall to breakdown in streams: a review. **The Scientific World**, v.1, p.656-680, 2001.

- ABELHO, M. Extraction and quantification of ATP as a measure of microbial biomass. In: GRAÇA, M.A.S., BÄRLOCHER, F. & GESSNER, M. (eds) **Methods to study litter decomposition – a practical guide**. Springer: Dordrecht, p.223–229, 2005.
- BENSTEAD, J. P.; MARCH, J. G.; PRINGLE, C. M.; EWEL, K. C. & SHORT, J. W. Biodiversity and ecosystem function in species-poor communities: community structure and leaf breakdown in a Pacific island stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v.28, n.2, p.454-465, 2009.
- CIONEK, V.M. ; BEAUMORD, A.C. & BENEDITO, E. **Protocolo de Avaliação Rápida do Ambiente para riachos inseridos da região do Arenito Caiuá - Noroeste do Paraná**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá - EDUEM, v. 1, 47p., 2011.
- CLAESON, S.M.; LEROY, C.J.; BARRY, J.R. & KUEHN, K.A. Impacts of invasive riparian knotweed on litter decomposition, aquatic fungi, and macroinvertebrates. **Biological Invasions**, v.16, p.1531–1544, 2014.
- CLAPCOTT, J.E. & BUNN, S.E. Can C4 plants contribute to aquatic food webs of subtropical streams? **Freshwater Biology**, v.48, p.1105–1116, 2003.
- DAS, M.; ROYER, T.V. & LEFF, L.G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.756-767, 2007.
- DOBSON, M.; MAGANA, A.; MATHOOKO, J.M. & NDEGWA, F.D. Detritivores in Kenyan highland streams: more evidence for the paucity of shredders in the tropics? **Freshwater Biology**, v.47, p.909-919, 2002.
- ESTEVES, F.A.; GONÇALVES, J.F.JR. Etapas do Metabolismo Aquático. In: Esteves F.A. (Ed.). **Fundamentos de Limnologia**. 3ª edição. Interciência, Rio de Janeiro, Brasil, p.119-124, 2011.
- FARJALLA, V.F.; MARINHO, C.C.; ESTEVES, F.A. Uptake of oxygen in the initial stages of decomposition of aquatic macrophytes and detritus from terrestrial vegetation in a tropical coastal lagoon. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.11, p.185-193, 1999.
- FERREIRA, V.; GRAÇA, M.A.S.; DE LIMA, J.L.M.P. & GOMES, R. Role of physical fragmentation and invertebrate activity in the breakdown rate of leaves. **Archiv für Hydrobiologie**, v.165, p.493-513, 2006.
- FINDLAY, S. Stream microbial ecology. **Journal of the North American Benthological Society**, v.29, n.1, p.170-181, 2010.

- FREUND, J.G.; THOBABEN, E.; BARKOWSKI, N. & REIJO, C. Rapid in-stream decomposition of leaves of common buckthorn (*Rhamnus cathartica*), an invasive tree species. **Journal of Freshwater Ecology**, v.28, n.3, p.355-363, 2013.
- FRIBERG, N. & JACOBSEN, D. Variation in growth of the detritivore-shredder *Sericostoma personatum* (Trichoptera). **Freshwater Biology**, v.42, p.625-635, 1999.
- GESSNER, M.O. & DOBSON, M. Colonization of fresh and dried leaf litter by lotic macroinvertebrates. **Archiv fur Hydrobiologie**, v.127, p.141-149, 1993.
- GESSNER, M.O. & NEWELL, S.Y. Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. In: HURST, C; CRAWFORD, R; KNUDSEN, C; MCLERNEY, M. & STETZENBACH, L. (eds.), **Manual of Environmental Microbiology**, Second Edition, ASM Press, Washington, DC, p.390-408, 2002.
- GIMENES, K.Z.; CUNHA-SANTINO, M.B. & BIANCHINI JR., I. Decomposição de matéria orgânica alóctone e autóctone em ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v.14, n.4, p.1036-1073, 2010.
- GOING, B.M. & DUDLEY, T.L. Invasive riparian plant litter alters aquatic insect growth. **Biological Invasions**, v.10, p.1041-1051, 2008.
- GONÇALVES JR., J.F.; FRANÇA, J.S.; MEDEIROS, A.O.; ROSA, C.A. & CALISTO, M. Leaf breakdown in a tropical stream. **Internat. Rev. Hydrobiol**, v.91, p.164-177, 2006.
- GONÇALVES, J.F.Jr.; MARTINS, R.T.; OTTONI, B.M.P. & COUCEIRO, S.R.M. Uma visão sobre a decomposição foliar em sistemas aquáticos brasileiros. In: HAMADA, N., NESSIMIAN, J.L. & QUERINO, R.B. (Org.). **Insetos Aquáticos na Amazônia Brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. 1ª ed. Manaus: Editora do INPA, v.1, p.89-116, 2014.
- GRAÇA, M.A.S. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review. **International Revue Hydrobiologie**, v.86, p.383-393, 2001.
- GRAÇA, M.A.S.; CRESSA, C.; GESSNER, M.O.; FEIO, M.J.; CALLIES, K.A. & BARRIOS, C. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**, v.46, p.947-957, 2001.
- GRIFFITHS, N.A.; TANK, J.L.; ROLEY, S.S. & STEPHEN, M.L. Decomposition of maize leaves and grasses in restored agricultural streams. **Freshwater Science**, v.31, n.3, p.848-864, 2012.
- GULIS, V. & SUBERKROPP, K. Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. **Freshwater Biology**, v.48, p.123-134, 2003.

- HIEBER, M. & GESSNER, M.O. Contribution of stream detritívoros, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. **Ecology**, v.83, p.1026-1038, 2002.
- HLADYZ, S.; ABJORNSSON, K; GILLER, P.S. & WOODWARD, G. Impacts of an aggressive riparian invader on community structure and ecosystem functioning in stream food webs. **Journal of Applied Ecology**, v.48, n.2, p.443-452, 2011.
- INGOLD, C.T. Guide to aquatic and water-borne Hyphomycetes (Fungi Imperfecti) with notes on their biology. **Freshwater Biological Association**, Ambleside, 1975.
- KOMINOSKI, J.S.; MARCZAK, L.B. & RICHARDSON, J.S. Riparian forest composition affects stream litter decomposition despite similar microbial and invertebrate communities. **Ecology**, v.92, n.1, p.151-159, 2011.
- LEBERFINGER, K. & BOHMAN, I. Grass, mosses, algae or leaves? Food preference among shredders from open canopy streams. **Aquatic Ecology**, v.44, p.195–203, 2010.
- MARCH, J. G.; PRINGLE, C. M. & TOWNSEND, M. J. Effects of freshwater shrimp assemblages on benthic communities along an altitudinal gradient of a tropical island stream. **Freshwater Biology**, v.47, p.377-390, 2002.
- MARCH, J.G. & PRINGLE, C.M. Food web structure and basal resource utilization along a tropical island stream continuum, Puerto Rico. **Biotropica**, v.35, n.1, p.84-93, 2003.
- MARMANOVÁ, L. Freshwater Hyphomycetes: a survey with remarks on tropical taxa. In: JANARDHANAN, K.K.; RAJENDRAN, C.; NATARAJAN, K. & HAWKSWORTH, D.L. (eds.). **Tropical Mycology**. Science Publishers Inc., EUA, p.169-226, 1997.
- MATHURIAU, C. & CHAUVET, E. Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 21, p. 384–396, 2002.
- MENNINGER, H.L. & PALMER, M.A. Herbs and grasses as an allochthonous resource in open-canopy headwater streams. **Freshwater Biology**, v.52, p.1689–1699, 2007.
- MILANEZ, A.I. Fungos de águas continentais. In: FIDALGO, O. & BONONI, V.L. (coords.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo, p.17-20, 1989.
- MONTEIRO, J.M.; ALLBUQUERQUE, U.P. & ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 2005.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P. & WHEELER, W.W. Germplasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Mycotaxon**, v.48, p.491-528, 1993.

- MULHOLLAND, P.J.; PALUMBO, A.V.; ELWOOD, J.W. & ROSEMOND, A.D. Effects of acidification on leaf decomposition in streams. **Journal of the North American Benthological Society**, v.6, p.147-158, 1987.
- PETERSEN, R.C. & CUMMINS, K.W. Leaf processing in a woodland stream. **Freshwater Biology**, v.4, p.343-368, 1974.
- PIELOU, E.C. **Ecological diversity**. New York: John Wiley & Sons, 165p, 1975.
- REINHART, K.O. & VANDE VOORT, R. Effect of native and exotic leaf litter on macroinvertebrates communities and decomposition in a western Montana stream. **Diversity and Distributions**, v.12, p.776-781, 2006.
- RICHARDSON, J.S.; SHAUGHNESSY, C.R. & HARRISON, P.G. Litter breakdown and invertebrate association with three types of leaves in a temperate rainforest stream. **Archiv fur Hydrobiologie**, v.159, p.309-325, 2004.
- SERRA, M.N.; ALBARINO, R. & VILLANUEVA, V.D. Invasive *Salix fragilis* alters benthic invertebrate communities and litter decomposition in northern Patagonian streams. **Hydrobiologia**, v.701, p.173-188.
- TANK, J.L.; ROSI-MARSHALL, E.J.; GRIFFITHS, N.A.; ENTREKIN, S.A. & STEPHEN, M.L. A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. **Journal of the North American Benthological Society**, v.29, n.1, p.118-146, 2010.
- THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. In: Pompêo, M. L. M. (Org.). **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luis: Editora União, p.147-167, 1999.
- VANNOTE, R. L.; MINSHALL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R. & CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, p.130-137, 1980.
- WEBSTER, J.R. & BENFIELD, E.F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. **Annual Review. Ecological Systematics**, v.17, p.567-594, 1986.
- WANTZEN, K.M.; YULE, C.M.; MATHOOKO, J.M. & PRINGLE, C.M. Organic matter processing in tropical streams. p.44-65. In: DUDGEON, D. (ed.) **Tropical Stream Ecology**. London: Elsevier, 2008. 316p.