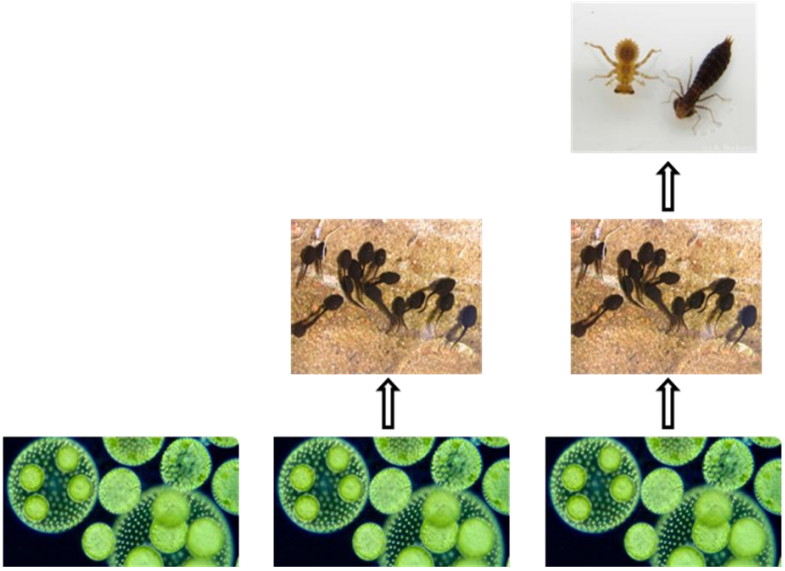
Bianca Gonçalves dos Santos

Efeitos diretos e indiretos de fertilizantes sobre comunidades aquáticas experimentais



Direct and indirect effects of fertilizers on experimental aquatic communities

São Paulo
2013

Bianca Gonçalves dos Santos

Efeitos diretos e indiretos de fertilizantes sobre comunidades aquáticas experimentais

Direct and indirect effects of fertilizers on experimental aquatic communities

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Ecologia.

Orientador: Luis Cesar Schiesari

São Paulo
2013

Ficha catalográfica

Santos, Bianca
Efeitos diretos e indiretos de fertilizantes sobre comunidades aquáticas experimentais

124 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia.

1. Estequiometria ecológica 2. Nitrogênio 3. Fertilizantes 4. Cadeia alimentar 5. Ecologia experimental 6. Cascata trófica.

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Ecologia

Comissão julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof. Dr. Luis Cesar Schiesari
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Luis Schiesari, pela orientação, pelos ensinamentos e por todas as ideias dadas com dedicação e entusiasmo. Também aos professores Evaldo Gaeta Espindola e Paulo Inácio Prado, componentes do meu Comitê de Acompanhamento de Tese, pelas sugestões brilhantes, pela solicitude e pelo acompanhamento cuidadoso em todos os momentos. Ao Evaldo também por nos ceder espaço no CRHEA para realização dos experimentos e ao Paulo Inácio também por abrir espaço em sua agenda para reuniões “extraoficiais” sobre delineamento experimental e análises estatísticas.

A Ester, Edmundo e Melina, meus pais e minha irmã, por aguentarem momentos de stress, por suportarem meu mau-humor quando a exaustão e a frustração tomavam conta e por sempre fazerem de tudo para melhorarem as situações de nervoso e ansiedade pelas quais eu passei ao longo de toda essa jornada. Ao Ricardo, companheiro de todas as horas, por me dar força e nunca me deixar desanimar, diariamente dizendo palavras de incentivo e de confiança de que tudo daria certo e de que todo o esforço valeria a pena.

À Mariana, parceira de Mestrado, pelas ajudas em coleta, pela companhia, pelos desabafos, pelas trocas de informações, pelas mensagens otimistas, pelas risadas e pela torcida constante. À Ana, cuja amizade inestimável a deslocou para o interior às vésperas do Natal para me ajudar na desmontagem do primeiro experimento.

Aos meus queridos familiares, próximos ou distantes, e aos meus amigos de longa data que, mesmo sem entender muito bem o que eu fazia e o intuito do projeto, deram apoio e torceram com todas as forças. Às pessoas com quem dividi casa em

São Carlos, pelo apoio, pelo afeto e pela diversão mesmo durante a cansativa temporada de experimentos.

Aos meus colegas de trabalho, Beatriz, Bruna, Eduardo, Jeanne, Mariana e Ricardo, e à minha chefe, Lígia, do Laboratório Central de Microbiologia da SABESP, pelo apreço e por trabalharem dobrado garantindo, mais do que competentemente, a qualidade do trabalho na minha ausência em função do Mestrado. Ao Jordi e ao Severino, do Laboratório Central de Química Inorgânica da SABESP, por, muito gentilmente, dedicarem metade de um dia de trabalho para me explicar os procedimentos de análise de nutrientes.

Ao Paulo, Antônio Carlos, Daniel e Pedro, pelos auxílios indispensáveis durante as coletas. Aos estudantes do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA), pela ajuda com os experimentos, pela companhia e pelos momentos de distração. Especialmente à Maressa, pela prontidão em ajudar mesmo estando na Espanha e ao Lucas e ao Luiz, pela ajuda com os experimentos e com as coletas no Jataí.

A todos os funcionários e docentes do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CHREA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC – USP São Carlos), especialmente ao técnico de laboratório Marcelo pelas análises de nutrientes e por todas as boas dicas, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP), da Estação Biológica de Boracéia (EBB) e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), por viabilizarem a execução do projeto.

Finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nos seis primeiros meses de Mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante os 12 meses subsequentes (Processo 2010/14767-3) e pelos custeios relacionados ao projeto Jovem Pesquisador do meu orientador Luis Schiesari (Processo 2008/57939-9).

ÍNDICE

RESUMO.....pág. 8

ABSTRACT.....pág. 11

INTRODUÇÃO.....pág. 14

Objetivos.....pág. 23

MATERIAIS E MÉTODOS.....pág. 27

Escolha e origem do sistema biológico.....pág. 28

Considerações gerais sobre a realização dos experimentos.....pág. 29

Coleta de algas e coleta e manutenção de larvas de Anura e ninfas de Odonata.....pág. 33

Determinação das concentrações de nutrientes manipuladas.....pág. 36

Experimento com dois níveis tróficos.....pág. 38

Delineamento experimental.....pág. 38

Montagem, rotina de manutenção e desmontagem do experimento.....pág. 40

Experimento com três níveis tróficos.....pág. 41

Delineamento experimental.....pág. 41

Montagem, rotina de manutenção e desmontagem do experimento.....pág. 43

Variáveis de resposta.....pág. 45

Metodologia de determinação de clorofila a.....pág. 48

Análise de nitrogênio total.....pág. 48

Análise de fósforo total.....pág. 49

Análise estatística.....pág. 49

RESULTADOS.....pág. 51

Nível trófico único (produtores).....pág. 51

Cadeia alimentar com dois níveis tróficos (produtores + consumidores).....pág. 59

Cadeia alimentar com três níveis tróficos (produtores + consumidores + predadores).....pág. 78

DISCUSSÃO.....pág. 88

Efeitos diretos da manipulação de nutrientes sobre produtores.....pág. 88

Efeitos diretos de consumidores sobre produtores.....pág. 91

Efeitos diretos e indiretos da adição de nutrientes sobre consumidores.....pág. 95

Efeitos diretos de predadores sobre consumidores.....pág. 101

Efeitos indiretos de predadores sobre produtores.....pág. 104

Considerações finais e sugestões para estudos futuros.....pág. 104

CONCLUSÕES.....pág. 107

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....pág. 108

RESUMO

A demanda da população humana por alimentos, fibras e biocombustíveis impõe crescimento pronunciado na agricultura intensiva e, com ela, no consumo de fertilizantes. Este manejo de fertilizantes leva a alterações dramáticas nas quantidades e proporções de nutrientes em agroecossistemas que, por sua vez, podem influenciar comunidades biológicas por meio de alterações na biomassa, qualidade nutricional e composição de produtores. Uma tendência no cenário produtivo brasileiro recente é a expansão das culturas de biocombustíveis, notadamente da cana-de-açúcar (etanol) e da soja (biodiesel), sobre ambientes de cerrado. Estas culturas, que juntas cobrem nada menos que 30 milhões de hectares do território brasileiro, demandam padrões contrastantes de fertilização. A cana-de-açúcar exige altas proporções de nitrogênio relativo a fósforo, enquanto que a soja exige altas proporções de fósforo relativo a nitrogênio.

Esta dissertação teve como objetivo testar os efeitos diretos e indiretos que as alterações nas quantidades e proporções de N e P que se seguem à conversão de ambientes nativos para o cultivo de cana-de-açúcar e soja têm sobre comunidades biológicas. Estes objetivos foram testados por meio de dois experimentos em mesocosmos aquáticos manipulando nutrientes, algas, girinos e ninfas de libélulas. O primeiro experimento seguiu um delineamento fatorial completo cruzando três concentrações de N ($N_{referência}$, N_{soja}, N_{cana}) e três concentrações de P ($P_{referência}$, P_{soja}, P_{cana}), e dois níveis tróficos (algas e girinos de *Physalaemus cuvieri*). Níveis de nutrientes manipulados simularam condições medidas em corpos d´água de cerrado, ou padrões de fertilização conhecidos para culturas de cana-de-açúcar e de soja. No segundo experimento pareamos essas concentrações ($N_{referência}$ $P_{referência}$, $N_{soja}P_{soja}$,

N_{cana} P_{cana}) de forma a reduzir a dimensionalidade do experimento e assim permitir a inclusão de um terceiro nível trófico (algas, girinos de *Hypsiboas faber* e ninfas de libélulas). Incluímos ainda um tratamento no qual as ninfas de libélulas estiveram engaioladas para separar os efeitos da predação de girinos, dos efeitos da alteração nos seus atributos. As principais variáveis de resposta em ambos experimentos foram concentração de clorofila *a* como indicadora de biomassa de fitoplâncton, e mortalidade, massa final e estágio de desenvolvimento final de girinos como indicadores de rendimento de consumidores. Uma comparação na concentração de clorofila antes e depois da introdução de girinos procurou testar o efeito da adição de consumidores na biomassa de produtores.

Conforme esperado, NT e PT medidos responderam expressivamente à manipulação de N e P. Nas semanas que antecederam a introdução de girinos, a biomassa algal cresceu em resposta ao aumento na concentração do nitrogênio, mas não do fósforo; esta tendência se manteve ao longo dos experimentos. Isso provavelmente ocorreu porque concentrações medidas de NT variaram da oligotrofia à hipertrofia; por sua vez, concentrações medidas de PT estiveram consistentemente em valores considerados hipertróficos. A introdução de girinos não exerceu efeitos evidentes sobre a concentração de clorofila *a*, possivelmente indicando que o alimento era abundante o suficiente para não ocorrer competição entre consumidores. O rendimento de consumidores foi significativamente influenciado pela manipulação de nutrientes. Tratamentos ricos em P levaram a uma redução no crescimento de *Physalaemus cuvieri*, e uma tendência à redução no seu desenvolvimento e sobrevivência. De forma similar, o cenário de fertilização de soja – portanto rico em P – levou a uma redução significativa na sobrevivência de *H. faber*. Por sua vez, o cenário de fertilização de cana-de-açúcar levou a um ganho de massa de *H. faber* 30% superior ao controle. Formulamos a hipótese que esta diminuição no crescimento e sobrevivência de girinos em cenários de fertilização ricos em P teria sido causada pela proliferação de cianobactérias, frequentemente impalatáveis ou mesmo tóxicas, e

que tendem a ser favorecidas em ambientes de baixa proporção N:P. Ao contrário do que esperávamos, ninfas de libélulas não foram capazes de promover redução direta ou indireta no crescimento ou sobrevivência de girinos, ou influenciar a biomassa de fitoplâncton.

Concluímos que as alterações nos níveis de nutrientes que acompanham a conversão de ambientes nativos para paisagens agrícolas tem efeitos importantes sobre cadeias alimentares aquáticas (controle ‘bottom-up’), e que estes efeitos são muito mais fortes do que aqueles mediados pela presença de predadores (controle ‘top-down’). No entanto, estes efeitos não são necessariamente intuitivos, uma vez que determinados padrões de fertilização influenciam negativamente o rendimento de elos intermediários da cadeia e, portanto, a transmissão da biomassa para níveis tróficos superiores.

ABSTRACT

The human demand for food, fibers and biofuels imposes a pronounced growth in intensive agriculture and, with it, in the consumption of fertilizers. Fertilizer management promotes dramatic changes in the quantities and proportions of nutrients in agroecosystems which, in turn, influence biological communities through changes in the biomass, nutritional quality, and composition of producers.

A recent trend in the Brazilian productive scenario is the expansion of biofuel crops - notably sugarcane (ethanol) and soybean (biodiesel) - over the cerrados. These crops, covering no less than 30 million hectares in the country, demand contrasting fertilization patterns: sugarcane requires high proportions of nitrogen relative to phosphorus, whereas soybean requires high proportions of phosphorus relative to nitrogen.

The objective of this thesis was to test the direct and indirect effects that changes in the quantities and proportions of N and P that follow conversion of native habitats to sugarcane and soybean fields have on biological communities. These objectives were achieved by means of two mesocosm experiments manipulating nutrients, algae, tadpoles and dragonfly naiads. The first experiment followed a full factorial design crossing three concentrations of N ($N_{reference}$, N_{soy}, N_{cane}) and three concentrations of P ($P_{reference}$, P_{soy}, P_{cane}), as well as two trophic levels (algae and *Physalaemus cuvieri* larvae). Nutrient levels simulated conditions measured in water bodies of the cerrado, or patterns of fertilization known for sugarcane or soybean crops. In the second experiment we paired these concentrations ($N_{reference}$ $P_{reference}$, N_{soy} P_{soy}, N_{cane} P_{cane}) so as to reduce dimensionality and as such to permit inclusion of a third trophic level (algae, *Hypsiboas faber* larvae, dragonfly naiads). We included an additional treament

with caged naiads to separate the effects of actual tadpole predation from those of changes in tadpole traits. The main response variables in both experiments were cholophyll *a* concentrations as na indicator of phytoplankton biomass, and tadpole mortality, final mass and final developmental stage as indicators of consumer performance. A comparison in the concentration of chlorophyll *a* before and after the introduction of tadpoles tested the effect of consumers on producer biomass.

As expected, measured TN and TP responded strongly to N and P manipulations. In the weeks preceding the introduction of tadpoles, algal biomass increased in response to the concentration of N, but not to the concentration of P; this trend was maintained throughout the experiment. This probably happened because measured TN varied from oligotrophic to hypertrophic conditions; in contrast, measured TP consistenly corresponded to hypertrophic conditions. Tadpole introduction had no evident effects on chlorophyll concentrations, possibly indicating that food was abundant and competition among tadpoles, if present, was weak.

Consumer performance was significantly influenced by nutrient manipulations. P-rich treatments led to a reduction in growth, and to a reduction trend in development and survivorship, of *Physalaemus cuvieri*. Similarly, the scenario of soybean fertilization – therefore P-rich – led to a significant reduction in *Hypsiboas faber* survivorship. The scenario of sugarcane fertilization led to a 30% increase in mass gain in *Hypsiboas faber*. We hypothesized that this reduction in tadpole growth and survivorship in P-rich environments was caused by a proliferation of unpalatable or even toxic cyanobacteria, which are favored in low N:P ratio environments. Contrary to our expectations, dragonfly naiads did not cause a direct or indirect reduction in tadpole growth or survivorship, nor influence phytoplankton biomass.

We conclude that changes in nutrient levels that accompany the conversion of native habitats to agricultural fields can have strong effects on freshwater food chains (‘bottom-up’ control), and that these effects are much stronger than those mediated by predator presence (‘top-down’ control). However, bottom-up effects are not necessarily

intuitive as certain fertilization patterns negatively influence the performance of intermediate consumers and, as such, the transmission of biomass to higher trophic levels.

INTRODUÇÃO

A provisão de recursos para a manutenção e o crescimento da população humana levou a transformações das superfícies terrestres e a aumentos expressivos na quantidade de nutrientes adicionados aos ecossistemas. A exploração de recursos naturais, o extrativismo, o desenvolvimento de cultivos agrícolas e áreas pastoris, a instalação de indústrias e a urbanização promovem a destruição de habitats naturais e alteram os principais ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas, gerando mudanças climáticas globais e perdas irreversíveis de biodiversidade (Vitousek, 1997a). Isso vem acontecendo especialmente com macronutrientes como nitrogênio, fósforo e carbono, assim denominados por serem quantitativamente importantes para organismos da base das cadeias alimentares (Begon *et al.*, 2006). Nos últimos 30 anos, por exemplo, a taxa de introdução de nitrogênio no ciclo terrestre aproximadamente dobrou (Vitousek, 1997a); foi estimado que o acúmulo de fósforo em ecossistemas terrestres e aquáticos é pelo menos 75% maior do que em períodos pré-industriais (Bennett *et al.*, 2001); e, com relação ao carbono, a concentração de gás carbônico resultante das atividades humanas, já em 1997, representava 30% do montante total desse gás na atmosfera (Vitousek, 1997a).

A agricultura, nesse sentido, atua como importante moduladora das quantidades de nutrientes acrescidos aos sistemas naturais. Isso se dá através das queimadas, da degradação do solo, e, principalmente, das matérias-primas, tais como fertilizantes e produtos para correção do solo, utilizadas para maximizar a eficiência dos plantios ao redor do mundo. A produção global de fertilizantes agrícolas aumentou oito vezes (de 10 para 80 milhões de toneladas) entre os anos de 1950 e 1990, e a massa prevista quase dobrará (para 135 milhões de toneladas) até 2030 (Vitousek *et al.*, 1997b).

Estimativas sugerem que, sob a forma de fertilizantes agrícolas, o aporte mundial de nitrogênio entre os anos de 2007 e 2012 aumentou a uma taxa média de 1,47 vezes por ano, e o de fósforo, 1,70 vezes (FAO, 2008).

Esses materiais utilizados em cultivos não são inteiramente absorvidos pelas plantas nem ficam retidos ao solo, sendo espacialmente distribuídos e contribuindo para a denominada poluição agrícola (FAO, 1998).

Ocorre que existe uma série de limitações que impedem a tomada integral de nutrientes por parte dos vegetais. A absorção de nutrientes pelas plantas varia de acordo com fatores fisiológicos, características dos produtos utilizados, e do solo em que o cultivo é mantido. A taxa de absorção dos nutrientes pelas raízes depende essencialmente da taxa de absorção pelas células corticais, da área superficial da raiz e da concentração do nutriente em solução no solo (Chapin, 1980). A taxa de absorção de um nutriente também depende frequentemente da concentração de outros elementos na solução do solo e na planta, e da demanda da parte aérea (Chapin, 1980). Sendo assim, muito do que é acrescido às plantações não é incorporado pelas plantas. A quantidade total de nitrogênio aplicado na agricultura supera a quantidade nutricional necessária para crescimento das plantas (Smith *et al.*, 1995) e esse excedente é encaminhado para os solos ou entra na atmosfera via volatilização da amônia e produção de óxido nitroso (Nolan *et al.*, 1997; Vitousek *et al.*, 1997b, Carpenter *et al.*, 1998). O aporte de fósforo na forma de fertilizantes e adubos também excede grandemente o liberado na forma de produtos agrícolas, e esse é destinado para o solo (Foy & Whiters, 1995; Carpenter *et al.*, 1998). Esse montante não utilizado de nutrientes no solo geralmente é deslocado do local de aplicação para corpos d'água – córregos e rios – por processos hidrológicos tais como precipitação, lixiviação e escoamento (superficial ou para águas subterrâneas), que se tornam fundamentais na retirada do solo, no transporte e no destino desses produtos (FAO, 1996).

Ao atingir corpos d'água, esses nutrientes são capazes de promover mudanças profundas na cadeia alimentar e na dinâmica da comunidade. O aumento na quantidade de nutrientes tem papel fundamental sobre a biomassa do fitoplâncton, de modo que, quanto maior a concentração de nutrientes, maior a produtividade primária. Dentre as formas de nutrientes mais importantes para o crescimento da biomassa algal, podemos destacar o fosfato, o nitrato, o amônio e o silicato (Esteves, 1998). Esse aumento de biomassa pode ser transferido, via ingestão, para os níveis tróficos superiores (Begon *et al.*, 2006). Os consumidores, organismos que têm os produtores como fonte de recursos, podem ser, dessa forma, controlados pela quantidade de alimento disponível no meio, configurando a visão bottom-up de regulação da cadeia alimentar (White, 1978).

Alguns dos nutrientes mencionados podem favorecer especialmente o crescimento de determinados grupos de algas em detrimento de outros. É o caso, por exemplo, do silicato, que promove um aumento na produtividade primária de diatomáceas, organismos que secretam uma carapaça de sílica (Esteves, 1998). Isso significa dizer que as proporções dos nutrientes disponíveis, e não somente a quantidade absoluta destes, também tem uma grande relevância na determinação da composição e biomassa dos organismos fotoautotróficos.

Quando o fornecimento de nutrientes muda em proporção, ajustes celulares na eficiência de aquisição podem levar à alteração de propriedades como proporções de ribossomos, atividades enzimáticas, regulação de genes, pigmentação celular e composição celular elementar, isto é, a composição total dos elementos nos organismos é alterada por consequência da alteração das proporções de nutrientes no meio (Sterner & Elser, 2002). A estequiometria ecológica, que estuda o balanço de múltiplas substâncias químicas em interações e processos ecológicos, reconhece que, na base da cadeia alimentar, a composição dos elementos dos produtores primários é

afetada pela composição dos nutrientes no meio, sendo estes limitantes ou não (Sterner & Elser, 2002).

Organismos interagindo em uma cadeia alimentar são compostos por diferentes elementos químicos, de modo que o fluxo de energia e nutrientes através das interações consumidor-recurso obedece a restrições fundamentais, por exemplo, de balanço de massa desses elementos (Elser *et al.*, 2000; Sterner & Elser, 2002). Enquanto o montante total de nutrientes influencia a biomassa geral do fitoplâncton, a composição destes, tanto em forma quanto em proporção, influencia a composição da comunidade, em termos de riqueza e diversidade de espécies, de produtores primários.

Altas concentrações de fósforo relativas às de nitrogênio (baixa proporção N:P), por exemplo, levam a um aumento no crescimento de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, de menor palatabilidade (Waringer-Löschenkohl & Schargerl, 2001; Kim *et al.*, 2007; Vrede *et al.*, 2009), e de diatomáceas epifíticas (Kupferberg *et al.*, 1994) em detrimento de uma comunidade dominada por algas verdes. Isso pode implicar a redução no fornecimento de alimentos comestíveis, uma vez que propriedades como composição de lipídios, produção de toxinas (cianotoxinas, em blooms algais), grossura da membrana celular, etc., podem alterar a qualidade do alimento para os consumidores, em alguns casos, transformando alimento “bom” em alimento “ruim” (Granéli *et al.*, 2012; Mitra & Flynn, 2005). O que, por sua vez, pode desencadear um fortalecimento das relações competitivas dos consumidores diretos devido à insuficiência de alimento nas proporções requeridas por estes, que ficam, dessa forma, limitados pelos recursos – regulação bottom-up (Anderson, 2002; Wood & Richardson, 2009). Isso porque os consumidores são mais homeostáticos, ao que se refere à rigidez da composição elementar (DeMott, 2003) e, dessa forma, selecionam os alimentos que ingerem.

No nível dos produtores, os elementos limitantes ao crescimento dos organismos devem ser usados para este fim e transferidos nas cadeias alimentares com o máximo

de eficiência, enquanto os não-limitantes, ou seja, aqueles em excesso, devem ser dispensados e reciclados, retornando ao ciclo biogeoquímico (Hessen, 1992; Sterner & Elser, 2002). Por exemplo, autótrofos têm, de forma geral, maior conteúdo de carbono em relação aos outros elementos (Elser *et al.*, 2000). Os consumidores, herbívoros, por sua vez, quando se alimentam dos autótrofos, requerem os outros nutrientes com alta eficiência (Elser & Urabe, 1999), enquanto muito do carbono não é assimilado e deve ser excretado (DeMott *et al.*, 1998; Darchambeau *et al.*, 2003). Visto que a performance dos herbívoros fica fortemente comprometida por esses sistemas com alta proporção de carbono, um grande conteúdo deste deve entrar no ciclo de detritos (Belgrano *et al.*, 2010). Dessa forma, restrições quanto à qualidade do alimento ingerido, ou seja, quanto às proporções de nutrientes, podem ter impactos relevantes no ciclo dos nutrientes nos ecossistemas.

Alternativamente à regulação bottom-up, esse fluxo de matéria e energia pode também ser controlado pelos predadores (Hairston *et al.*, 1960; Menge & Sutherland, 1976), direta ou indiretamente, o que pode ter consequências para os níveis tróficos mais basais. Para os predadores – controle top-down –, a influência pode ocorrer não só na forma de predação como também sobre o comportamento dos indivíduos passíveis de predação na presença de um predador em potencial. É o caso, por exemplo, de experimentos clássicos com girinos cuja taxa de atividade (para alimentação) e de crescimento fica substancialmente reduzida na presença de uma ninfa de libélula (Relyea & Werner, 1999). Efeitos indiretos desse tipo, por parte do predador, podem ocorrer também sobre as interações competitivas de organismos de um mesmo nível trófico (Relyea, 2002). A plasticidade fenotípica gerada em organismos de uma espécie em resposta à presença de uma segunda espécie pode modificar a influência da primeira espécie sobre a segunda em termos de densidade populacional e aptidão, são os chamados efeitos indiretos mediados pelos caracteres (em inglês, TMIIs), que podem ser ainda mais relevantes na dinâmica populacional das espécies do que sua própria densidade populacional (Werner & Peacor, 2003).

Estudos envolvendo respostas de ocupação espacial deixam claro que esses efeitos indiretos dos predadores através dos produtores podem levar a efeitos positivos e negativos nos recursos (Schmitz, 1998). Uma série de outros estudos sugere ainda que efeitos top-down de cascata trófica são fortemente afetados pela intensidade das respostas comportamentais aos predadores (Power *et al.*, 1985; Carpenter *et al.*, 1987; Persson *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1996; Forrester *et al.*, 1999).

Apesar de parecerem linhas divergentes e contrastantes, os controles bottom-up e top-down configuram, na verdade, forças que coexistem, sendo determinadas pelo enfoque dado ao organismo de interesse e pelos níveis tróficos que o cercam. Segundo o modelo de Fretwell (1977, 1987), o que ocorre é uma colimitação por recursos e predadores, incorporando as dualidades de ambos os controles: forças top-down dominam as dinâmicas tróficas, mas a estrutura da rede alimentar será estabelecida por atributos bottom-up do ecossistema, isto é, pela produtividade primária.

A limitação de nutrientes pode, então, ter desdobramentos consideráveis sobre a comunidade aquática e suas dinâmicas tróficas. Podemos definir nutriente limitante como o primeiro cuja ausência impede o crescimento do organismo autotrófico, que promove uma taxa de crescimento proporcional à de fornecimento e que permite o controle de eutrofização de um corpo d'água pela simples restrição do aporte desse elemento-chave ao ecossistema em questão (Smith, 1998).

Quanto à limitação de nutrientes para o crescimento de organismos da base da cadeia alimentar aquática, o fósforo tem sido frequentemente considerado o nutriente limitante principal (Schindler, 1977; Vollenweider & Kerekes, 1982). Entretanto, vários outros estudos também indicaram que a produtividade primária pode ser limitada pelo nitrogênio ou co-limitada por nitrogênio e fósforo (Elser, Marzolf & Goldman, 1990; Jansson *et al.*, 1996; Vrede *et al.*, 1999). Pesquisas recentes indicaram ainda que o aumento da deposição atmosférica de nitrogênio em ambientes aquáticos pode

resultar em uma mudança de um sistema N-limitado para um sistema P-limitado (Bergström, Blomqvist & Jansson, 2005; Bergström & Jansson, 2006).

A restrição do fornecimento do nutriente limitante da produtividade primária, seja nitrogênio, seja fósforo, em determinados ambientes aquáticos é capaz de promover a redução da eutrofização do mesmo. A eutrofização é o processo natural de enriquecimento, em termos de nutrientes, de corpos d'água. Quando resulta de atividades humanas, é chamada eutrofização cultural, e é o principal problema enfrentado por sistemas aquáticos da atualidade, estando intrinsecamente ligada ao desenvolvimento e utilização de fertilizantes agrícolas (Howarth, 2002; Smith, 2003). Os efeitos potenciais gerais desse fenômeno incluem: aumento da biomassa fitoplanctônica, de perifíton e de macrófitas e consequente aumento da biomassa dos consumidores; mudanças na formação de blooms algais que podem ser tóxicos; redução na diversidade de espécies; redução na transparência da água e problemas de odor, gosto e potabilidade da água e depleção de oxigênio (Smith & Schindler, 2009). Ainda, tem efeito positivo sobre o crescimento de bactérias (Farjalla *et al.*, 2002), aumenta a biodegradação de petroquímicos, hidrocarbonetos aromáticos e pesticidas na água (Graham *et al.*, 2000) e influencia a abundância, composição e virulência de patógenos residentes no sistema (Wilson *et al.*, 1996).

Tais mudanças dramáticas na quantidade e proporções de nutrientes nos ecossistemas – resultantes da manipulação de produtos para agricultura – e, por conseguinte, suas potenciais ramificações biológicas, vêm acontecendo no mundo todo e também no Brasil, que se tornou uma importante potência agrícola nas últimas décadas, especialmente em função do aprimoramento das tecnologias agrícolas e do desenvolvimento de insumos. Nos últimos 30 anos, o crescimento na produção de fertilizantes foi um dos principais responsáveis por um aumento correspondente na produção agrícola nacional, que triplicou (FAO, 2006). Esse crescimento acompanhou o desenvolvimento de tecnologias modernas de produção, muito mais

expressivamente do que a simples expansão da área plantada (FAO, 2006). Nesse período, a produção de 16 culturas aumentou 3,4 vezes; o consumo de fertilizantes, 4,4 vezes; e a área plantada, somente 1,5 vezes (FAO, 2004). Dos 50 milhões de hectares agrícolas cultivados do Brasil, 76,7% é destinado ao cultivo de grãos, entre eles a soja, e 10,2%, para o cultivo de cana-de-açúcar (FAO, 2006). O país é o maior produtor mundial de café, cana-de-açúcar e cítricos, e o segundo maior produtor de soja (FAO, 2006).

Um aspecto importante sobre o perfil temporal de uso de fertilizantes no Brasil é o aumento da proporção de fósforo em relação aos outros dois macronutrientes (nitrogênio e potássio), isso devido à utilização das áreas de cerrado, cujo solo é extremamente deficiente nesse elemento (FAO, 2004).

Mesmo em regiões com alto nível de tecnologia agrícola, percebe-se grandes diferenças entre as taxas de aplicação de fertilizantes minerais nas culturas de exportação, como café, soja e cana-de-açúcar, em relação aos cultivos destinados à alimentação básica, por serem as primeiras mais rentáveis para os agricultores (FAO, 2004).

Os dois últimos cultivos mencionados – cana-de-açúcar e soja – têm sofrido grandes pressões do setor energético no sentido de aumentar a demanda de produção de energias baseadas em biomassa vegetal (etanol e biodiesel, respectivamente) para suprir a carência deixada pela futura depleção dos recursos de combustíveis fósseis. Esse aumento na demanda de produção gerou, por sua vez, uma urgência para conversão de cada vez mais áreas de terra não plantada (de mata nativa e pastagens) em lavouras, provocando, dessa forma, uma expansão da fronteira agrícola (FAO, 2007).

A produção de açúcar e etanol, derivados da cana-de-açúcar inicialmente cultivada em áreas de Mata Atlântica, está em expansão, a uma taxa de crescimento de área cultivada de 1,1 vezes ao ano, de 2001 a 2012 (MAPA, 2013), invadindo áreas de cerrado do interior do estado de São Paulo, sul do Rio Grande do Sul e de Goiás e

Sudoeste de Minas Gerais (Rudorff *et al.*, 2010). A região sudeste é responsável por 80% do etanol destinado à exportação. O estado de São Paulo, especificamente, responde por 88% do volume de cana-de-açúcar, 89% do de álcool e 90% do de açúcar produzido no Brasil (IEL, 2006).

A soja, cuja área plantada cresceu 3,6% no período 1990-1991 a 2000-2001 (dez anos – nas regiões Centro-Oeste e Norte/Nordeste), teve um crescimento de 13,8% no período entre 2000-2001 e 2003-2004 (três anos – em todas as regiões do país) (Brandão *et al.*, 2005). Uma vez que não houve redução da área das culturas competidoras (culturas também iniciadas no verão), acredita-se que essa expansão do plantio de soja tenha se dado através da conversão de pastagens degradadas (Müeller, 2003).

Essas culturas diferem diametralmente nas concentrações relativas de nutrientes aplicados na forma de fertilizantes agrícolas, balanceadas de acordo com as exigências nutricionais de cada espécie. A proporção de nutrientes nos fertilizantes inorgânicos para cana-de-açúcar é, regularmente, de 1N:1P (FAO, 2004) (Figura 1). Em canaviais, a vinhaça, um subproduto da destilação da cana-de-açúcar, também é simultaneamente aplicada por fertirrigação, tendo esta uma proporção de nutrientes de 8N:1P (Prada *et al.*, 1997) (Figura 1). Para a soja, que é uma leguminosa em cujas raízes a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio faz com que seja reduzida a demanda por este nutriente, a proporção é de 1N:14P (FAO, 2004) (Figura 1). Essa diferença entre as proporções de nutrientes adicionadas às culturas é, como anteriormente abordado, transferida para os corpos d'água das regiões que circundam as lavouras desses dois produtos, podendo ter implicações profundas na dinâmica da comunidade e nas interações tróficas entre os organismos ali presentes.

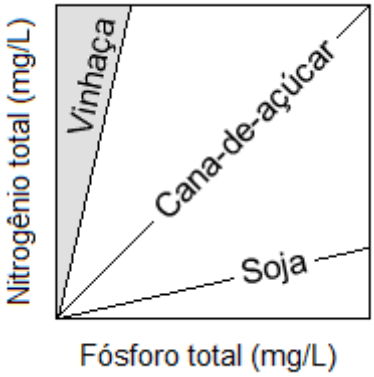


Figura 1. Estequiometria do nitrogênio e fósforo consumido nas duas principais culturas de biocombustíveis no Brasil, cana-de-açúcar (etanol) e soja (biodiesel). Fertilizantes inorgânicos aplicados em soja são ricos em P, uma vez que a soja requer pouco N por estabelecer associação mutualística com bactérias fixadoras de N. Fertilizantes inorgânicos aplicados em cana-de-açúcar são ricos em N e P. Em cana-de-açúcar é importante também a fertirrigação com vinhaça, efluente líquido gerado na destilação do mosto fermentado. A composição química da vinhaça varia substancialmente, mas a razão N:P está compreendida entre 3:3 e 53 (FAO, 2004; Prada *et al.*, 1997; LCS observação pessoal; Grupo AMaggi comunicação pessoal).

OBJETIVOS

Considerando que macronutrientes como o nitrogênio e o fósforo frequentemente limitam a produtividade primária, com implicações para níveis tróficos superiores via transferência de energia, nossos objetivos com o presente estudo foram investigar experimentalmente, em comunidades aquáticas modelo: (I)(a) os efeitos diretos do aumento na quantidade e proporções de nutrientes em produtores primários; (I)(b) os efeitos diretos do aumento na quantidade e proporções de nutrientes em produtores primários na presença de um consumidor; (II)(a) os efeitos indiretos do aumento na quantidade e proporções de nutrientes para o consumidor através dos produtores; (II)(b) os efeitos indiretos do aumento na quantidade e proporções de nutrientes para o consumidor na presença de um predador. As concentrações de nitrogênio e fósforo por nós escolhida simulam condições realistas de conversão e uso da terra por parte da expansão dos cultivos de soja e cana-de-açúcar para suprimento da demanda por biocombustíveis. Incluímos os tratamentos

com predadores a fim de analisar uma possível regulação também por parte dos níveis superiores da cadeia trófica, podendo essa regulação ser exercida de forma direta (predação real) ou indireta (indícios de predação). Assim, poderíamos avaliar quais forças de regulação da cadeia alimentar atuariam com maior ênfase nas nossas comunidades-modelo, se controle bottom-up ou se controle top-down, e sua relação com as manipulações de nutrientes em proporções utilizadas nos fertilizantes das duas maiores culturas brasileiras.

Nossas previsões eram de que um aumento na quantidade de nutrientes levaria a um aumento assintótico na biomassa de produtores, e que este aumento na biomassa de produtores seria transmitido via consumo para um aumento na biomassa de consumidores. Este aumento de biomassa dos consumidores, no entanto, seria modulado pelas proporções estequiométricas distintas de N:P, que favorecem o crescimento de determinados tipos de algas em detrimento de outros, podendo influenciar o valor nutricional e/ou a palatabilidade das algas. Por sua vez, previmos que o ganho de biomassa de consumidores seria dependente do contexto da teia alimentar, ou seja, que seria influenciado pela presença letal (via redução na densidade de consumidores e na taxa de forrageio individual, e, portanto, na redução do consumo e no aumento na disponibilidade *per capita* de alimento) e não-letal de predadores (via redução na taxa de forrageio e de consumo e, portanto, com aumento na disponibilidade *per capita* de alimento).

Por se tratarem de questões ecológicas complexas, os experimentos exigiram a escolha de um sistema-modelo apropriado. Sistemas-modelo biológicos, que se baseiam em sistemas biológicos reais, são caracterizados pela tratabilidade, generalismo e realismo, permitindo melhores delineamentos para experimentos futuros a partir dos resultados obtidos, atuando como poderosas ferramentas de pesquisa (Srivastava *et al.*, 2004). No caso, a comunidade-modelo manipulada é similar a comunidades biológicas de poças temporárias, adequadas para análise de efeitos de

cascata trófica por serem compostas por animais relativamente pequenos e de rápido desenvolvimento (Wellborn *et al.*, 1996), além de serem facilmente manipulados em laboratório.

Para atingirmos nossos objetivos, então, construímos cadeias alimentares aquáticas experimentais com até três níveis tróficos, em que os produtores eram representados por comunidades de algas, os consumidores, por larvas de anfíbios anuros (girinos) e os predadores, quando presentes, por ninfas de libélulas. Estas comunidades experimentais foram, por sua vez, manipuladas na base de seus recursos, isto é, na quantidade e proporção de nutrientes acrescentados aos produtores primários, simulando condições de ambientes não alterados por influência humana e ambientes influenciados por cultivos de matérias-primas para biocombustíveis.

Anfíbios são organismos particularmente úteis para estudo de problemas ambientais, pois apresentam importância trófica, sensibilidade ambiental, tratabilidade para pesquisa e risco de extinção iminente (Hopkins, 2007). Seu tegumento permeável os torna sensíveis a mudanças nas condições hídricas, contaminantes e certas patologias de pele. Perturbações no regime e na qualidade do corpo d'água em que crescem as larvas de anfíbios também podem ter sérias implicações no ciclo de vida dos mesmos, afetando a dinâmica populacional (Dunson *et al.*, 1992). Ainda, a grande conversão de matéria que os anfíbios realizam os torna grandes bioacumuladores de poluentes e contaminantes, comparando-os com outros animais do mesmo nível trófico (Unrine *et al.*, 2007). Muitos anfíbios têm ciclo de vidas complexos, ocupando habitats aquáticos durante o início da vida mas metamorfoseando em formas terrestres, o que caracteriza um outro subsídio de energia e nutrientes para os ambientes terrestres que circundam os corpos d'água (Regester *et al.*, 2006). Adultos e larvas são, geralmente, tão abundantes que a quantidade passível de ser

encontrada e coletada é muito propícia para fins de experimentação, seja para ensaios em mesocosmos, seja para laboratoriais (Hopkins, 2007).

Tendo as larvas de anfíbios configurado modelos de estudo já embasados para sistemas temperados (estudos de Henry M. Wilbur, Scott D. Peacor, Earl Werner, entre outros), existe um prejuízo na representação da diversidade de traços relacionados à suscetibilidade a poluentes químicos da parte de outras espécies (Schiesari *et al.*, 2007). Vimos, então, a necessidade de fazermos uso de organismos-modelo relevantes para o nosso cenário – econômico e ecológico – nos permitindo, assim, uma extrapolação mais segura dos resultados para a nossa realidade (Schiesari *et al.*, 2007).

Estudos utilizando mesocosmos são frequentemente vistos como uma solução intermediária para unir a variabilidade das terras alagadas naturais com a habilidade de manipular variáveis e replicar e randomizar tratamentos em unidades experimentais, isto é, combinando características realistas de estudos em campo com aqueles controlados realizados em laboratório (Boone & Semlitsch, 2009). Escolhidos pelo fato de possibilitarem que os organismos de interesse completem fases críticas de seu ciclo de vida, mesocosmos permitem o controle do ensaio, a evidenciação das variáveis de interesse e o isolamento de outras, a determinação das relações de causa e efeito e o estudo de cadeias alimentares (Wilbur, 1987; Rowe & Dunson, 1994; Drake *et al.*, 1996; Skelly, 2002). Todos esses fatores de forma realista, uma vez que mesocosmos incorporam elementos de sistemas naturais que propiciam, parcial ou integralmente, que se mimetizem processos ocorrendo em grandes poças ou lagos (Schindler, 1998).

MATERIAIS E MÉTODOS

De forma a testar as hipóteses de que as proporções de nutrientes diferenciariam o crescimento de organismos fotossintetizantes e de que essa distinção seria transferida via cadeia alimentar, influenciando o crescimento de consumidores na ausência e na presença direta e indireta de predadores, realizamos dois experimentos complementares manipulando concentrações de macronutrientes na água e a estrutura trófica de comunidades aquáticas experimentais. Em ambos os experimentos, utilizamos o período inicial de crescimento de algas antes da introdução de girinos para analisar as consequências da manipulação de nutrientes sobre o nível trófico dos produtores.

No primeiro experimento, manipulamos separadamente nitrogênio e fósforo simulando as concentrações destes em ambientes sem alteração antrópica, em fertilizantes de soja e de cana-de-açúcar, de modo a permitir o crescimento diferenciado da comunidade fitoplanctônica. Passada a fase inicial de crescimento de algas, acrescentamos girinos a todos os tanques, de modo a abordarmos o efeito da alteração na proporção de nutrientes tanto na comunidade de produtores na presença de consumidores, quanto nos próprios consumidores.

No segundo experimento, mantivemos também tratamentos em que adicionamos um terceiro nível trófico, o dos predadores, nos permitindo estudar o efeito do incremento de nutrientes nos girinos na presença do predador (solto e engaiolado). Uma vez que esse segundo experimento era complementar ao primeiro em função do aumento do número de níveis tróficos, houve exigência por uma simplificação do outro fator manipulado, isto é, do nível de nutrientes, de forma a mantermos um experimento de tamanho manejável. As algas se nutriram, então, de concentrações pareadas de

nitrogênio e fósforo simulando as proporções de ambiente de referência e as usadas em fertilizantes de culturas de soja e de cana-de-açúcar.

ESCOLHA E ORIGEM DO SISTEMA BIOLÓGICO

Iniciamos os experimentos inoculando algas coletadas em lagoas de planícies de inundação de uma região de cerrado no interior do estado de São Paulo. Esses corpos d'água, por constituírem ambientes lênticos durante a maior parte do ciclo hidrológico, apresentam condições propícias para o desenvolvimento de comunidades fitoplanctônicas, perifíticas e de macrófitas aquáticas, o que se reflete nas altas taxas de produtividade primária desses ecossistemas (Bonetto *et al.*, 1984).

Conduzimos os experimentos com girinos provenientes de desovas de anfíbios de duas espécies, *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas faber*, coletadas na Estação Biológica de Boracéia (EBB), considerada comparativamente livre de contaminação e de influências antrópicas, uma vez que se localiza em uma bacia hidrográfica protegida, não podendo ser poluída à montante ou por fontes internas de contaminação (Verdade *et al.*, 2011).

A Estação Biológica de Boracéia (EBB), com área aproximada de 96 ha, foi criada em 1954 e está localizada a 110 km de São Paulo, no município de Salesópolis (23º 37' 59" S e 45º 31' 59" W) (Ferro & Diniz, 2007). Inserida na Reserva Casa Grande do Departamento de Água e Esgotos (DAEE) do estado de São Paulo, na Adutora do Rio Claro (SABESP), foi criada para proteger as bacias dos rios Claro e Guaratuba. Atualmente pertence à Universidade de São Paulo, sendo administrada pelo Museu de Zoologia (MZUSP) (Cavarzere *et al.*, 2010). O clima é tropical úmido,

com precipitação uniforme (média de 2010 mm/ano) e verão quente (média anual de temperatura 17,9ºC) (Custódio Filho, 1989 apud Cavarzere *et al.*, 2010).

Physalaemus cuvieri Fitzinger 1826 é uma espécie de anfíbio de tamanho pequeno, atingindo, em média, quando adulto, 3 cm (Figura 2). Sua coloração é bastante variável; porém, um padrão de cor alaranjado ou avermelhado é sempre presente na região inguinal, posterior à coxa e próximo às axilas (Verdade *et al.*, 2009). Para o acasalamento, os machos vocalizam geralmente em regiões recém-inundadas de corpos d'água. Os ovos são depositados em ninhos flutuantes de espuma, ancorados à vegetação (Haddad & Sazima, 1992). Essas possuem entre 300 e 700 ovos e os girinos levam 72h para sair da espuma e 40-50 dias para metamorfosearem (Barreto & Andrade, 1995). A reprodução ocorre de outubro a março (Heyer, 1990). É uma espécie comum de corpos d'água lênticos e áreas abertas, sendo encontrada, inclusive, em áreas antropizadas (Verdade *et al.*, 2009). A distribuição dessa espécie engloba as regiões sudeste, central, centro-oeste e sudeste do Brasil, Misiones e entre Rios, na Argentina, e o leste do Paraguai (IUCN, 2012).

Figura 2. Exemplar de *Physalaemus cuvieri* (créditos: Daniel Din Betin Negri).

Hypsiboas faber Wied-Neuwied 1821 é o maior anfíbio arborícola da Mata Atlântica, atingindo cerca de 10 cm quando adulto (Figura 3). Apresenta coloração marrom, com uma faixa escura na linha vertebral. Os adultos machos cantam na vegetação situada ao redor de corpos d'água lênticos, ou seja, na borda da mata, ou dentro da água em partes rasas. Eles são territoriais e constroem ninhos no chão, que permanecem isolados do corpo principal da poça. Estas "bacias de barro", que nós chamamos de "panelas", com cerca de 20 cm de diâmetro e paredes elevadas, recebem a desova e são os locais de desenvolvimento dos girinos em seus primeiros dias de vida (Verdade *et al.*, 2009). Cada desova possui cerca de 2500 ovos (Martins & Haddad, 1988) e os girinos levam 65h para abandonar a gelatina e 8 meses para metamorfosearem (Martins, 1993). A reprodução ocorre de setembro a março (Heyer, 1990). A distribuição geográfica dessa espécie se estende pela Argentina, Paraguai e Brasil, nos estados da região sul, sudeste e o sul da região nordeste (IUCN, 2012).

Figura 3. Exemplar de *Hypsiboas faber* (créditos: Daniel Din Betin Negri).

Como anteriormente mencionado, no segundo experimento, acrescentamos também, como integrantes da comunidade aquática experimental, ninfas de Odonata da família Libellulidae, coletadas na Estação Ecológica do Jataí (EEJ), outra região considerada não-contaminada e preservada de alterações antrópicas por constituir

uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral destinada à preservação ambiental, em que são permitidas somente pesquisas e atividades de educação ambiental.

A Estação Ecológica do Jataí (EEJ) compreende uma área de 9074,63 ha protegidos pelo governo do estado de São Paulo, pertencendo à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRH) da Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Está localizada no município de Luiz Antônio, entre 21º30'S e 21º40'S e entre 47º40'W e 47º50'W (Pires *et al.*, 2000). O clima é tropical com verões úmidos e invernos secos, com precipitação anual de cerca de 1400 mm concentrada entre novembro e abril e média de temperatura anual de 22ºC (Cavalheiro *et al.*, 1990).

Libellulidae é uma família pertencente à subordem Anisoptera. Adultos dessa subordem podem ser reconhecidos por apresentarem as bases das asas anteriores e posteriores diferentes, pousando com as asas abertas (Souza *et al.*, 2007). As larvas da subordem Anisoptera possuem corpo robusto e respiram por meio de brânquias traqueais retais, utilizando a entrada e saída de água do ânus também para propulsão do corpo quando da contração do abdômen. As de Libellulidae se caracterizam por possuírem lábio côncavo em forma de concha e por não apresentarem crista dorsal entre as antenas (Souza *et al.*, 2007) (Figura 4). Dotada de grande diversidade de espécies, corroborada recentemente (Anjos-Santos & Costa, 2006; Souza & Costa, 2006; Muzón *et al.*, 2008), Libellulidae possui aproximadamente 50% das espécies de Odonata conhecidas no estado de São Paulo e do Espírito Santo (Dalzochio *et al.*, 2001).

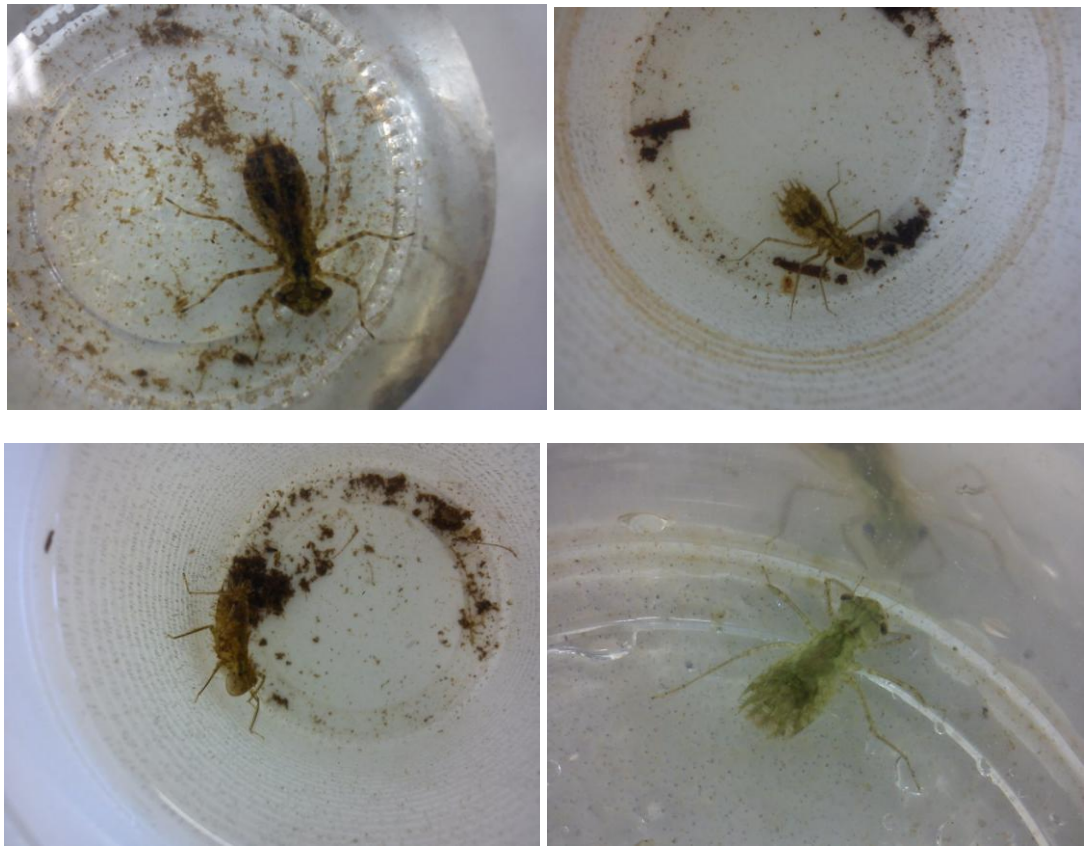


Figura 4. Exemplares coletados de ninfas de Odonata da família Libellulidae, subordem Anisoptera.

Considerações gerais sobre a realização dos experimentos

Realizamos ambos os experimentos no CRHEA, Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), localizado no município de Itirapina (220 km de São Paulo), às margens da Represa do Brôa. A coleta, transporte e manutenção e experimentação de animais neste projeto foram autorizados pelo IBAMA/ICMBio (Processo 17559-1, de 21 de Outubro de 2008) e a manipulação experimental foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (Protocolo 039/2007).

Conduzimos os experimentos em caixas d'água de polietileno de capacidade 500 L, fechadas com tampas de sombrite 70% (malha de aproximadamente 1 mm^2),

para permitir as trocas gasosas e evitar superaquecimento da água pelo sol e a eventual fuga de metamorfos e oviposição de insetos cujas larvas podem ser predadoras de girinos.

Coleta de algas e coleta e manutenção de larvas de Anura e ninfas de Odonata

Para alcançarmos uma grande diversidade de produtores em nossas comunidades aquáticas e assim permitir que diferenças na razão e concentração de nutrientes levassem ao estabelecimento de comunidades bastante divergentes, buscamos inocular algas de vários corpos d'água diferentes. Coletamos, assim, para o primeiro experimento, 20 L de água de cada uma de quatro poças inseridas na Estação Ecológica do Jataí e da Represa do Brôa, totalizando 100 L de água coletada. No segundo experimento, optamos por coletar algas retidas por uma rede de plâncton de 60 µm presentes em 52 L de água de cada uma de três poças inseridas na Estação Ecológica do Jataí e da Represa do Brôa. Dividimos igualmente os volumes obtidos em ambas as coletas entre o número de mesocosmos e fizemos o inóculo da comunidade inicial de produtores.

Com relação às larvas de Anura, coletamos 22 desovas de *Physalaemus cuvieri* (Leiuperidae) (Figura 5) para o primeiro experimento e sete desovas de *Hypsiboas faber* (Hylidae) para o segundo (Figura 6), tendo ambas as coletas sido realizadas na Estação Biológica de Boracéia. Mantivemos essas desovas em laboratório em bandejas de cultivo até elas eclodirem. Alimentamos os girinos até o estágio 25 (Gosner, 1960) com ração macerada para peixe (Tetra Vegie Algae Wafers Extreme) e trocamos a água das bandejas uma vez a cada dois dias. Uma vez que eles atingiram esse estágio, triamos os girinos por tamanho, excluindo os extremos, de forma a incluir no experimento girinos de massas e estágios de desenvolvimento semelhantes e a excluir girinos malformados, moribundos e doentes. Separamos estes girinos

saudáveis e de tamanho similar em copinhos plásticos, de cinco em cinco (Figura 7), até totalizar 7200 girinos de *Physalaemus cuvieri* em 1440 copinhos, para o primeiro experimento, e 4680 girinos de *Hypsiboas faber* em 936 copinhos para o segundo. Estes copinhos com cinco girinos foram aleatoriamente reunidos em grupos de 40 no primeiro experimento (totalizando 200 girinos), e de 26 no segundo (totalizando 130 girinos). Esses grupos formados eram os conjuntos de girinos adicionados a cada um dos mesocosmos.

Figura 5. Desova de espuma de *Physalaemus cuvieri*, aderida à vegetação.

Figura 6. Desova de gelatina de *Hypsiboas faber*, alocada em uma “bacia de barro” à margem da poça.

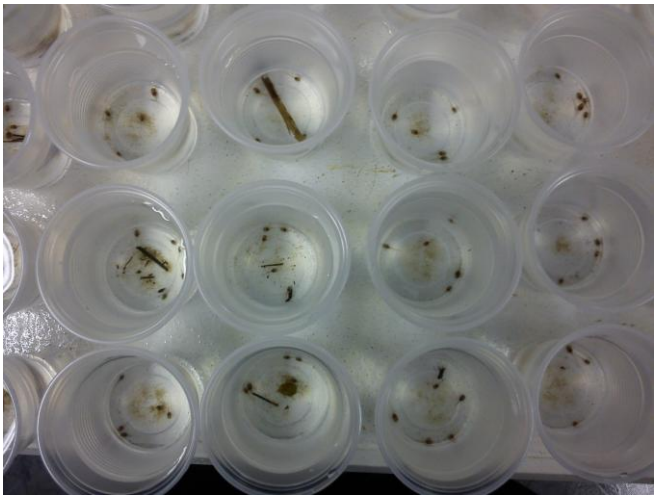


Figura 7. Girinos de *Physalaemus cuvieri*, já em estágio 25 de Gosner, separados de cinco em cinco para randomização e posterior inoculação nos mesocosmos.

Por fim, coletamos as ninfas de Odonata em uma poça permanente da Estação Ecológica do Jataí, com auxílio de uma rede *D*. Optamos por coletar ninfas da família Libellulidae, devido à sua abundância e consequente facilidade de encontrar no corpo d'água. Buscávamos ninfas grandes, sempre tomando a precaução de não coletar indivíduos próximos da metamorfose, estágio em que param de se alimentar (Corbet, 1963). Cada ninfa que coletávamos, colocávamos em pequenos sacos plásticos estreitos e altos, com uma pequena porção de água e boa parte de ar (Carvalho, 2007) (Figura 8). As ninfas não podem ser mantidas juntas, pois são predadoras vorazes e canibalísticas, predando umas as outras se não forem separadas.

Figura 8. Modo de armazenamento e transporte das ninfas de Libellulidae transportadas do local de coleta até o laboratório.

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES MANIPULADAS

Três foram os cenários ambientais que pautaram a determinação das concentrações de nutrientes que manipulamos nos dois experimentos: um cenário de referência refletindo as condições de corpos d'água em um ambiente nativo; um cenário agrícola refletindo as condições de corpos d'água em uma plantação de soja; e um cenário agrícola refletindo as condições de corpos d'água em uma plantação de cana-de-açúcar.

Ambiente de referência: usamos dados médios da concentração de nitrogênio (nitrato+nitrito+amônia) e de fósforo (ortofosfato) de 10 poças permanentes, semipermanentes e temporárias da Estação Ecológica do Jataí em Fevereiro/2011 (Luis Schiesari, observação pessoal). Esses valores ([N] = 0,268 mg/L e [P] = 0,128 mg/L) foram utilizados como pulso inicial de nutrientes em todos os tanques independente do tratamento, e a única adição de nutrientes em tanques das manipulações simulando condições de referência.

Cana-de-açúcar: nos baseamos em relatório do Centro de Tecnologia Canavieira que reportava dados quantitativos de fertilização mineral e fertilização por vinhaça em

30 fazendas da região de Piracicaba na safra de 2007/2008 (CTC, 2008). Com estes dados calculamos a dose total média de NPK aplicada por hectare por ano na forma de fertilizantes inorgânicos e de vinhaça em cana-soca usando para isso a composição química da vinhaça reportada por Prada *et al.* (1997). Esta fertilização apresentava proporção estequiométrica próxima de 12N:1P. A dose anual média de NPK, em mg/ha, foi dividida pela área da base do tanque (para estimar mg NPK/tanque); posteriormente dividida pelo volume que pretendíamos atingir por tanque (400 L) (para estimar mg/L) e, por último, para uma duração considerada da safra de 8 meses (240 dias), para finalmente chegarmos à carga final diária de nutrientes a ser adicionada: [N] = 0,163 mg/L e [P] = 0,013 mg/L (assumindo uma dissolução linear do fertilizante aplicado ao longo do tempo).

Soja: utilizamos dados reais de massas de fertilizantes aplicados no talhão 168 do Rancho Mutum da Fazenda Tanguro, de cultivo de soja, localizada no estado do Mato Grosso (proporção estequiométrica próxima a 1N:14P) (Luis Schiesari, observação pessoal). A massa de fertilizante aplicada por talhão é homogênea e, portanto, os valores para o talhão 168 são representativos para a Fazenda como um todo. A aplicação é única, no momento da semeadura, e a safra dura 4 meses (120 dias). Como fizemos para cana, a dose anual média de NPK, em mg/ha, foi corrigida para a área basal do tanque, posteriormente dividida pelo volume que pretendíamos atingir (400 L) e, por último, pela duração considerada da safra, para finalmente chegarmos à carga final diária de nutrientes a ser adicionada: [N] = 0,011 mg/L e [P] = 0,157 mg/L (assumindo uma dissolução linear do fertilizante aplicado ao longo do tempo).

Para obtermos um delineamento experimental fatorial completo simétrico e para explorarmos melhor a questão da estequiometria dos nutrientes, aproximamos os valores de modo a chegarmos às concentrações diárias finais de nutrientes a serem adicionados que constam na Tabela 1. Note que assim tornamos simétrica a adição de

nutrientes: 14N:1P em cenário de cana-de-açúcar e 1N:14P em cenário de soja, bastante próximos da estequiometria de nutrientes aplicada em campo.

Manipulamos nitrogênio, fósforo e potássio por meio dos sais nitrato de amônio (NH_3NO_3), di-hidrogeno-fosfato de potássio (KH_2PO_4) e cloreto de potássio (KCl), respectivamente. Como o experimento pretendia avaliar a consequência da manipulação de nitrogênio e de fósforo apenas, mas sendo potássio também macronutriente importante, nivelamos as concentrações de potássio para todos os tratamentos em condições não-limitantes e igual à maior concentração de potássio adicionada junto com o fósforo por meio do di-hidrogeno-fosfato de potássio (KH_2PO_4).

Tabela 1. Valores de concentrações diárias de nutrientes adicionados em cenários diversos. Note que estas concentrações diárias são adicionais ao pulso de nutrientes caracterizando condições de referência. Portanto, o cenário de referência caracteriza-se pela adição de 0 mg/L de N e P ao longo do experimento.

AMBIENTE	[N] (mg/L)	[P] (mg/L)	[K] determinada por KH_2PO_4
Referência	0	0	0,17
Cana	0,14	0,01	0,17
Soja	0,01	0,14	0,17

EXPERIMENTO COM DOIS NÍVEIS TRÓFICOS

Delineamento experimental

O desenho determinado para este experimento foi de um delineamento fatorial completo cruzando 3 concentrações de nitrogênio (N em ambiente de referência; N em plantação de cana; N em plantação de soja) com 3 concentrações de fósforo (P em ambiente de referência; P em plantação de cana; P em plantação de soja) (Tabela 2).

Cada um dos nove tratamentos foi replicado quatro vezes, quantidade considerada suficiente para detectar diferenças significativas no comportamento,

morfologia, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos estudados (Boone & James, 2005). A comunidade aquática era composta, em todos os tanques, por dois níveis tróficos: algas e girinos. As 36 unidades experimentais foram aleatorizadas entre os tratamentos (Figuras 9 e 10).

Tabela 2. Valores de concentrações diárias de nutrientes e a estequiometria destes em cenários diversos.

TRATAMENTO	TIPO estequiometria	[N] (mg/L)	[P] (mg/L)	[K] determinada por KH_2PO_4
Todos	pulso inicial	0,26	0,13	0,16
$N_{referência}$:$P_{referência}$	adição 00:00:17	0	0	0,17
$N_{referência}$:P_{cana}	adição 00:01:17	0	0,01	0,17
$N_{referência}$:P_{soja}	adição 00:14:17	0	0,14	0,17
N_{soja}:$P_{referência}$	adição 01:00:17	0,01	0	0,17
N_{soja}:P_{cana}	adição 01:01:17	0,01	0,01	0,17
N_{soja}:P_{soja}	adição 01:14:17	0,01	0,14	0,17
N_{cana}:$P_{referência}$	adição 14:00:17	0,14	0	0,17
N_{cana}:P_{cana}	adição 14:01:17	0,14	0,01	0,17
N_{cana}:P_{soja}	adição 14:14:17	0,14	0,14	0,17

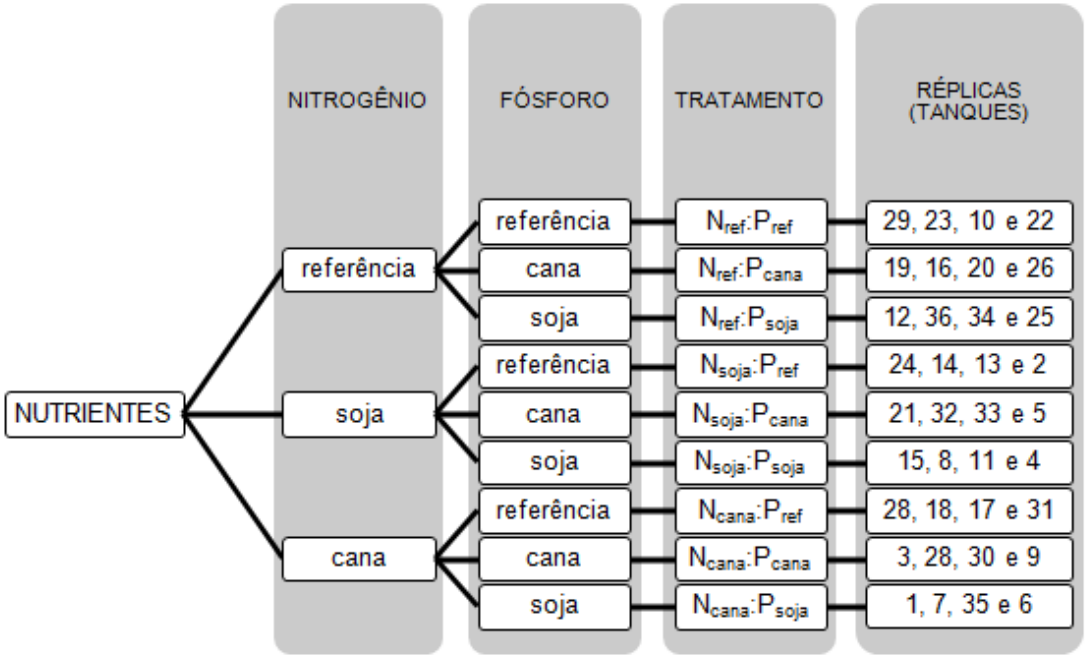


Figura 9. Esquematização do desenho experimental abordando níveis cruzados de manipulação de nitrogênio e de fósforo e a replicação e aleatorização das unidades experimentais.

Figura 10. Caixas d'água constituindo os mesocosmos de estudo, dispostas em um desenho quadrado de seis linhas por seis colunas, totalizando 36 unidades experimentais.

Montagem, rotina de manutenção e desmontagem do experimento

O experimento foi conduzido de 2 de novembro a 14 de dezembro de 2011.

Em uma primeira fase, lavamos as caixas d'água com HCl 10%, esfregamos com fibra de limpeza e os enxaguamos abundantemente. No dia seguinte, que consideramos ser o primeiro dia do experimento, 2 de novembro, enchemos cada um deles com 400 L de água, inoculamos algas e um pulso inicial de nutrientes. A partir de então, duas vezes por semana até o fim do experimento, inoculamos nutrientes nos tratamentos como descrito acima (Tabela 2). Semanalmente medimos parâmetros físico-químicos da água e coletamos alíquotas para posterior medição de nutrientes e clorofila *a*.

Em 23 de novembro, passadas três semanas da inoculação de algas, colocamos 200 girinos em cada um dos tanques (Figura 11).

Figura 11. Girinos de *Physalaemus cuvieri* em bandejas de cultivo e separados em número de 200 para inoculação nos mesocosmos.

Acompanhamos visualmente o crescimento e o desenvolvimento dos girinos, de modo que, quando percebemos que uma grande quantidade deles já estava com as patas traseiras formadas, decidimos encerrar o experimento, receosos de que os girinos viessem a metamorfosear.

Em 14 de dezembro, então, seis semanas do início do experimento, o desmontamos, retiramos os girinos com auxílio de uma rede de aquário e os preservamos em formol 8%. Esvaziamos os tanques e os lavamos novamente com ácido, como na montagem, para garantir que não haveria nutrientes aderidos ao material dos tanques, não influenciando o experimento que viria a seguir.

EXPERIMENTO COM TRÊS NÍVEIS TRÓFICOS

Delineamento experimental

O desenho determinado para esse experimento foi um delineamento fatorial completo cruzando 3 cenários de fertilização com 3 estruturas de comunidade aquática. Note que neste experimento o foco não foi desmembrar o papel relativo do nitrogênio e fósforo, como no primeiro, mas sim simular cenários realistas de fertilização em soja e cana-de-açúcar. Por este motivo manipulamos concentrações casadas de N e P (N e P em ambiente de referência; N e P em plantação de cana-de-

açúcar; N e P em plantação de soja; conforme Tabela 3). Por sua vez, os três tipos de comunidade aquática foram: produtores + consumidores; produtores + consumidores + predadores soltos; e produtores + consumidores + predadores engaiolados.

Como no experimento anterior, cada tratamento foi replicado quatro vezes. As 36 unidades experimentais foram aleatorizadas entre os tratamentos (Figura 12).

Tabela 3. Valores de concentrações diárias de nutrientes e a estequiometria destes em cenários diversos e nas três diferentes estruturas de comunidade aquática.

TRATAMENTO	**TIPO estequiometria**	**[N] (mg/L)**	**[P] (mg/L)**	**[K] determinada por KH_2PO_4**
Todos	pulso inicial	0,26	0,13	0,16
$N_{referência}$:$P_{referência}$ Girinos Predador solto Predador engaiolado	adição 00:00:17	0	0	0,17
N_{soja}:P_{soja} Girinos Predador solto Predador engaiolado	adição 01:14:17	0,01	0,14	0,17
N_{cana}:P_{cana} Girinos Predador solto Predador engaiolado	adição 14:01:17	0,14	0,01	0,17

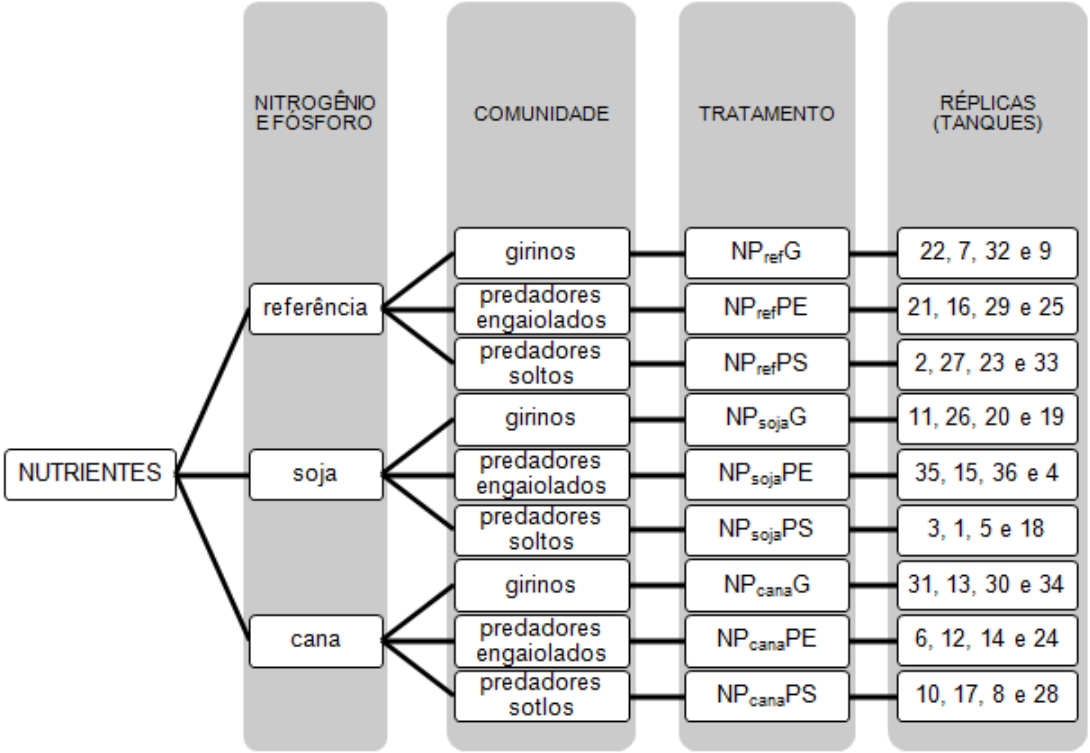


Figura 12. Esquematização do desenho experimental abordando níveis de manipulação pareada de nitrogênio e fósforo com níveis de estrutura trófica e a replicação e aleatorização das unidades experimentais.

Montagem, rotina de manutenção e desmontagem do experimento

O experimento foi conduzido de 19 de janeiro a 16 de março de 2012.

Em uma primeira fase, lavamos as caixas d'água com HCl 10%, esfregamos com fibra de limpeza e os enxaguamos abundantemente. No dia seguinte, que consideramos ser o primeiro dia do experimento, 19 de janeiro, enchemos cada um deles com 400 L de água, inoculamos algas e um pulso inicial de nutrientes. A partir de então, uma vez por semana até o fim do experimento, inoculamos nutrientes nos tratamentos como descrito acima (Tabela 3). Semanalmente medimos parâmetros físico-químicos da água e coletamos alíquotas para posterior medição de nutrientes e clorofila *a*.

Em 16 de fevereiro, passadas quatro semanas da inoculação de algas, colocamos 130 girinos em cada um dos tanques (Figura 13).

Figura 13. Girinos de *Hypsiboas faber* mantidos em bandejas de cultivo.

Nos tratamentos em que os predadores estariam soltos, colocamos, nesse mesmo momento do experimento, três larvas de libélula dentro dos tanques. Naqueles em que os predadores estariam engaiolados, colocamos três larvas de libélula dentro de três gaiolinhas individuais. Construímos essas gaiolinhas com mangueira de piscina (7 cm de diâmetro) cobertas, nas extremidades, por tela-mosquiteiro (malha de aproximadamente 1 mm^2) (Figura 14).

Por três vezes na semana, alimentávamos cada uma das ninfas de Odonata engaioladas com aproximadamente 200 mg de girinos (sete indivíduos) anotando as quantidades predada e não-predada do episódio anterior de alimentação (Figura 14). Experiências prévias mostram que o volume de água, a quantidade de gaiolas com predador por mesocosmos e a massa de girinos usados para alimentar as ninfas de Odonata são capazes de gerar alteração comportamental nos girinos, influenciando sua atividade de forreageamento pela percepção da pista química (Peacor *et al.*, 2007).

Figura 14. Ninfa de Libellulidae engaiolada se alimentando de um girino de *Hypsiboas faber*. No momento, os outros girinos que haviam sido dados de alimento em um episódio anterior de alimentação já haviam sido predados.

Da mesma forma que para o primeiro experimento, acompanhamos o crescimento e o desenvolvimento dos girinos. Entretanto, vimos a necessidade de encerramento do segundo experimento quando da escassez de girinos para alimentar as ninfas sem expectativas da realização de uma nova coleta.

Em 16 de março, então, oito semanas do início do experimento, o desmontamos, retiramos os girinos com auxílio de uma rede de aquário, os pesamos e os preservamos em formol 8%. Retiramos também as ninfas de Odonata, as preservando em álcool 70%. Repetimos o procedimento de lavagem para não favorecer a impregnação dos nutrientes manipulados nas paredes das caixas d'água, mesmo estando em final de temporada de experimentos.

VARIÁVEIS DE RESPOSTA

Monitoramos semanalmente a qualidade da água de cada tanque pela medição dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura. Para isso, fizemos uso de uma sonda multiparâmetros Horiba,

acomodada sempre no fundo dos tanques, na região central da base destes (Figura 15).

Figura 15. Momento da medição de parâmetros físico-químicos pelo uso de uma sonda multiparâmetros Horiba.

Também semanalmente, retiramos alíquotas de 75 mL de água de cada tanque, a uma profundidade aproximada de 15 cm, através de 15 pipetadas de 5 mL distribuídas uniformemente pela área do tanque. Para reduzir custos, espaço para armazenamento e tempo para as análises, juntamos as amostras das quatro réplicas de cada tratamento em uma única amostra composta, de forma que, a cada semana, retirávamos um total de nove amostras do experimento (Figura 16). Cada uma dessas nove amostras continha, assim, 300 mL (4 tanques x 75 mL). Destes, 100 mL eram congelados para posterior análise de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) e 200 mL eram filtrados, em duplicata, em filtros de microfibra de vidro de retenção nominal 0,8 – 8,0 µm, os quais também eram congelados para posterior leitura de absorbância nos comprimentos de onda (665 e 750 nm) em espectrofotômetro para posterior estimativa de clorofila *a* (Figura 17).

Figura 16. Amostras compostas de cada um dos nove tratamentos, destinadas à análise de determinação de clorofila a, nitrogênio total e fósforo total.

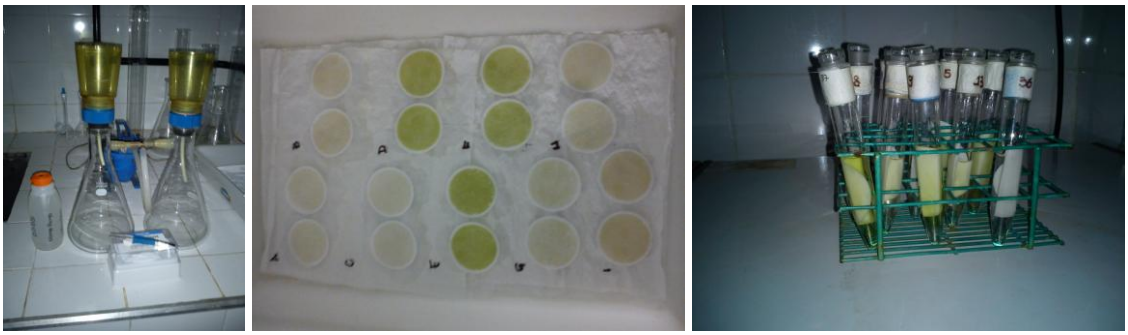


Figura 17. Procedimento de filtragem de amostras compostas dos tratamentos, filtros resultantes desse dessa etapa e fase de extração da clorofila dos filtros para a solução de etanol.

Ao final de cada um dos experimentos, contabilizamos a quantidade final de girinos sobreviventes e calculamos a média, por tratamento, da massa final e da mortalidade destes. Determinamos, também, o estágio de desenvolvimento que os girinos alcançaram ao fim de cada experimento, seguindo o protocolo de Gosner (1960). Quantificamos a taxa de predação e a mortalidade das ninfas de Odonata nas gaiolas.

METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA *A*

Para determinação da concentração de clorofila *a* seguimos o protocolo de Nusch (1980). O princípio dessa análise é solubilizar a clorofila em etanol, de modo que fique disponível, uma vez em solução, para absorver luz a determinados comprimentos de onda.

Para cada um dos filtros resultantes da filtragem das amostras compostas, preparamos tubos de ensaio com solução de etanol 80%, na qual os encaixamos, os aquecemos a 75ºC e os esfriamos a água gelada logo em seguida, seguindo o método do choque-térmico. Entre 12 e 18 horas depois, os tendo mantido em geladeira, procedíamos à leitura de absorbância nos comprimentos de onda 665 e 750 nm em espectrofotômetro UV (Hach, DR/2000).

ANÁLISE DE NITROGÊNIO TOTAL

A determinação de nitrogênio total foi feita com base no método semi-micro Kjeldahl, do Standard Methods (American Public Health Association; American Water Works Association & Water Environment Federation, 2005). Resumidamente, quantificamos o nitrogênio total das amostras (tanto amoniacal quanto albuminóide) através de processos sequenciais de digestão por sulfato de potássio (K_2SO_4) e destilação. O material destilado é o que é destinado à leitura, feita por método colorimétrico, isto é, através da metodologia de titulação e avaliação visual do ponto de viragem.

ANÁLISE DE FÓSFORO TOTAL

A determinação do fósforo total foi feita com base no método da digestão por persulfato, do Standard Methods (American Public Health Association; American Water Works Association & Water Environment Federation, 2005). Em suma, realizamos uma hidrólise com ácido sulfúrico e uma digestão com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) da amostra para que o fósforo hidrolisável e o orgânico fossem convertidos em ortofosfato. Em seguida, autoclavamos as amostras e ajustamos o pH das mesmas para leitura automática e computadorizada em espectrofotômetro (Hach, DR/2000).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conduzimos análises de variância (ANOVA) de dois fatores, analisando também a interação entre eles, para as variáveis que permitiam esse tipo de análise, ou seja, que tinham dados individuais para cada unidade experimental: condutividade e mortalidade, massa e estágio de desenvolvimento de girinos. No caso do primeiro experimento, os fatores eram 'nitrogênio manipulado' e 'fósforo manipulado' (interação 'nitrogênio * fósforo') e do segundo, 'nutrientes' e 'estrutura de comunidades' (interação 'nutrientes * comunidades'). Transformamos os dados de mortalidade em logitos, como uma forma de linearizá-los, nos permitindo uma melhor análise dos mesmos.

Antes de procedermos às análises, checamos os dados quanto à normalidade da distribuição e à homogeneidade de variâncias dos resíduos do modelo linear geral ('general linear model'), de modo a satisfazermos às premissas destas análises.

Quando da investigação do efeito dos consumidores sobre os produtores, conduzimos também análises de variância de medidas repetidas ('repeated measures ANOVA') para as variáveis medidas periodicamente: condutividade, nutrientes totais e

clorofila *a*. A partir destas, verificávamos a mudança significativa nas concentrações medidas ao longo do tempo, e os níveis comparados eram a passagem do tempo de uma medição para a medição seguinte. No caso dessa análise, fizemos uso do fator de correção de F de Greenhouse-Geisser (que chamamos de F_{GG} na seção 'Resultados') uma vez que não verificamos esfericidade (ε, análogo à homogeneidade de variâncias para ANOVA) em nenhum dos conjuntos de dados e que $\varepsilon < 0,75$ em todos os casos (Girden, 1992).

Para todos os valores de *p* significativos, conduzimos testes post-hoc para analisar mais profundamente as diferenças entre os pares de tratamentos considerados distintos pela análise estatística. Estes foram: Sidak, Scheffe e LSD, que são testes de comparações múltiplas que não realizam ajustes para esse tipo procedimento. Dessa forma, são mais conservadores no que se trata do erro tipo II, que consiste em aceitarmos a hipótese nula quanto esta é "falsa" (Field, 2000).

Todas as análises estatísticas foram feitas com nível de significância de 5%, por meio do software estatístico SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) e os gráficos, pelo uso do software gráfico SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA).

RESULTADOS

NÍVEL TRÓFICO ÚNICO (PRODUTORES)

Nesta seção analisaremos os resultados obtidos nas semanas que antecederam a introdução nos mesocosmos dos girinos e das ninfas de libélulas, nos tratamentos em que foram manipuladas, de forma a testar o efeito direto da manipulação de nutrientes na biomassa de fitoplâncton. Sendo assim, não há, nesta seção, quaisquer diferenças entre os tratamentos de teia alimentar em ambos os experimentos. Esse período para estabelecimento da comunidade algal durou três semanas para o primeiro experimento e quatro semanas para o segundo.

Como era esperado, a condutividade aumentou significativamente em função da adição de nutrientes em ambos os experimentos, refletindo o aumento da concentração de íons livres na água (Figura 18 e 19; Tabelas 4 e 5).

No primeiro experimento, os tratamentos de manipulação de nitrogênio ($F_{2,31}$ = 94,70; p < 0,001) e fósforo ($F_{2,31}$ = 8,59; p = 0,001), separadamente, foram responsáveis pelo incremento na condutividade da água, não havendo, contudo, resposta à interação entre os nutrientes manipulados ($F_{4,31}$ = 1,58; p = 0,208) (Figura 18; Tabela 4). Os testes post-hoc indicaram diferenças significativas entre todos os pares de tratamentos comparados: referência e soja, referência e cana-de-açúcar, e soja e cana-de-açúcar, tanto para nitrogênio quanto para fósforo.

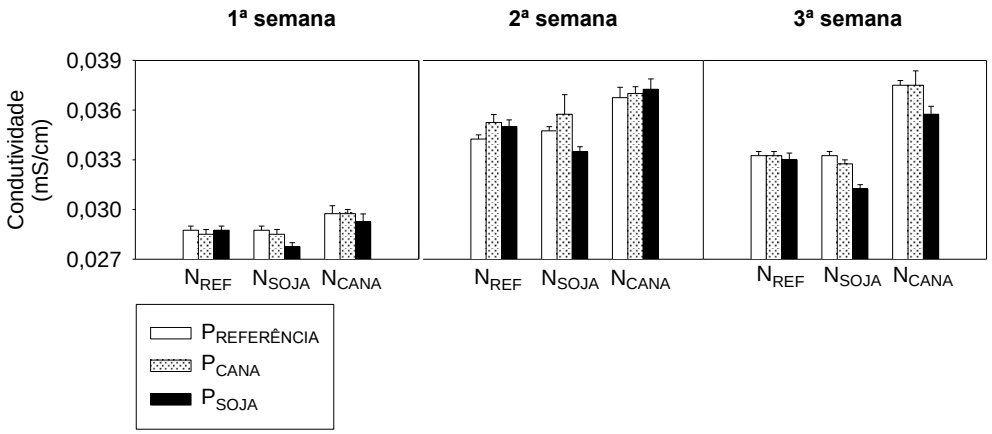


Figura 18. Variação na condutividade em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), anteriormente à introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto das barras dentro de cada conjunto (referência → cana → soja) reflete o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

Tabela 4. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nitrogênio, de fósforo e da interação entre estes na condutividade medida ao final do período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1, isto é, na terceira semana.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NITROGÊNIO	2	94,70	< 0,001
FÓSFORO	2	8,59	0,001
NITROGÊNIO * FÓSFORO	4	1,58	0,208
Erro	31		

Também no segundo experimento a manipulação de nutrientes teve efeito significativo sobre a condutividade ($F_{2,33}$ = 38,29; p < 0,001) (Figura 19; Tabela 5). Os testes post-hoc detectaram diferenças significativas para todos os pares de tratamentos comparados entre si: referência e soja, referência e cana-de-açúcar, soja e cana-de-açúcar.

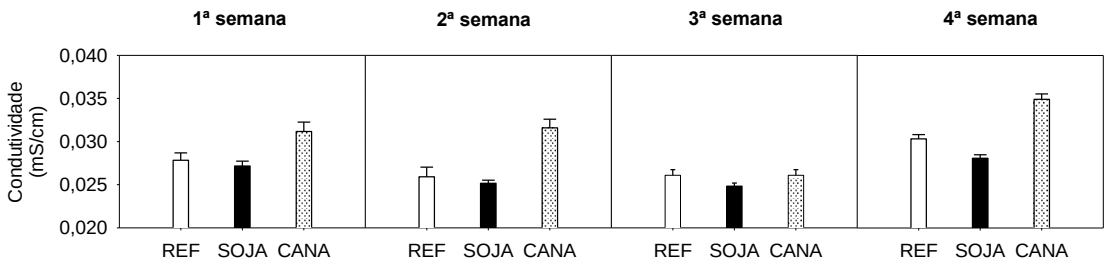


Figura 19. Variação na condutividade em função das manipulações da estrutura de comunidade e de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), anteriormente à introdução dos girinos e das ninfas de libélulas nos mesocosmos do Experimento 2. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) reflete o aumento geral da concentração de nitrogênio.

Tabela 5. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação de nutrientes na condutividade medida ao final do período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 2, isto é, na terceira semana.

Fatores manipulados	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
NUTRIENTES	2	38,29	< 0,001
Erro	33		

As análises de regressão mostraram que, ao final da segunda semana, o nitrogênio total e o fósforo total medidos corresponderam às manipulações exercidas no primeiro experimento, mas apenas fracamente para o fósforo ($y = 0,17x + 0,36$; $R^2 = 0,241$, $p = 0,001$ para nitrogênio total; $y = 0,33x + 0,97$; $R^2 = 0,242$, $p = 0,285$ para fósforo total) (Figuras 20 e 21).

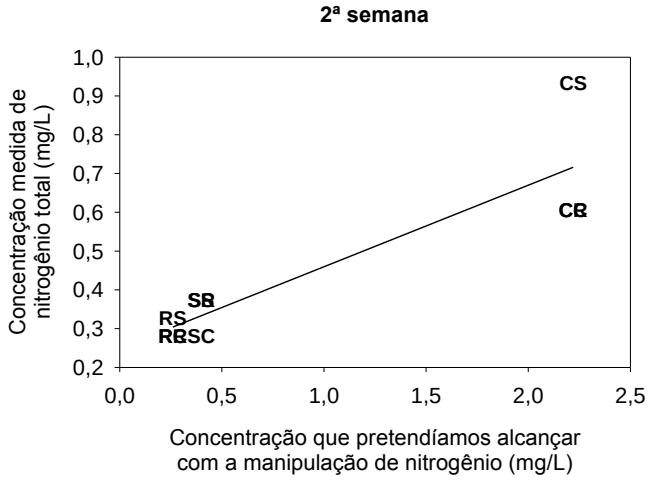


Figura 20. Correlação entre concentrações manipuladas de nitrogênio e concentrações medidas de nitrogênio total nos mesocosmos do Experimento 1 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos, isto é, na segunda semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

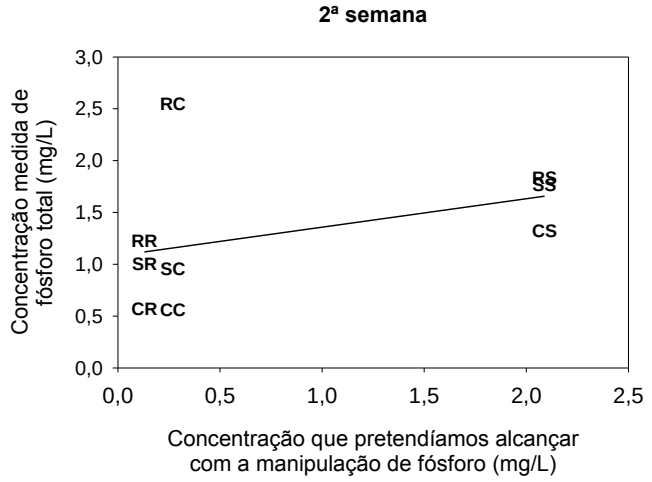


Figura 21. Correlação entre concentrações manipuladas de fósforo e concentrações medidas de fósforo total nos mesocosmos do Experimento 1 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos, isto é, na segunda semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

Outra forma de visualizar as relações entre concentrações manipuladas e concentrações medidas de nitrogênio e fósforo nas semanas que antecederam a adição dos girinos no Experimento 1 é apresentada na Figura 22. Note que, de maneira geral, as mais altas concentrações medidas de nitrogênio seguem

manipulações de fertilizantes de cana-de-açúcar (N_{CANA}) e as mais altas concentrações de fósforo seguem as de fertilizantes de soja (P_{SOJA}), como esperávamos, mas estes padrões são acompanhados de grande variação.

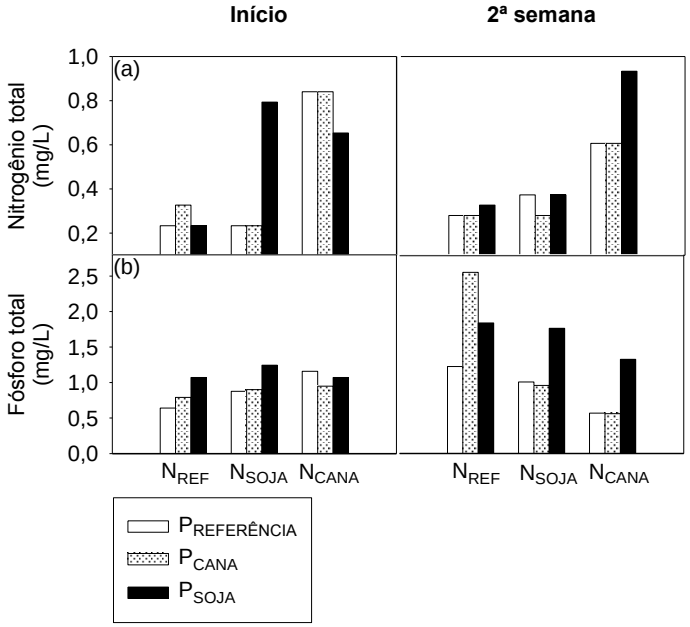


Figura 22. Variação nos parâmetros (a) nitrogênio total e (b) fósforo total em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), durante o período que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1. Barras representam valores de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência apresentada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto das barras dentro de cada conjunto (referência → cana → soja) reflete o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

Ao final do período pré-introdução de girinos e ninfas de libélulas no segundo experimento, isto é, na segunda semana, a concentração medida de nitrogênio total respondeu mais fracamente à concentração manipulada de nitrogênio ($y = 0,12x + 0,47$; $R^2 = 0,163$, $p = 0,126$) do que concentração de fósforo total à manipulação de fósforo ($y = 0,59x + 0,14$; $R^2 = 0,799$, $p < 0,001$), do contrário que aconteceu no primeiro experimento (Figuras 23 e 24).

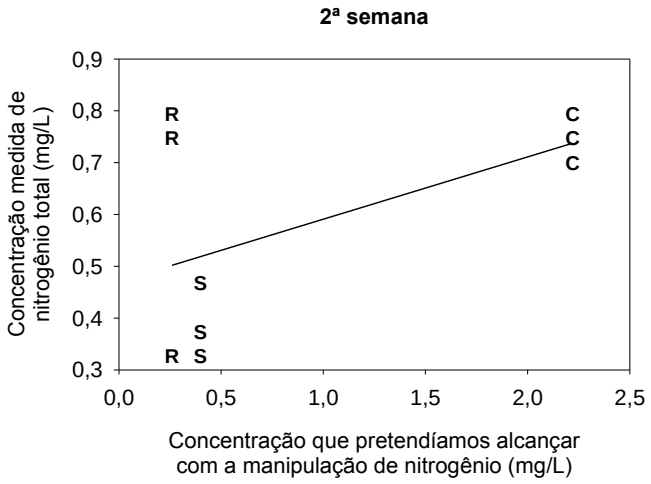


Figura 23. Correlação entre concentrações manipuladas de nitrogênio e concentrações medidas de nitrogênio total nos mesocosmos do Experimento 2 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos e das ninfas de libélulas, quando presentes, isto é, na segunda semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; S = NP_{soja}; C = NP_{cana}.

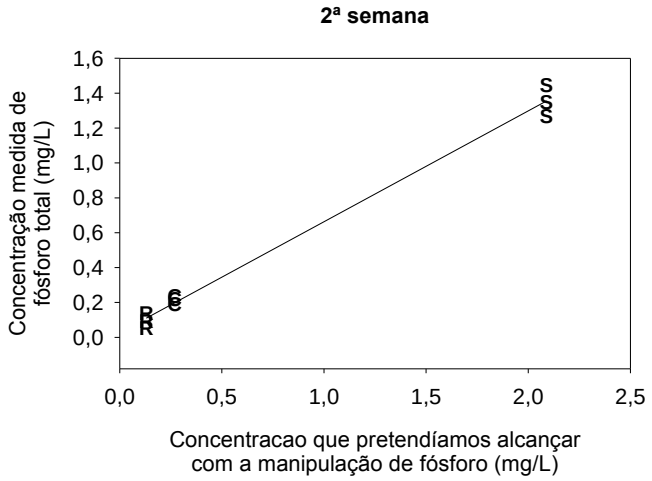


Figura 24. Correlação entre concentrações manipuladas de fósforo e concentrações medidas de fósforo total nos mesocosmos do Experimento 2 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos e das ninfas de libélulas, quando presentes, isto é, na segunda semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; S = NP_{soja}; C = NP_{cana}.

Mais uma vez, podemos na Figura 25 observar que nas semanas que antecederam a introdução dos consumidores e predadores nos mesocosmos, o fósforo total medido aparenta corresponder de forma mais próxima do que o nitrogênio total aos valores manipulados.

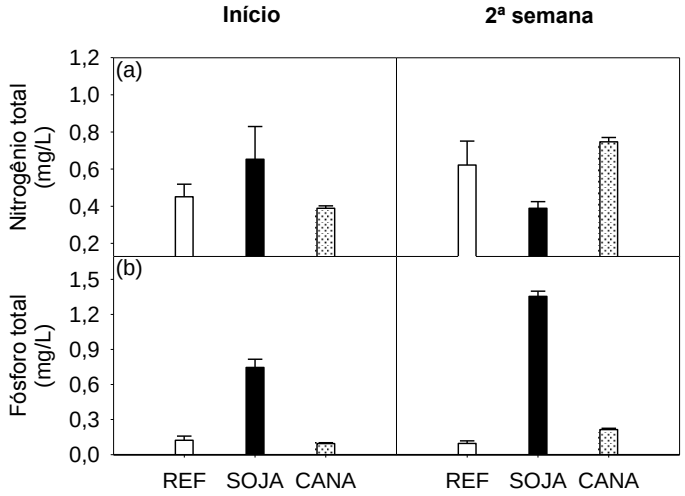


Figura 25. Variação nas concentrações de (a) nitrogênio total e (b) fósforo total em função das manipulações de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), antes da introdução dos girinos e das ninfas de libélulas nos mesocosmos do Experimento 2. Barras representam valores de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência apresentada das barras (referência → soja → cana) reflete o aumento da concentração do nitrogênio.

Ao final das semanas que antecederam a adição de girinos a ambos os experimentos, observamos que o crescimento da biomassa algal, refletida na concentração de clorofila *a*, respondeu muito mais fortemente à manipulação de nitrogênio ($y = 20{,}25x + 5{,}05$; $R^2 = 0{,}946$; $p < 0{,}001$ para o primeiro experimento; $y = 13{,}05x + 1{,}11$; $R^2 = 0{,}942$, $p < 0{,}001$ para o segundo) do que de fósforo ($y = 0{,}70x + 23{,}90$; $R^2 = 0{,}001$, $p = 0{,}931$ para o primeiro experimento; $y = -3{,}93x + 16{,}90$; $R^2 = 0{,}085$; $p = 0{,}445$, para o segundo) (Figuras 26 e 27).

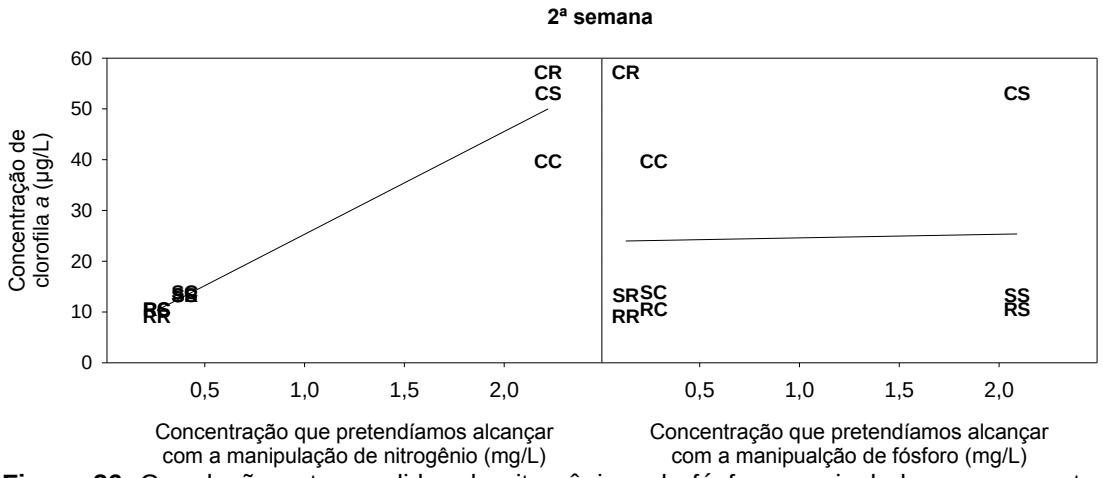


Figura 26. Correlação entre medidas de nitrogênio e de fósforo manipulados e a resposta da biomassa algal, medida pela concentração de clorofila *a*, nos mesocosmos do Experimento 1 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos, isto é, na segunda semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

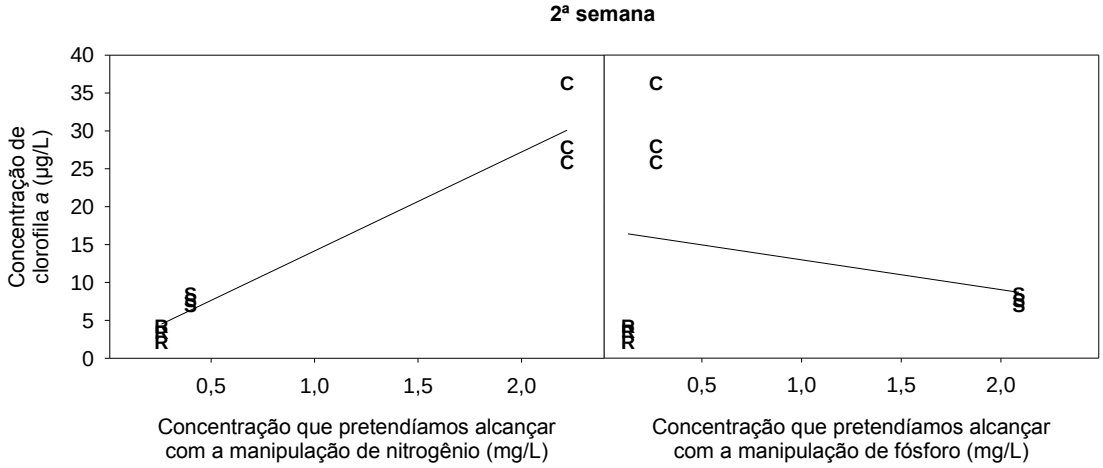


Figura 27. Correlação entre medidas de nitrogênio e de fósforo manipulados e a resposta da biomassa algal, medida pela concentração de clorofila *a*, nos mesocosmos do Experimento 2 ao final do período que antecedeu a adição dos girinos e das ninfas de libélulas, quando presentes, isto é, na segunda semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; S = NP_{soja}; C = NP_{cana}.

As Figuras 28 e 29 nos apresentam com mais clareza os dados analisados por meio de regressão, de modo que é perceptível o maior crescimento da biomassa algal, reflexo de concentrações de clorofila *a*, em tratamentos com maior concentração de nitrogênio manipulado (N_{CANA} para o primeiro experimento; NP_{CANA} para o segundo).

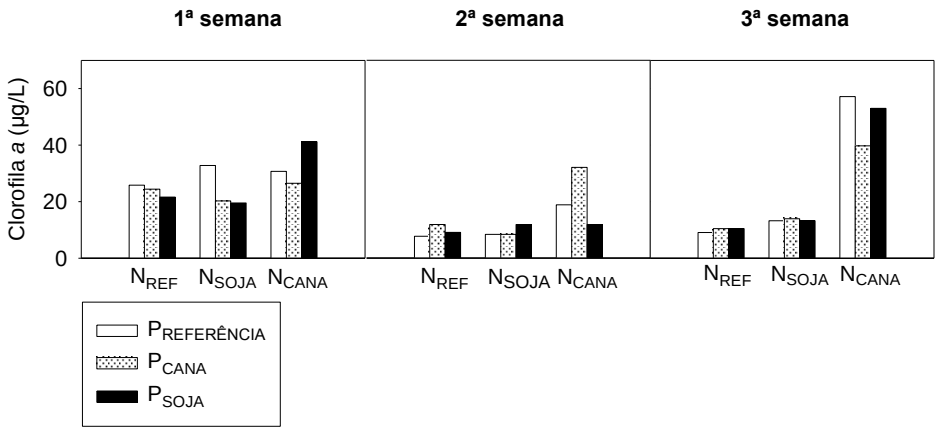


Figura 28. Variação na clorofila *a* em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), durante o período que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1. Barras representam valores de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência demonstrada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto das barras dentro de cada conjunto (referência → cana → soja) reflete o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

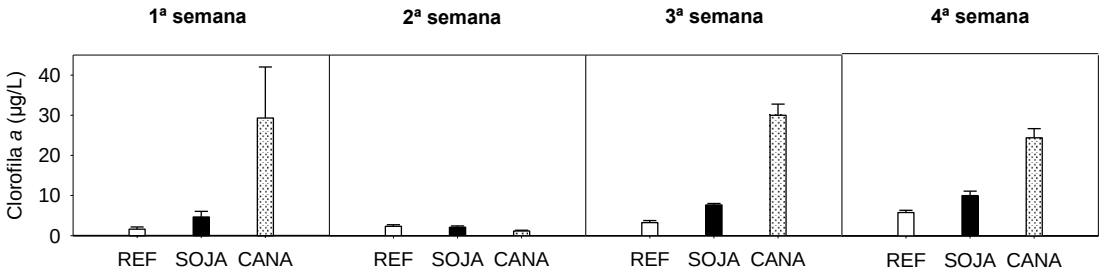


Figura 29. Variação no parâmetro clorofila *a* em função das manipulações de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA), antes da introdução dos girinos e das ninfas de libélulas nos mesocosmos do Experimento 2. Barras representam amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência demonstrada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) reflete o aumento da concentração do nitrogênio.

CADEIA ALIMENTAR COM DOIS NÍVEIS TRÓFICOS (PRODUTORES + CONSUMIDORES)

Nesta seção, analisaremos os resultados das cadeias alimentares compostas por dois níveis tróficos (produtores + consumidores). Para tal, analisaremos os dados

do primeiro experimento completo bem como os dados do segundo experimento para o tratamento de estrutura de comunidade que manipula apenas girinos (portanto sem predadores, estejam eles soltos ou engaiolados). Em outras palavras, o fator ‘estrutura de comunidade’ não é incluído em nenhuma análise desta seção. No mais, nesta seção a análise do efeito da adição de um segundo nível trófico sobre os produtores é feita a partir de uma comparação entre as variáveis medidas pré e pós-introdução dos consumidores.

No primeiro experimento, a condutividade respondeu significativamente tanto para manipulação de nitrogênio ($F_{2,31}$ = 51,72; p < 0,001) quanto de fósforo ($F_{2,31}$ = 5,55; p = 0,009), não havendo, entretanto, resposta significativa para a interação entre os fatores ($F_{4,31}$ = 0,38; p = 0,817) (Figura 30; Tabela 6). Como podemos ver no gráfico, na última semana, os maiores valores de condutividade refletiram as maiores concentrações manipuladas de nitrogênio (N_{CANA}) (Figura 30). Os testes post-hoc detectaram diferença entre os tratamentos referência e cana-de-açúcar e entre soja e cana-de-açúcar, tanto para nitrogênio quanto para fósforo.

A análise de variância de medidas repetidas detectou diferenças na condutividade ao longo do tempo (F_{GG} = 9,94; p = 0,003). Entretanto, as análises entre níveis, ou seja, entre uma semana e outra de medição, não detectaram diferenças significativas em relação à introdução dos girinos que diferissem das diferenças temporais antes da introdução dos mesmos (p < 0,001), sendo estas devidas à manipulação de nutrientes exclusivamente (Tabela 7).

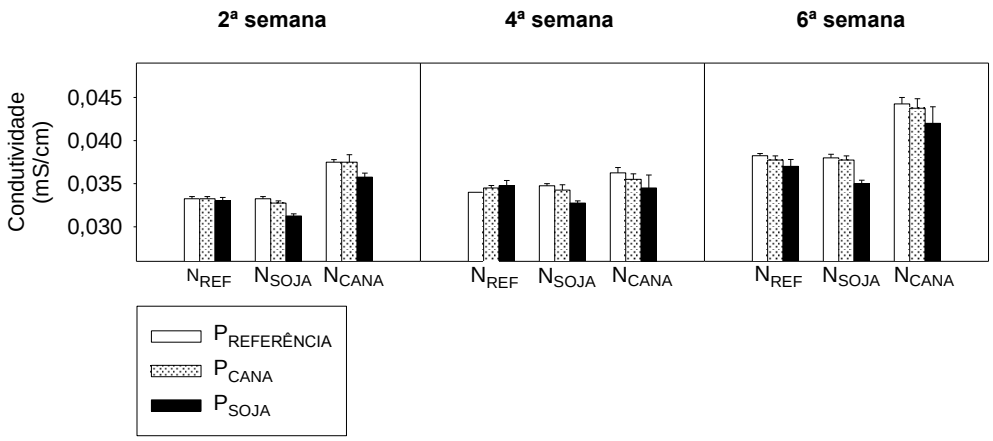


Figura 30. Variação na condutividade em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao longo do Experimento 1. A introdução dos girinos ocorreu entre a 2ª e a 4ª semanas. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto das barras dentro de cada conjunto (referência → cana → soja) reflete o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

Tabela 6. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nitrogênio, de fósforo e da interação entre estes na condutividade medida ao final do Experimento 2, isto é, na sexta semana.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NITROGÊNIO	2	51,72	< 0,001
FÓSFORO	2	5,55	0,009
NITROGÊNIO * FÓSFORO	4	0,38	0,817
Erro	31		

Tabela 7. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na condutividade medida ao longo do Experimento 1.

Fator de correção	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
Correção de Greenhouse-Geisser	1,00	9,94	0,003

No caso do segundo experimento, verificamos que a condutividade final para aqueles tanques em que só havia girinos respondeu significativamente à manipulação de nutrientes, como esperávamos ($F_{2,9}$ = 20,55; p < 0,001) (Figura 31; Tabela 8).

A análise de variância de medidas repetidas indicou que a condutividade se comportou da mesma forma que para o primeiro experimento: teve alteração

significativa ao longo do tempo (F_{GG} = 67,27; p < 0,001) mas entre uma medição e outra não houve indício de alteração por parte dos consumidores (p < 0,001) (Tabela 9)

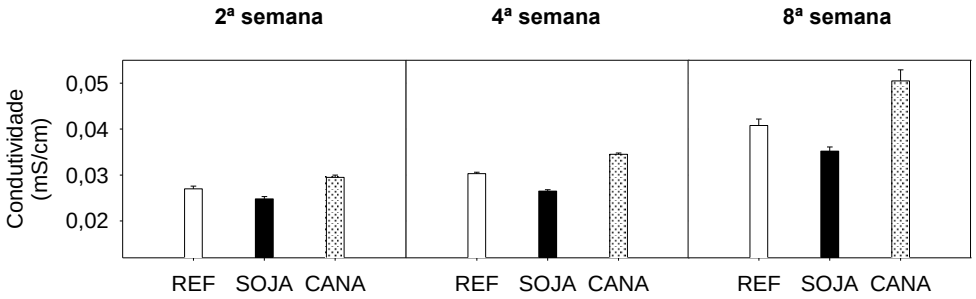


Figura 31. Variação na condutividade em função das manipulações de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) do Experimento 2, somente para os tratamentos de dois níveis tróficos. A introdução dos girinos ocorreu entre a 2ª e a 4ª semanas. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência das barras (referência → soja → cana) reflete o aumento da concentração de nitrogênio, e que a coloração das barras segue o padrão de coloração da Figura 30 para facilitar a comparação entre experimentos.

Tabela 8. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes na condutividade medida ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NUTRIENTES	2	20,55	< 0,001
Erro	9		

Tabela 9. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na condutividade medida ao longo do Experimento 2 anteriormente à introdução dos girinos nos mesocosmos.

Fator de correção	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
Correção de Greenhouse-Geisser	1,82	67,27	< 0,001

As concentrações de nitrogênio total medidas ao final do primeiro experimento passaram a corresponder mais fortemente aos valores manipulados (y = 0,12x + 0,40; R^2 = 0,453; p < 0,001); o mesmo não pôde ser verificado para o fósforo total, cujas

concentrações medidas ficaram menos relacionadas aos valores manipulados (y = 0,09x + 0,89; R^2 = 0,090; *p* = 0,075) (Figuras 32 e 33).

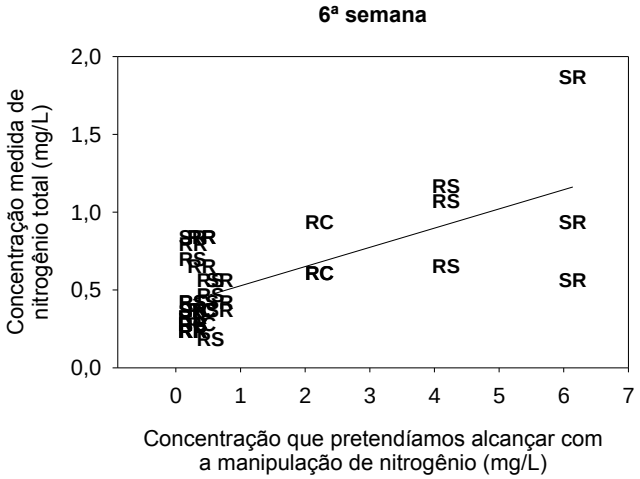


Figura 32. Correlação entre concentrações manipuladas de nitrogênio e concentrações medidas de nitrogênio total nos mesocosmos ao final do Experimento 1, isto é, na sexta semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

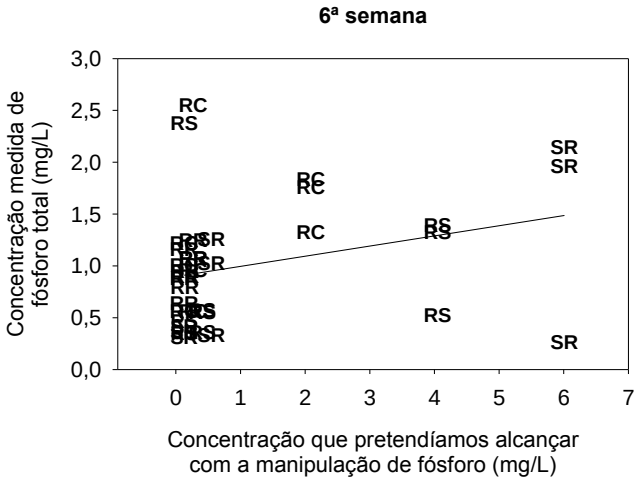


Figura 33. Correlação entre concentrações manipuladas de fósforo e concentrações medidas de fósforo total nos mesocosmos ao final do Experimento 1, isto é, na sexta semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

No segundo experimento, por outro lado, as concentrações de nitrogênio ($y = 0{,}13x + 0{,}58$; $R^2 = 0{,}597$; $p < 0{,}001$) e de fósforo ($y = 0{,}34x + 0{,}35$; $R^2 = 0{,}534$; $p = 0{,}002$) foram mais fiéis à manipulação do que no primeiro, apresentando correspondências similares (Figuras 34 e 35).

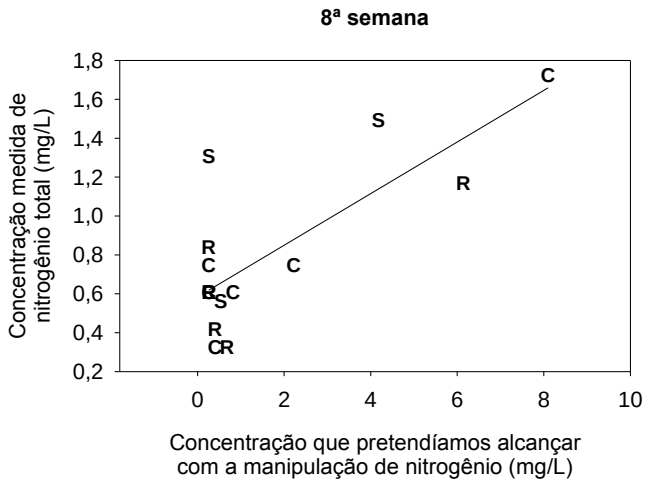


Figura 34. Correlação entre concentrações manipuladas de nitrogênio e concentrações medidas de nitrogênio total nos mesocosmos ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; C = NP_{cana}; S = NP_{soja}.

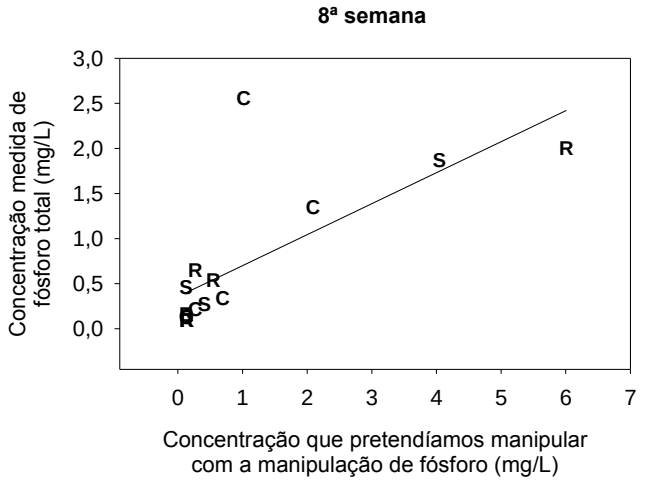


Figura 35. Correlação entre concentrações manipuladas de fósforo e concentrações medidas de fósforo total nos mesocosmos ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; C = NP_{cana}; S = NP_{soja}.

Ao final dos dois experimentos, a concentração de clorofila *a* manteve o padrão observado nas primeiras semanas, respondendo muito mais fortemente à manipulação de nitrogênio (y = 15,95x + 14,15; R^2 = 0,877; *p* < 0,001 para o Experimento 1 e y = 10,22x + 10,40; R^2 = 0,746; *p* < 0,001 para o Experimento 2) do que à manipulação de fósforo (y = 1,97x + 32,91; R^2 = 0,013; *p* = 0,501 para o primeiro experimento e y = -2,59x + 30,27; R^2 = 0,023; *p* = 0,587 para o segundo) (Figuras 36 e 37).

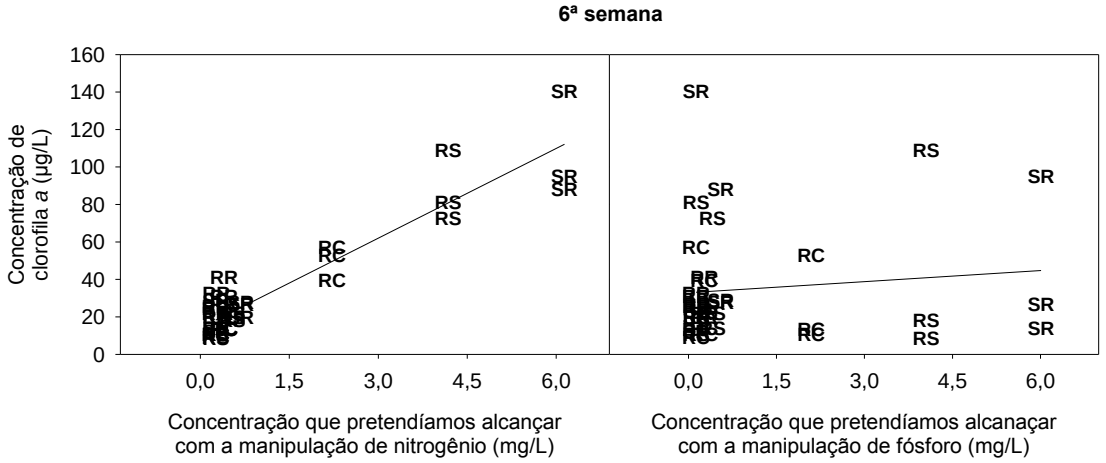


Figura 36. Correlação entre medidas de nitrogênio e de fósforo manipulados e a resposta da biomassa algal, medida pela concentração de clorofila *a* ao final do Experimento 1, isto é, na sexta semana. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}; SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}; CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

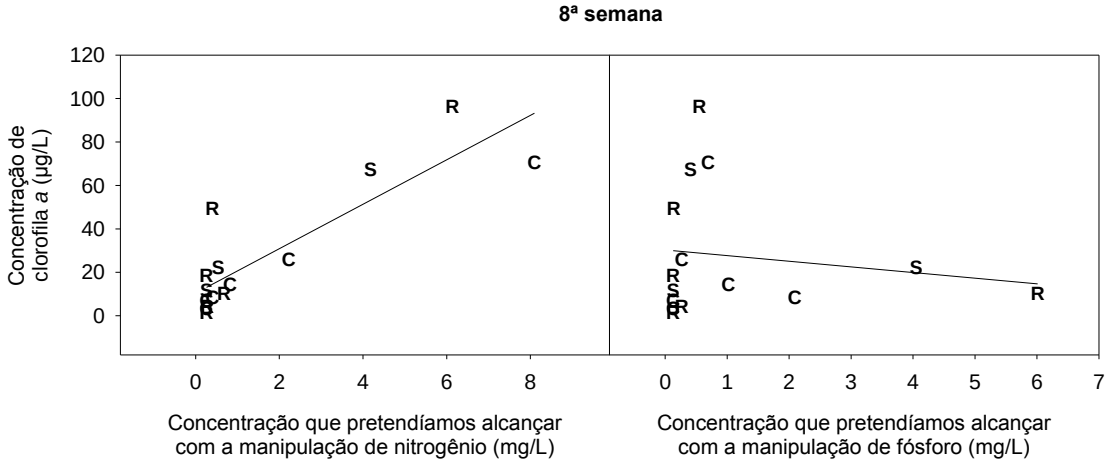


Figura 37. Correlação entre medidas de nitrogênio e de fósforo manipulados e a resposta da biomassa algal, medida pela concentração de clorofila *a* ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; C = NP_{cana}; S = NP_{soja}.

Mais uma vez, gráficos de variação temporal relacionando dados de nitrogênio total, fósforo total e clorofila *a* nos permitem verificar visualmente uma resposta maior da biomassa algal à concentração de nitrogênio em detrimento da concentração de fósforo (Figuras 38 e 39).

A análise de variância de medidas repetidas não detectou variação temporal significativa para concentrações de nitrogênio total (F_{GG} = 2,61; p = 0,126) (Tabela 10) e fósforo total (F_{GG} = 1,04; p = 0,382) (Tabela 11) no Experimento 1. Para clorofila *a*, houve alteração significativa com relação ao tempo (F_{GG} = 5,61; p = 0,018) (Tabela 12), entretanto sem influência da introdução dos girinos, uma vez que os valores significativos entre níveis se mantiveram similares no período pré e no período pós-introdução de consumidores (p < 0,001).

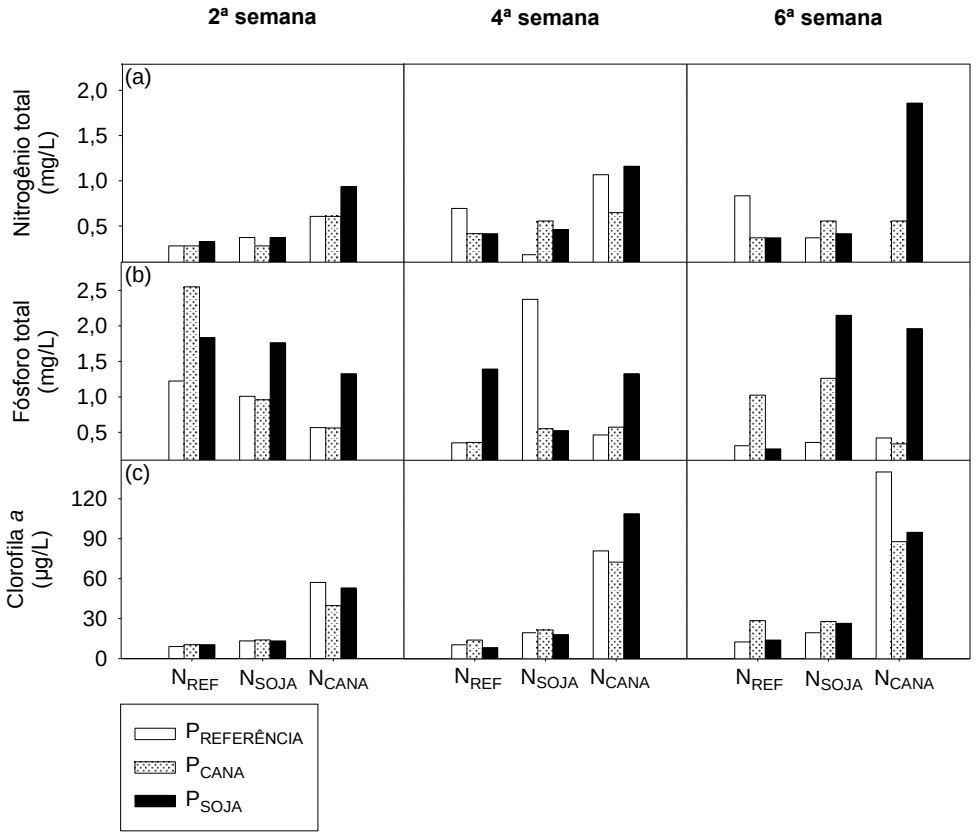


Figura 38. Variação nos parâmetros (a) nitrogênio total, (b) fósforo total e (c) clorofila *a* em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao longo do Experimento 1. Os

girinos foram introduzidos entre a 2ª e a 4ª semanas. Barras representam valores médios de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência demonstrada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto do padrão de coloração (referência → cana → soja) visa o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

Tabela 10. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de nitrogênio total durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1.

Fator de correção	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
Correção de Greenhouse-Geisser	1,43	2,61	0,126

Tabela 11. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de fósforo total durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1.

Fator de correção	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
Correção de Greenhouse-Geisser	2,23	1,04	0,382

Tabela 12. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de clorofila a durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1.

Fator de correção	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
Correção de Greenhouse-Geisser	1,79	5,61	0,018

Para o segundo experimento, a análise de variância de medidas repetidas de nitrogênio total (tabela 13), de fósforo total (tabela 14) e de clorofila (tabela 15) não indicaram alteração significativa com a passagem do tempo, não nos possibilitando verificar a presença de efeito por parte dos consumidores.

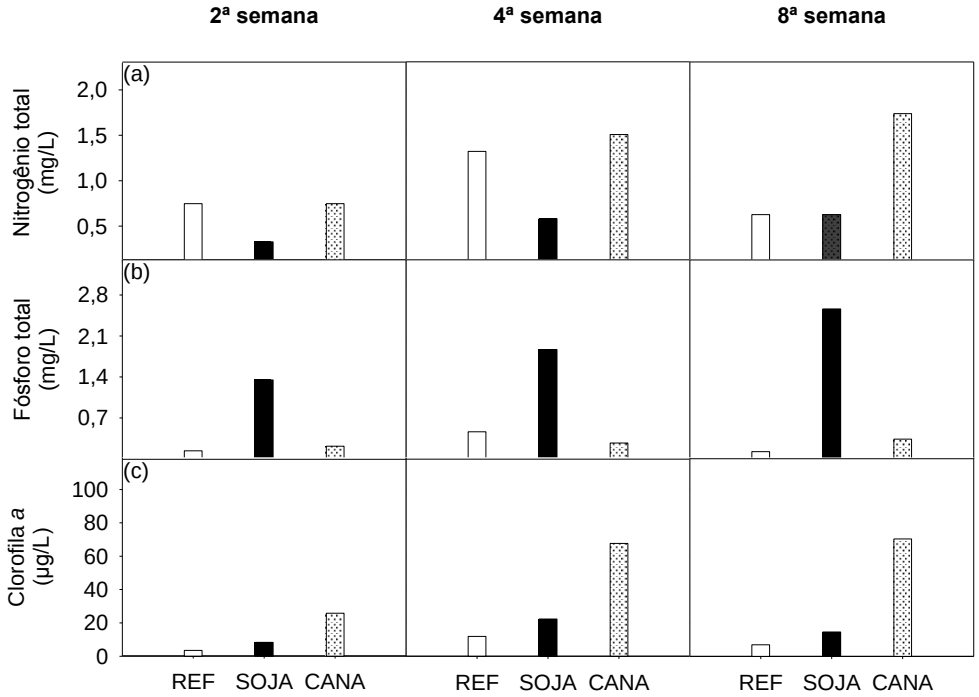


Figura 39. Variação nos parâmetros (a) nitrogênio total, (b) fósforo total e (c) clorofila *a* em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao longo do Experimento 2 na ausência de predadores. Os girinos foram introduzidos entre a 2ª e a 4ª semanas. Barras representam valores de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência demonstrada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) visa o aumento da concentração dos nutrientes referidos, seguindo o padrão de coloração utilizado para o Experimento 1.

Tabela 13. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de nitrogênio total durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 2.

Fator de correção	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
Correção de Greenhouse-Geisser	1,67	1,69	0,305

Tabela 14. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de fósforo total durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 2.

Fator de correção	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
Correção de Greenhouse-Geisser	1,89	1,49	0,334

Tabela 15. Resultado da ANOVA de medidas repetidas para o efeito da passagem do tempo na concentração de clorofila a durante o período de tempo que antecedeu a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 2.

Fator de correção	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
Correção de Greenhouse-Geisser	1,72	1,73	0,318

Outra forma de estudar o comportamento do nível trófico dos produtores na presença dos consumidores é analisar a variação na concentração de clorofila *a* nas semanas que se seguiram à introdução dos girinos. Tomando como base a semana imediatamente anterior a esse passo no experimento, calculamos a concentração de clorofila *a* pós-introdução dos girinos em relação à concentração pré-introdução dos girinos, considerada valor 1. Valores positivos significam que a concentração de clorofila *a* aumentou e valores negativos significam que a clorofila *a* diminuiu em relação à concentração de clorofila a anterior à introdução dos girinos (Figuras 40, 41, 42 e 43).

No primeiro experimento, somente cinco dos 36 valores analisados se encontram abaixo da concentração pré-introdução de girinos, e estes foram registrados nas semanas iniciais do experimento. Nesse experimento, a concentração de clorofila *a* pareceu crescer independentemente da atividade alimentar dos consumidores, mas a relação que observamos foi fraca para todas as manipulações de nutrientes (Figuras 40, 41 e 42; Tabela 16).

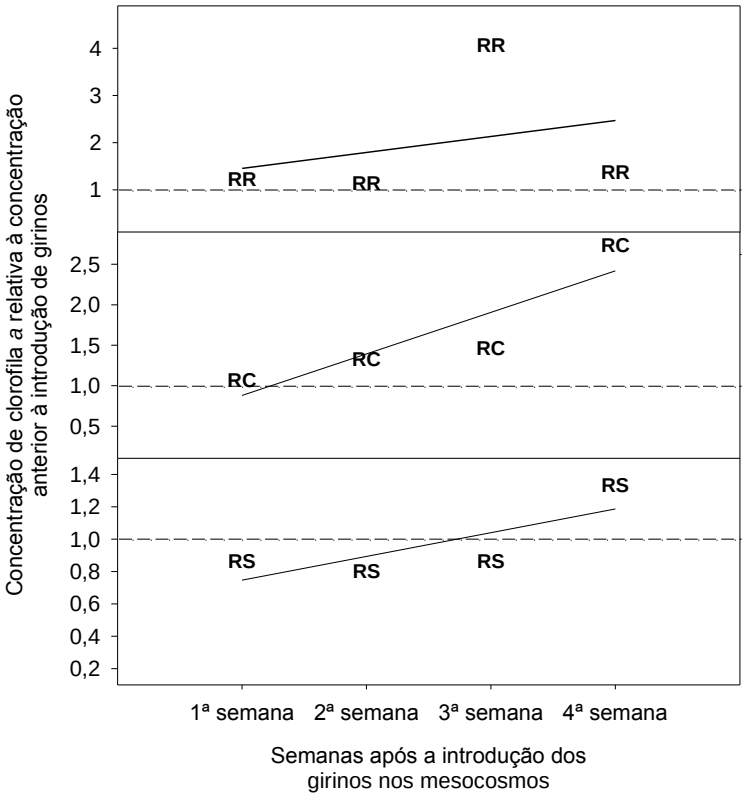


Figura 40. Variação nas concentrações de clorofila *a* nas semanas que sucederam a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1 com manipulação de nitrogênio de ambiente de referência ($N_{REFERÊNCIA}$). A linha pontilhada representa a concentração estabilizada na semana antes da introdução dos consumidores nas teias alimentares. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de fósforo: RR = $N_{referência}$ + $P_{referência}$; RC = $N_{referência}$ + P_{cana}; RS = $N_{referência}$ + P_{soja}.

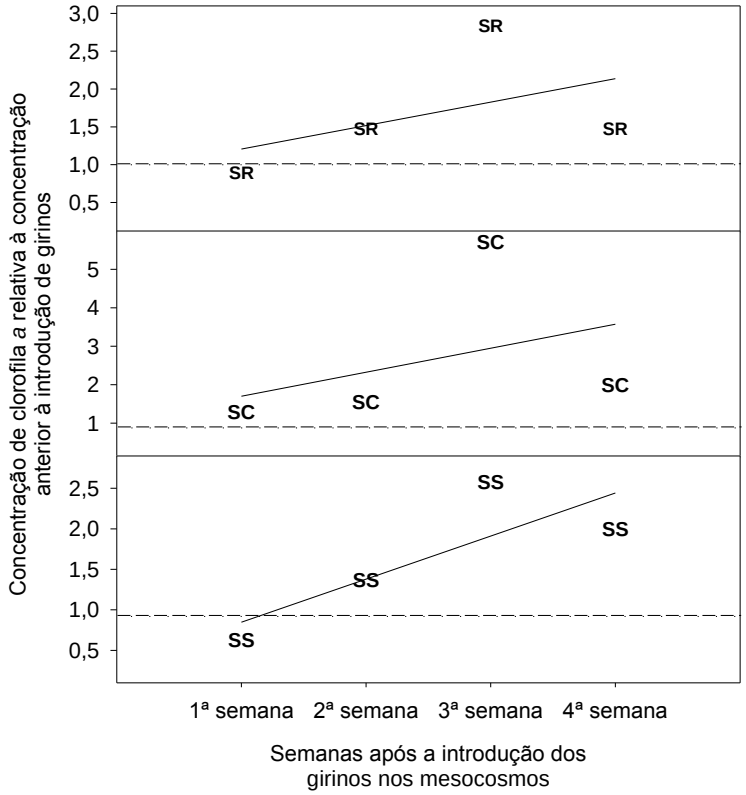


Figura 41. Variação nas concentrações de clorofila *a* nas semanas que sucederam a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1 com manipulação de nitrogênio de culturas de soja (N_{SOJA}). A linha pontilhada representa a concentração estabilizada na semana antes da introdução dos consumidores nas teias alimentares. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de fósforo: SR = N_{soja} + $P_{referência}$; SC = N_{soja} + P_{cana}; SS = N_{soja} + P_{soja}.

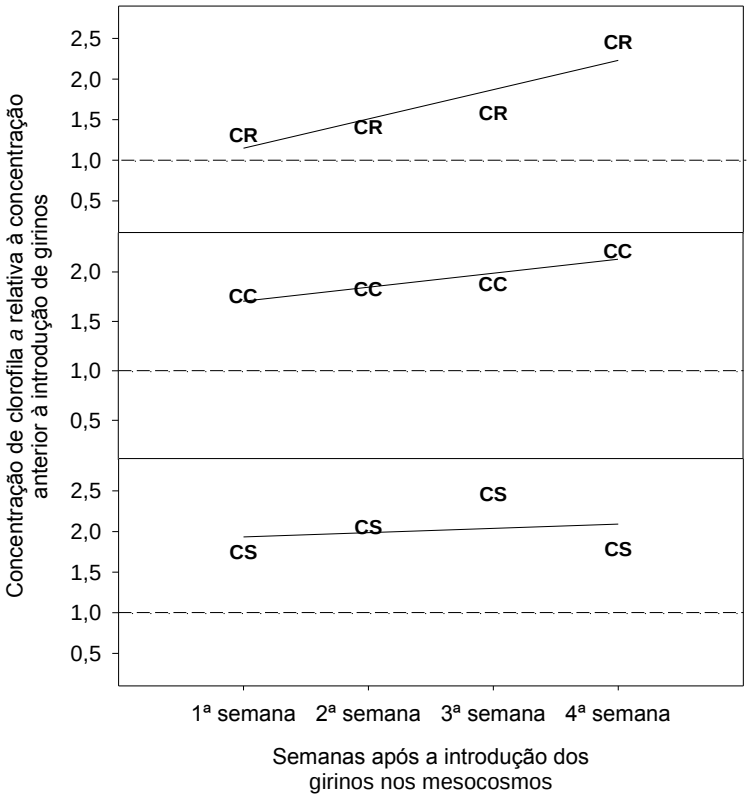


Figura 42. Variação nas concentrações de clorofila *a* nas semanas que sucederam a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 1 com manipulação de nitrogênio de culturas de cana-de-açúcar (N_{CANA}). A linha pontilhada representa a concentração estabilizada na semana antes da introdução dos consumidores nas teias alimentares. Pares de letras representam tratamento com relação à manipulação de fósforo: CR = N_{cana} + $P_{referência}$; CC = N_{cana} + P_{cana}; CS = N_{cana} + P_{soja}.

Tabela 16. Resultados das análises de regressão do comportamento da produtividade primária nas semanas posteriores à introdução dos girinos, por meio de comparação das concentrações de clorofila *a* antes e depois da introdução dos consumidores nos mesocosmos do Experimento 1.

Tratamento de nutrientes	equação da reta	R^2	Valor de *p*
N_{REF}:P_{REF}	0,34x + 1,45	0,095	0,691
N_{REF}:P_{CANA}	0,51x + 0,88	0,799	0,106
N_{REF}:P_{SOJA}	0,15x + 0,75	0,590	0,232
N_{SOJA}:P_{REF}	0,31x + 0,20	0,235	0,515
N_{SOJA}:P_{CANA}	0,62x + 1,70	0,153	0,609
N_{SOJA}:P_{SOJA}	0,53x + 0,85	0,672	0,180
N_{CANA}:P_{REF}	0,36x + 1,14	0,800	0,106
N_{CANA}:P_{CANA}	0,14x + 1,70	0,822	0,090
N_{CANA}:P_{SOJA}	0,05x + 1,93	0,043	0,792

No segundo experimento, todas as 15 medições de clorofila *a* se mantiveram acima da concentração pré-introdução dos girinos. Essas concentrações pareceram decair com a introdução dos girinos, entretanto essa relação não foi significativa para nenhum dos tratamentos de manipulação de nutrientes (Figura 43; Tabela 17).

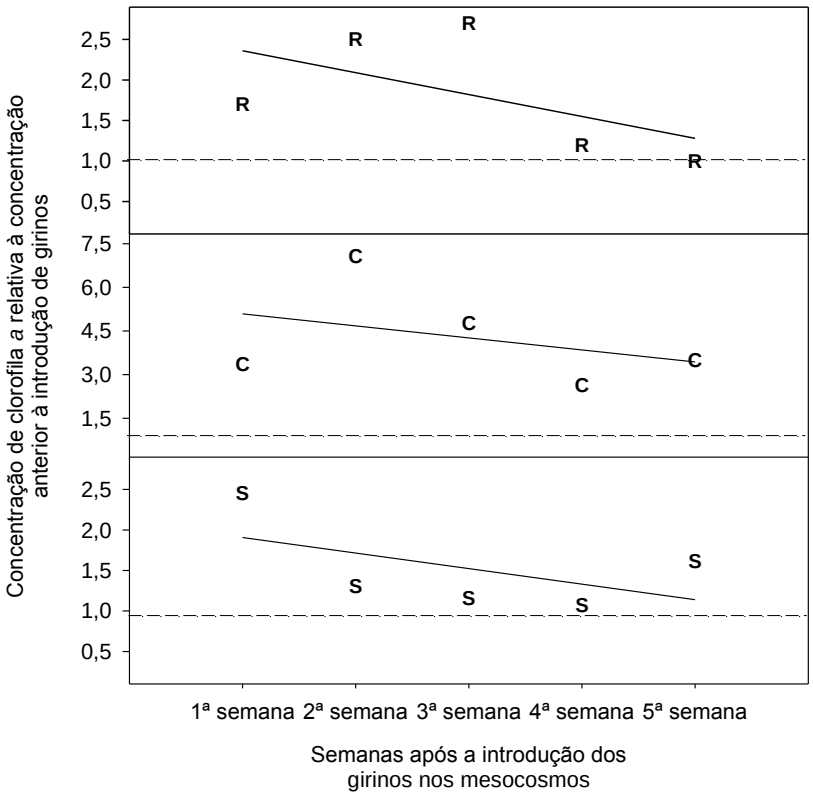


Figura 43. Variação nas concentrações de clorofila *a* nas semanas que sucederam a introdução dos girinos nos mesocosmos do Experimento 2 na ausência dos predadores. A linha pontilhada representa a concentração estabilizada na semana antes da introdução dos consumidores nas teias alimentares. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; C = NP_{cana}; S = NP_{soja}.

Tabela 17. Resultados das análises de regressão do comportamento da produtividade primária nas semanas posteriores à introdução dos girinos, por meio de comparação das concentrações de clorofila *a* antes e depois da introdução dos consumidores nos mesocosmos do Experimento 2.

Tratamento de nutrientes	equação da reta	R^2	Valor de *p*
NP_{REF}	2,36 - 0,27x	0,316	0,324
NP_{CANA}	5,09 - 0,41x	0,141	0,533
NP_{SOJA}	1,91 - 0,19x	0,291	0,348

Os parâmetros estimados para *Physalaemus cuvieri*, de modo geral, não responderam às manipulações de nutrientes conduzidas no primeiro experimento.

A mortalidade, transformada para logitos, não apresentou resposta à manipulação de nutrientes, mas foi ligeiramente mais dependente de fósforo ($F_{2,31}$ = 2,63; p = 0,088) do que de nitrogênio ($F_{2,31}$ = 1,38; p = 0,266), não tendo havido interação entre os fatores na resposta da mortalidade ($F_{4,31}$ = 0,46; p = 0,761) (Figura 44a; Tabela 18).

A massa final de indivíduos de *Physalaemus cuvieri* respondeu à manipulação de fósforo ($F_{2,31}$ = 3,55; p = 0,041), mas não à de nitrogênio ($F_{2,31}$ = 1,02; p = 0,371), não havendo interação entre os fatores ($F_{4,31}$ = 1,59; p = 0,206) (Figura 44b; Tabela 19). Os testes post-hoc detectaram significância nas diferenças entre os tratamentos soja e cana-de-açúcar.

O estágio final de desenvolvimento respondeu da mesma forma que a mortalidade: não apresentou diferença significativa, mas foi ligeiramente mais relacionado à manipulação de fósforo ($F_{2,31}$ = 2,61; p = 0,089) do que de nitrogênio ($F_{2,31}$ = 1,45; p = 0,250), não havendo também interação entre os fatores manipulados ($F_{4,31}$ = 1,38; p = 0,266) (Figura 44c; Tabela 20).

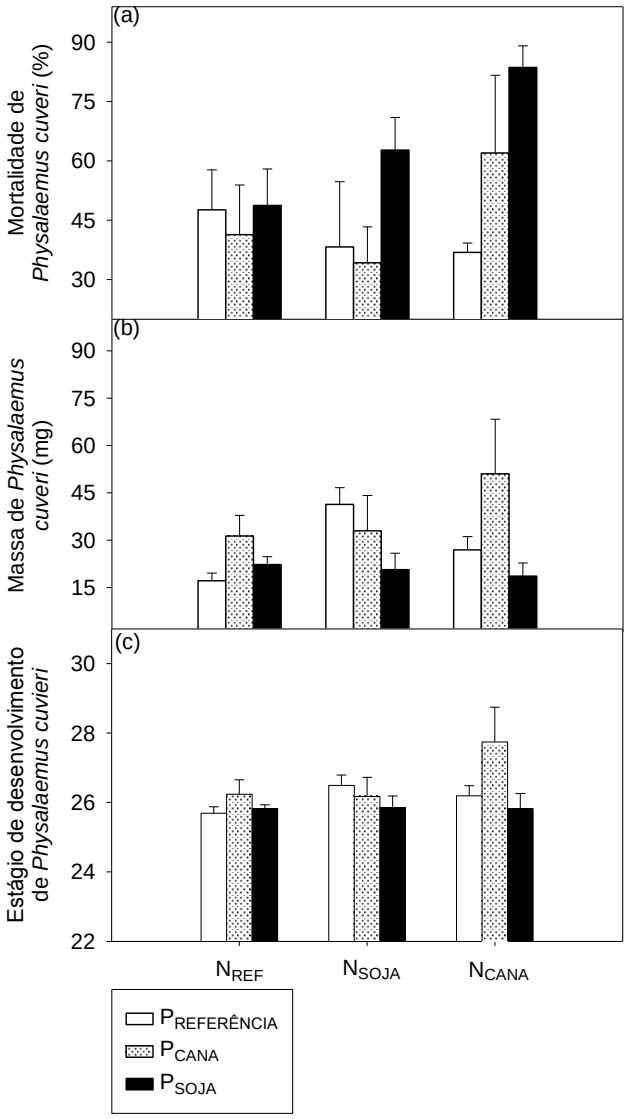


Figura 44. Variação nos valores finais de (a) massa, (b) mortalidade e (c) estágio de desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao final do Experimento 1. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada tanto dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) quanto das barras dentro de cada conjunto (referência → cana → soja) reflete o aumento da concentração dos nutrientes referidos.

Tabela 18. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nitrogênio, de fósforo e da interação entre estes na mortalidade final média dos girinos de *Physalaemus cuvieri*, no Experimento 1.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NITROGÊNIO	2	1,38	0,266
FÓSFORO	2	2,63	0,088
NITROGÊNIO * FÓSFORO	4	0,46	0,761
Erro	31		

Tabela 19. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nitrogênio, de fósforo e da interação entre estes na massa final média dos girinos de *Physalaemus cuvieri*, no Experimento 1.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NITROGÊNIO	2	1,02	0,371
FÓSFORO	2	3,55	0,041
NITROGÊNIO * FÓSFORO	4	1,59	0,206
Erro	31		

Tabela 20. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nitrogênio, de fósforo e da interação entre estes no estágio final médio de desenvolvimento dos girinos de *Physalaemus cuvieri*, no Experimento 1.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NITROGÊNIO	2	1,45	0,250
FÓSFORO	2	2,61	0,089
NITROGÊNIO * FÓSFORO	4	1,38	0,266
Erro	31		

Para *Hypsiboas faber* nos tratamentos em que ninfas de libélulas eram ausentes, a taxa de mortalidade respondeu de forma marginalmente significativa à manipulação de nutrientes ($F_{2,9}$ = 4,21; p = 0,051), tendo o teste post-hoc LSD detectado diferença significativa entre os tratamentos de ambiente de referência e culturas de soja, isto é, respondendo mais fortemente à manipulação do fósforo, como no Experimento 1 (Figura 45a; Tabela 21).

O crescimento em massa dos girinos também apresentou resposta significativa à manipulação de nutrientes ($F_{2,9}$ = 6,75; p = 0,016), mas, no caso, os três testes post-hoc empregados detectaram diferença significativa entre ambiente de referência e culturas de cana-de-açúcar, ou seja, respondendo à manipulação preponderante de nitrogênio e relacionada à resposta da biomassa algal (Figura 45b; Tabela 22).

O desenvolvimento médio alcançado pelos girinos do segundo experimento na ausência dos predadores não respondeu significativamente à manipulação de

nutrientes como a mortalidade e o crescimento em massa ($F_{2,9}$ = 2,56; p = 0,131) (Figura 45c; Tabela 23).

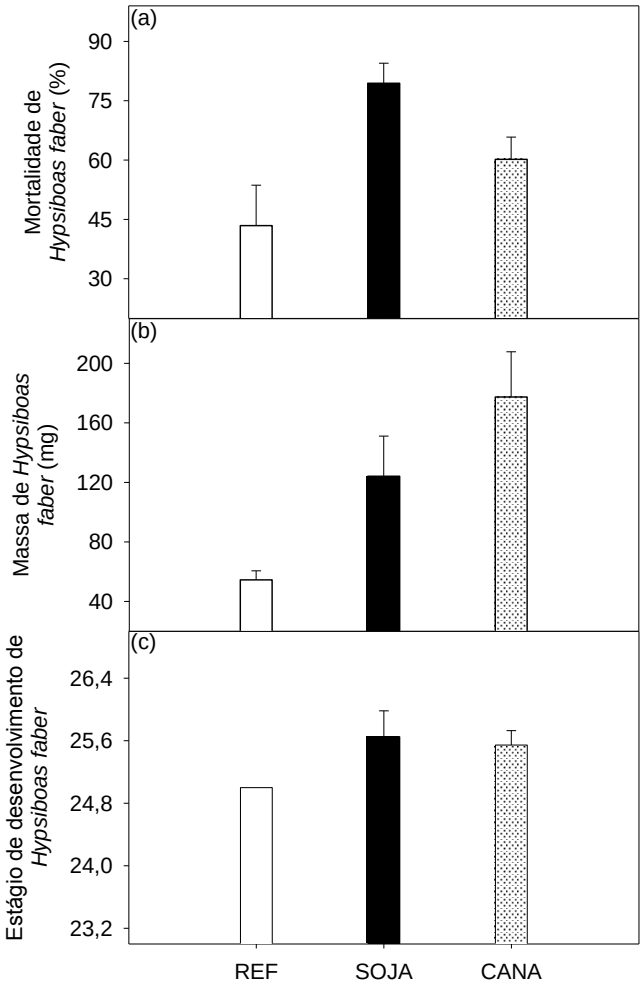


Figura 45. Variação nos valores finais médios de (a) mortalidade, (b) massa e (c) estágio de desenvolvimento de girinos de *Hypsiboas faber* em função das manipulações de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao final do Experimento 2, na ausência de predadores. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência das barras (referência → soja → cana) reflete o aumento da concentração de nitrogênio, e que a coloração das barras segue o padrão de coloração da Figura 40 para facilitar a comparação entre experimentos.

Tabela 21. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes na mortalidade final média dos girinos de *Hypsiboas faber* na ausência de predadores, no Experimento 2.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NUTRIENTES	2	4,21	0,051
Erro	9		

Tabela 22. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes na massa final média dos girinos de *Hypsiboas faber* na ausência de predadores, no Experimento 2.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NUTRIENTES	2	6,75	0,016
Erro	9		

Tabela 23. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes no estágio final médio de desenvolvimento dos girinos de *Hypsiboas faber* na ausência de predadores, no Experimento 2.

Fatores manipulados	Graus de liberdade	Valor de F	Valor de *p*
NUTRIENTES	2	2,65	0,131
Erro	9		

CADEIA ALIMENTAR COM TRÊS NÍVEIS TRÓFICOS (PRODUTORES + CONSUMIDORES + PREDADORES)

Para abordarmos comunidades aquáticas de três níveis tróficos (produtores + consumidores + predadores), nos atemos exclusivamente aos dados do segundo experimento, uma vez que o primeiro experimento só manipulou dois níveis tróficos.

No segundo experimento, a condutividade respondeu à manipulação de nutrientes ($F_{2,31}$ = 36,21; p < 0,001) mas não à de estrutura de comunidade ($F_{2,31}$ = 0,10; p = 0,901), mantendo a tendência observada nas primeiras semanas antes da adição dos girinos e ninfas de libélulas, e atendendo às nossas expectativas. Também não houve resposta significativa para a interação entre os dois fatores manipulados: nutrientes e estrutura de comunidade ($F_{4,31}$ = 0,06; p = 0,992) (Figura 46; Tabela 24). Os testes post-hoc detectaram diferença significativa entre todos os tratamentos de fertilização.

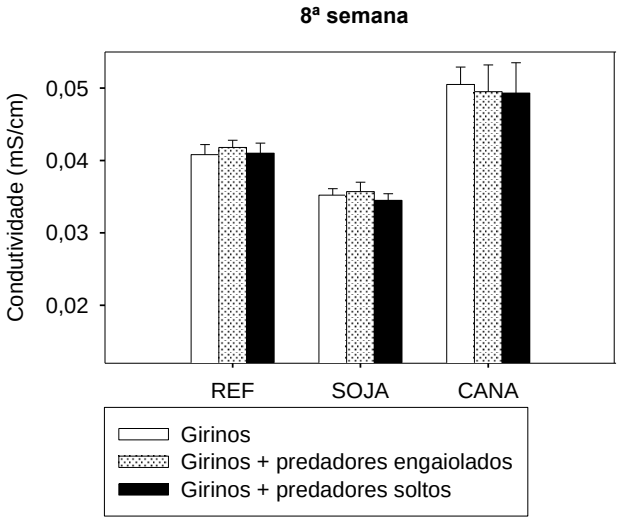


Figura 46. Variação na condutividade em função das manipulações de nutrientes e de estrutura de comunidade para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Barras de dispersão denotam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) reflete o aumento geral da concentração de nitrogênio.

Tabela 24. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação da concentração de nutrientes, da estrutura de comunidade e da interação entre estas na condutividade medida ao final do Experimento 2.

Fatores manipulados	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
NUTRIENTES	2	36,21	< 0,001
COMUNIDADE	2	0,10	0,901
NUTRIENTES * COMUNIDADE	4	0,06	0,992
Erro	31		

No Experimento 2, as concentrações medidas de nitrogênio total e de fósforo total apresentaram forte correspondência com as manipulações exercidas ($y = 0,16x + 0,50$; $R^2 = 0,702$; $p < 0,001$ para o nitrogênio e $y = 0,35x + 0,33$; $R^2 = 0,522$; $p < 0,001$ para o fósforo) (Figuras 47 e 48).

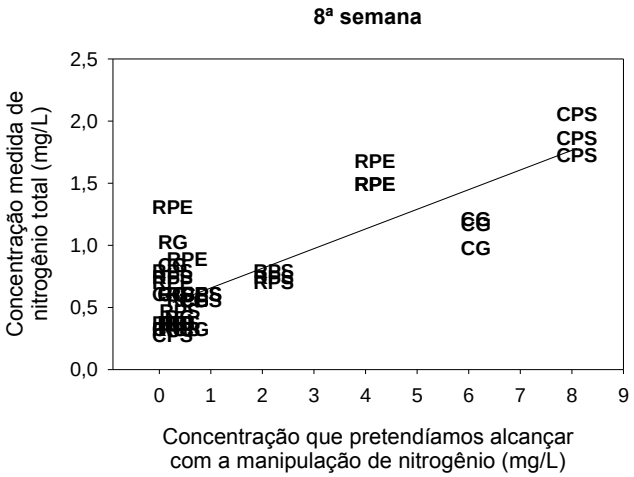


Figura 47. Correlação entre medidas finais de nitrogênio manipulado e concentração de nitrogênio total nos mesocosmos ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Conjuntos de letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes e de estrutura de comunidade: RG = $NP_{referência}$ + girinos; RPE = $NP_{referência}$ + predador engaiolado; RPS = $NP_{referência}$ + predador solto; SG = NP_{soja} + girinos; SPE = NP_{soja} + predador engaiolado; SPS = NPsoja + predador solto; CG = NP_{cana} + girinos; CPE = NP_{cana} + predador engaiolado; CPS = NP_{cana} + predador solto.

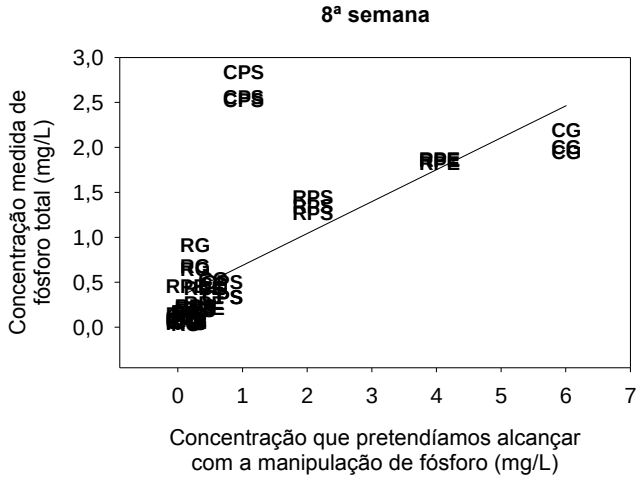


Figura 48. Correlação entre medidas finais de fósforo manipulado e concentração de fósforo total nos mesocosmos ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Conjuntos de letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes e de estrutura de comunidade: RG = $NP_{referência}$ + girinos; RPE = $NP_{referência}$ + predador engaiolado; RPS = $NP_{referência}$ + predador solto; SG = NP_{soja} + girinos; SPE = NP_{soja} + predador engaiolado; SPS = NPsoja + predador solto; CG = NP_{cana} + girinos; CPE = NP_{cana} + predador engaiolado; CPS = NP_{cana} + predador solto.

A clorofila respondeu da mesma maneira que para as cadeias alimentares de um e de dois níveis tróficos: respondeu muito mais fortemente à manipulação de

nitrogênio nos mesocosmos (y = 11,04x + 8,82; R^2 = 0,694; *p* < 0,001) do que à manipulação de fósforo (y = 0,40x + 26,82; R^2 = 0,0004; *p* = 0,888) (Figura 49).

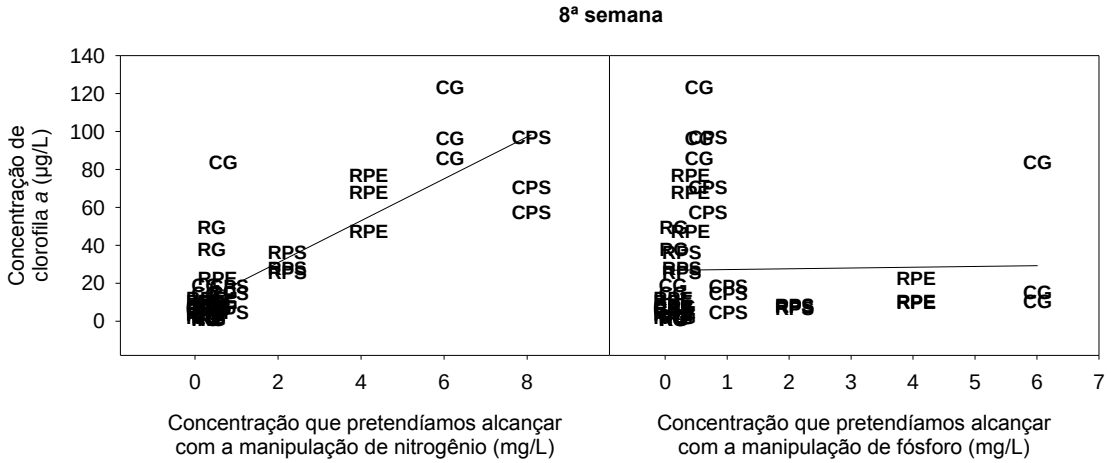


Figura 49. Correlação entre medidas finais de nitrogênio e de fósforo manipulados e da resposta da biomassa algal, medida pela concentração de clorofila *a*, nos mesocosmos ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Conjuntos de letras representam tratamento com relação à manipulação de nitrogênio e de fósforo e de estrutura de comunidade: RG = $NP_{referência}$ + girinos; RPE = $NP_{referência}$ + predador engaiolado; RPS = $NP_{referência}$ + predador solto; SG = NP_{soja} + girinos; SPE = NP_{soja} + predador engaiolado; SPS = NPsoja + predador solto; CG = NP_{cana} + girinos; CPE = NP_{cana} + predador engaiolado; CPS = NP_{cana} + predador solto.

A Figura 50 nos mostra com nitidez as correlações entre manipulações de nutrientes, medições de nitrogênio total e fósforo total e clorofila *a*. A resposta da clorofila *a* é, visivelmente, atrelada à manipulação de nitrogênio e à concentração de nitrogênio total nos mesocosmos.

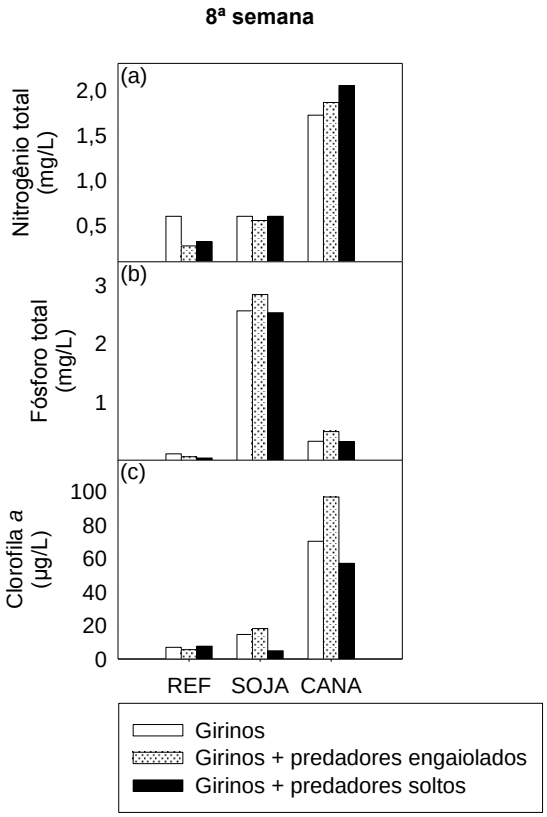


Figura 50. Variação nas concentrações de (a) nitrogênio total, (b) fósforo total e (c) clorofila *a* em função das manipulações de nutrientes para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao final do Experimento 2, isto é, na oitava semana. Barras representam valores médios de amostras compostas e, portanto, não apresentam medida de dispersão. Note que a sequência apresentada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) reflete o aumento geral da concentração de nitrogênio.

Para os girinos de *Hypsiboas faber*, houve resposta à manipulação de nutrientes, como era de nossa expectativa, mas não à manipulação de estrutura de comunidades, diferentemente do que presumíamos.

A mortalidade dos indivíduos estudados também respondeu significativamente à manipulação de nutrientes ($F_{2,31}$ = 5,65; p = 0,008) e não à manipulação de estrutura de comunidades ($F_{2,31}$ = 1,28; p = 0,292), contrariando o que esperávamos em função da predação por ninfas de Odonata. Não houve, também, interação significativa entre os fatores manipulados ($F_{4,31}$ = 0,37; p = 0,827) (Figura 51a; Tabela 25). Todos os testes post-hoc detectaram diferença significativa entre manipulações de nutrientes simulando referência e soja, e apenas entre eles. No caso da mortalidade, os maiores

valores obtidos são aqueles que refletem as maiores concentrações de fósforo relativas às de nitrogênio (utilizadas em fertilizantes de culturas de soja – N_{SOJA}).

A massa média dos girinos de *Hypsiboas faber* apresentou resposta significativa à manipulação de nutrientes ($F_{2,31}$ = 14,39; p < 0,001) mas não à de estrutura de comunidade ($F_{2,31}$ = 0,45; p = 0,631) nem à interação entre os fatores manipulados ($F_{4,31}$ = 0,39; p = 0,812) (Figura 51b; Tabela 26). Os testes post-hoc detectaram diferença entre todos os tratamentos de nutrientes: referência e soja, referência e cana-de-açúcar, soja e cana-de-açúcar. As maiores massas foram as dos tratamentos com concentrações de nutrientes de fertilizantes utilizados em culturas de cana-de-açúcar (refletindo as maiores concentrações manipuladas de nitrogênio – N_{CANA}) e as menores, as de ambiente de referência.

Da mesma maneira que para massa e mortalidade, o estágio de desenvolvimento dos girinos se mostrou diferente entre os tratamentos de nutrientes ($F_{2,31}$ = 10,04; p < 0,001) mas não entre os de comunidade ($F_{2,31}$ = 0,67; p = 0,517) nem à interação entre os fatores ($F_{4,31}$ = 0,48; p = 0753) (Figura 51c; Tabela 27). Os testes post-hoc de Scheffe e Sidak detectaram diferença significativa entre os tratamentos referência e soja, enquanto o LSD detectou também entre os outros dois pares de tratamentos: referência e cana-de-açúcar, soja e cana-de-açúcar. A tendência em relação à manipulação de nutrientes foi a mesma que para estimativas de mortalidade: a resposta foi maior à concentração de fósforo, refletindo as concentrações utilizadas nas culturas de soja (P_{SOJA}).

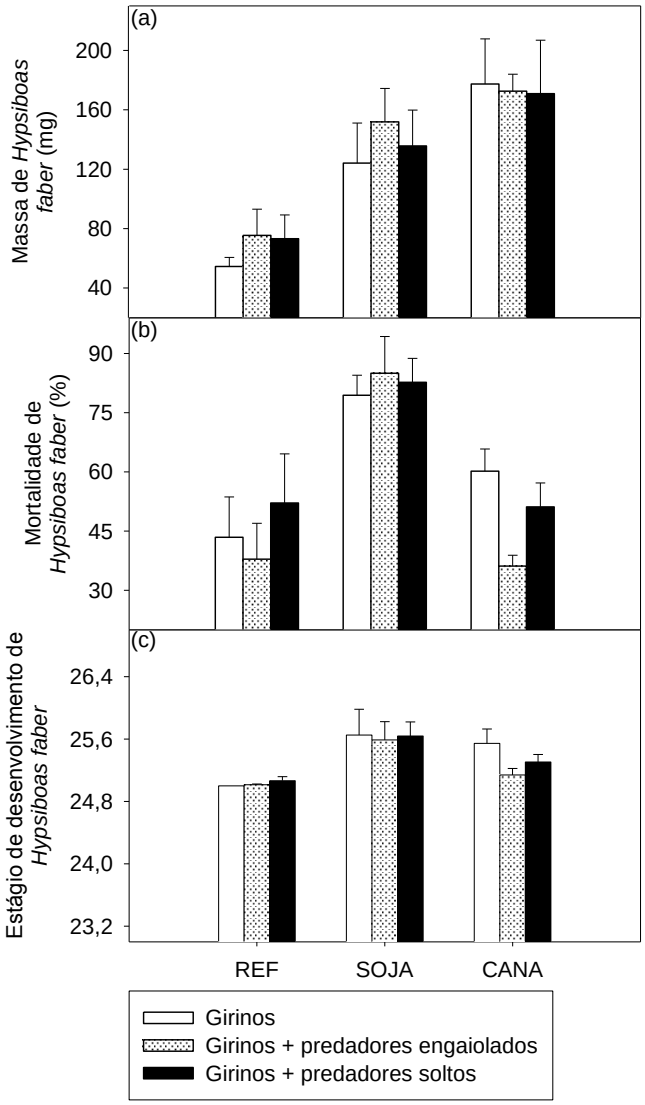


Figura 51. Variação nos valores finais médios de (a) mortalidade, (b) massa e (c) estágio de desenvolvimento de girinos de *Hypsiboas faber* em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA). Barras de dispersão denotam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência apresentada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) reflete o aumento geral da concentração de nitrogênio.

Tabela 25. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes, das estruturas de comunidade e da interação entre estas na mortalidade final média dos girinos de *Hypsiboas faber*, no Experimento 2.

Fatores manipulados	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
NUTRIENTES	2	5,65	0,008
COMUNIDADE	2	1,28	0,292
NUTRIENTES * COMUNIDADE	4	0,37	0,827
Erro	31		

Tabela 26. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes, das estruturas de comunidade e da interação entre estas na massa final média dos girinos de *Hypsiboas faber*, no Experimento 2.

Fatores manipulados	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
NUTRIENTES	2	14,39	< 0,001
COMUNIDADE	2	0,49	0,631
NUTRIENTES * COMUNIDADE	4	0,39	0,812
Erro	31		

Tabela 27. Resultados da ANOVA para os efeitos da manipulação das concentrações de nutrientes, das estruturas de comunidade e da interação entre estas no estágio final médio de desenvolvimento dos girinos de *Hypsiboas faber*, no Experimento 2.

Fatores manipulados	**Graus de liberdade**	**Valor de F**	**Valor de *p***
NUTRIENTES	2	10,04	< 0,001
COMUNIDADE	2	0,67	0,517
NUTRIENTES * COMUNIDADE	4	0,48	0,753
Erro	31		

Quanto à predação exercida pelas ninfas de libélulas nas gaiolas, a análise de variância indicou ausência de resposta dessa variável à manipulação de nutrientes (Figura 52a; Tabela 28). Podemos observar, visualmente, que a taxa de predação no interior das gaiolas não tem correspondência, nem positiva, nem negativa, com as massas finais dos girinos que cresciam no interior dos mesocosmos, fora das gaiolas (Figura 52b), como abordamos anteriormente (Figura 51b).

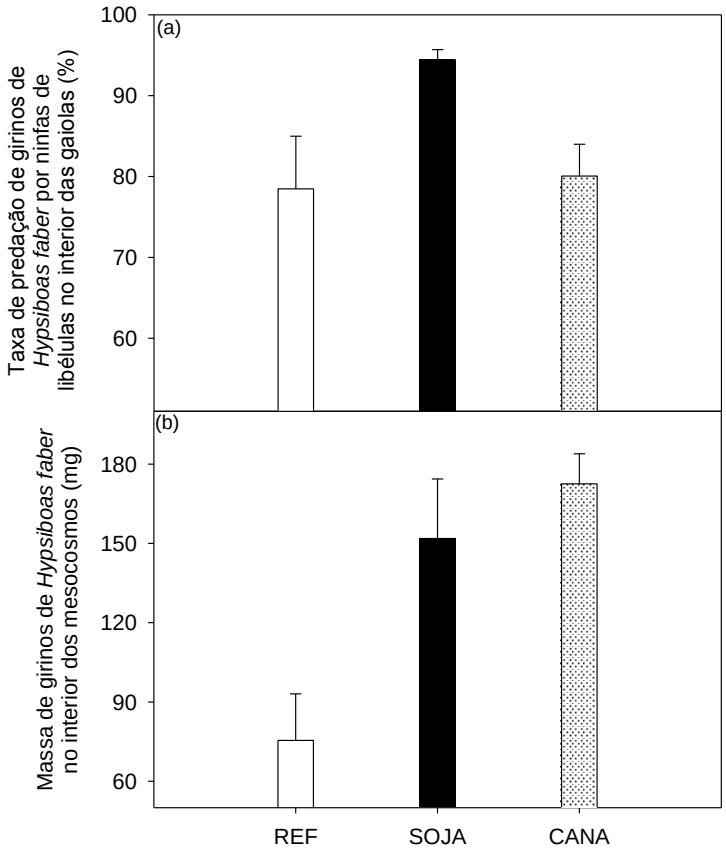


Figura 52. Variação nos valores de (a) taxa de predação de girinos de *Hypsiboas faber* por ninfas de libélulas dentro das gaiolas e (b) massa dos girinos dos girinos no interior dos mesocosmos com manipulação de ninfas de libélulas engaioladas em função das manipulações de nitrogênio e fósforo para os cenários: ambiente de referência (REF), cultura de cana-de-açúcar (CANA) e de soja (SOJA) ao final do Experimento 2. Barras representam média ± 1 erro-padrão. Note que a sequência demonstrada dos conjuntos de barras (referência → soja → cana) visa o aumento da concentração dos nutrientes referidos, seguindo o padrão de coloração utilizado para o Experimento 1.

Tabela 28. Resultados da ANOVA para os efeitos de manipulação de nutrientes na taxa de predação de girinos de *Hypsiboas faber* por ninfas de Odonata nas gaiolas.

Fator manipulado	**graus de liberdade**	**valor de F**	**valor de *p***
NUTRIENTES	2	12,88	0,002
Erro	9		

A análise de regressão nos permite avaliar estatisticamente a falta de efeito das taxas de predação sobre o crescimento em massa dos girinos no interior dos mesocosmos ($y = 0,45x + 95,07$; $R^2 < 0,0001$; $p = 0,776$) (Figura 53).

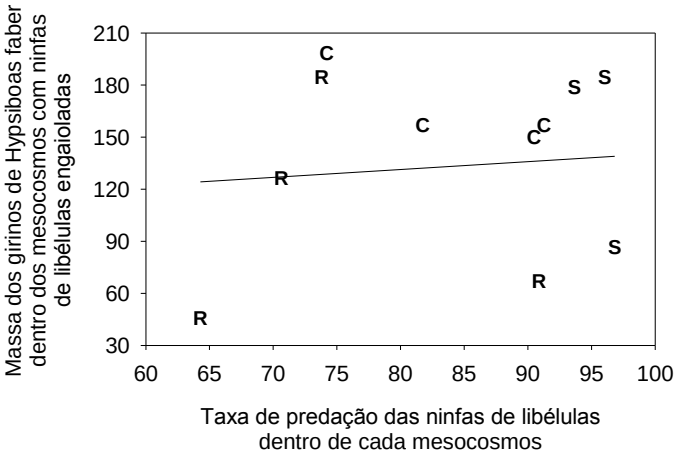


Figura 53. Correlação entre taxa de predação dos girinos de Hypsiboas faber por ninfas de libélulas dentro das gaiolas e massa dos girinos dentro dos mesocosmos em que haviam ninfas de libélulas engaioladas no Experimento 2. Letras representam tratamento com relação à manipulação de nutrientes: R = $NP_{referência}$; C = NP_{cana}; S = NP_{soja}.

DISCUSSÃO

A transformação da paisagem para o cultivo de alimentos, fibras e biocombustíveis é acompanhada de alterações biogeoquímicas dramáticas. Nesta dissertação, simulamos em mesocosmos aquáticos os padrões de fertilização esperados para a conversão de ambientes nativos de cerrado para lavoura das duas principais culturas de biocombustíveis do Brasil: soja e cana-de-açúcar. Num delineamento experimental de complexidade crescente de estrutura de comunidades, observamos que, em ambos os experimentos, a comunidade fitoplanctônica cresceu predominantemente em função do aumento direto da concentração de nitrogênio na água, praticamente independendo da concentração de fósforo, tanto na ausência quanto na presença de consumidores e predadores. Os consumidores tiveram crescimento relacionado ao de algas (indiretamente refletindo concentrações de nutrientes) em ambos os experimentos. A presença dos predadores, por sua vez, não teve efeito direto e indireto sobre o nível trófico imediatamente inferior e, consequentemente, não teve efeito indireto sobre o nível trófico dos produtores.

EFEITOS DIRETOS DA MANIPULAÇÃO DE NUTRIENTES SOBRE PRODUTORES

A adição de nutrientes teve efeito expressivo no crescimento da biomassa algal, refletida pela concentração de clorofila *a* em nossos mesocosmos, havendo resposta muito mais significativa à manipulação de nitrogênio e praticamente independendo da manipulação de fósforo. Na ausência de consumidores, a produtividade primária pareceu aumentar até um patamar, nos permitindo afirmar que a estabilização foi

alcançada. Quando da introdução dos consumidores (girinos) e dos predadores (ninfas de libélulas) aos mesocosmos, não observamos efeitos destes níveis tróficos no crescimento da comunidade fitoplanctônica, mantendo-se a tendência inicial de resposta forte à manipulação de nitrogênio em relação à de fósforo.

Esta ausência de resposta da biomassa de fitoplâncton à manipulação de fósforo pode ser interpretada à luz do status trófico de nossos sistemas experimentais. Mesmo nos tratamentos onde não houve adição de fósforo após o primeiro pulso inicial de nutrientes (simulando condições de ambiente de referência) as concentrações medidas de fósforo total estiveram em média a 0,9 mg/L e nunca menores que 0,04 mg/L. Portanto, o nosso cenário de referência já pode ser considerado eutrófico/hipertrófico, como podemos notar pelo sistema de classificação de Janus & Vollenweider (1981) e Nürnberg (1996) (Tabela 29). Em outras palavras, possivelmente mesmo nossas manipulações mais baixas de fósforo foram saturadas para o consumo de algas. Para nitrogênio total, os valores mínimos (0,2 mg/L) se encaixam em características de corpos d'água oligotróficos, os médios (0,66 mg/L) em características de mesotróficos e somente os máximos (2,0 mg/L) caracterizam hipertróficos. Com relação à clorofila *a*, cuja concentração final nos dois experimentos variou na faixa de 10 a 120 µg/L, mesocosmos com os valores mais baixos de biomassa algal podem ser classificados como mesotróficos (Janus & Vollenweider, 1981) a eutróficos (Nürnberg, 1996). Esses dados corroboram nossa premissa de que o nutriente fósforo estava disponível em quantidades e proporções mais do que suficientes e que o nitrogênio era o componente limitante para produtividade primária nos nossos sistemas experimentais.

Tabela 29. Relação entre características de corpos d'água doce e status trófico segundo Nürnberg (1996) e Janus & Vollenweider (1981). Note que apenas o primeiro deles apresenta critérios quantitativos de concentração de nitrogênio para tal classificação.

		Nürnberg (1996)		Janus & Vollenweider (1981)	
Status trófico	**NT (mg/L)**	**PT (mg/L)**	**clorofila *a* (µg/L)**	**PT (mg/L)**	**clorofila *a* (µg/L)**
Oligotrófico	< 0,35	< 0,01	< 3,5	0,008	4,2
Mesotrófico	0,35 a 0,65	0,01 a 0,03	3,5 a 9	0,027	16,1
Eutrófico	0,65 a 1,2	0,03 a 0,1	9 a 25	0,084	42,6
Hipertrófico	> 1,2	> 0,1	> 25	0,75 a 1,2	-

No nível dos produtores, isto é, a comunidade de algas, mostrou que, no nosso sistema-modelo, houve uma provável limitação direta por nitrogênio, independente da concentração manipulada de fósforo. Isso porque baixas concentrações relativas desse nutriente, refletindo condições de ambiente de referência (0N:0P, 0N:1P e 0N:14P) e de fertilizantes usados em culturas de soja (1N:0P; 1N:1P e 1N:14P), promoveram praticamente o mesmo baixo crescimento algal, representado pela concentração de clorofila *a*. Por outro lado, nos tratamentos em que o nitrogênio refletia aplicações de fertilizantes usados em culturas de cana-de-açúcar (14N:0P, 14N:1P e 14N:14P), o crescimento da comunidade fitoplanctônica foi o máximo observado, em termos de concentração de clorofila *a*, tanto no primeiro quanto no segundo experimento. A essas concentrações de nitrogênio (14N), a limitação há de ter ocorrido pelo fósforo.

Esses resultados são corroborados por diversos estudos com proporções de nitrogênio e fósforo e limitação diferenciada por nutrientes. Redfield (1958), em um dos trabalhos mais clássicos sobre limitação fitoplanctônica por nutrientes, sugeriu uma proporção para máximo crescimento algal de 16N:1P (conhecida como 'razão de Redfield'). Ainda que tenha feito uso de algas marinhas em seus estudos, a proporção de Redfield pode prever com bastante sucesso qual nutriente se torna limitante para o fitoplâncton em corpos d'água de água doce, mesmo que as mudanças da limitação

de um para o outro nutriente ocorram a diferentes proporções da de Redfield (Morris & Lewis, 1988; Elser *et al.*, 2009; Bergström, 2010). Em estudo mais recente, Bergström (2010) investigou que a razão entre nitrogênio inorgânico dissolvido (NID) e fósforo total (PT) previa 72% da variação na resposta do fitoplâncton a experimentos de enriquecimento por nutrientes em 106 lagos oligotróficos na Europa e na América do Norte. Neles, o fitoplâncton mudou de uma limitação por nitrogênio a NID:PT < 1,5 para uma limitação por fósforo para NID:PT > 3,4. No caso do perifíton, Schanz & Juon (1983) encontraram uma limitação por nitrogênio a proporções N:P < 10 e por fósforo, a proporções N:P > 20. Em córregos, Grimm & Fisher (1986a,b) sugeriram que o microfitobentos (algas e cianobactérias microscópicas bentônicas) de riachos de deserto contêm nitrogênio e fósforo em uma proporção atômica de 17N:1P, caracterizando sua taxa ótima de crescimento.

EFEITOS DIRETOS DE CONSUMIDORES SOBRE PRODUTORES

Quando da introdução dos girinos nos sistemas, não foi observada qualquer alteração negativa significativa na concentração de clorofila *a*, que só aumentou ao longo das semanas em ambos os experimentos, terminando 200% e 400% maior do que as concentrações iniciais no Experimento 1 e no Experimento 2, respectivamente, o que significa dizer que não houve queda na biomassa de algas em função direta da alimentação por parte dos consumidores.

Esse resultado vai de encontro ao que se é observado em maior parte da literatura, em que, de modo geral, a predação por girinos é potencialmente uma redutora da biomassa de algas (Brönmark *et al.*, 1991), regulando a produtividade primária e alterando a comunidade fitoplanctônica (Hoff *et al.*, 1999). Holomuzki (2011), por exemplo, que estudou a influência da incidência luminosa na predação por girinos de algas bênticas de riachos, observou uma queda significativa na massa seca

de algas na presença de *Rana clamitans*, seja com iluminação direta, seja com sombreamento 60%. Uma meta-análise de mais de 50 estudos em experimentos ecológicos manipulando larvas de anuros demonstrou que, em 85% dos casos analisados, acontece uma redução na taxa de crescimento de girinos em resposta à competição intraespecífica, sendo essa redução ainda mais evidente em experimentos com mesocosmos (Skelly & Kiesecker, 2001).

Entretanto, a inexistência de efeito dos girinos sobre a comunidade algal indica, a princípio, a possibilidade de os consumidores não serem limitados – em quantidade e em qualidade – pelos produtores (Loman, 2011), muito provavelmente pelo fato de os consumidores estarem em um número muito reduzido em relação ao montante de alimento disponível, não havendo competição intraespecífica. Isso faz ainda mais sentido sob o ponto de vista do status trófico dos nossos mesocosmos, que apresentaram parâmetros de corpos d'água mesotróficos e eutróficos com abundância de alimento (sob a forma de algas) para os consumidores. Um experimento manipulando diferentes densidades de girinos diretamente no campo teve como resultado efeitos intraespecíficos de competição em *Rana arvalis* acondicionadas em altas densidades (Loman, 1997).

Estudos do tipo são muito comuns em raniculturas. Em criadouros, o aumento da densidade de manutenção de indivíduos em um mesmo espaço leva a uma escassez de recursos e, consequentemente, ao fortalecimento das interações competitivas entre os organismos ali presentes (Wilbur & Collins, 1973; 1977). Flores-Nava & Vera-Muñoz (1999) perceberam ausência de competição em containers plásticos de 6 L estocados com densidades de 0,5 a 2,0 girinos de *Rana catesbeiana* por litro. Interações competitivas, com prejuízos ao crescimento em massa e à metamorfose, só foram observadas nas densidades 4,0 e 8,0 girinos por litro. O consenso geral é de que, para *Rana catesbeiana* (rã-touro), a densidade máxima permitida é de 0,5 girinos por litro (Lopes-Lima & Agostinho, 1988; 1992; Flores-Nava, 1997).

Em nossos experimentos, a densidade inicial de estocagem dos girinos era de 0,5 girinos por litro para *Physalaemus cuvieri* e 0,32 girinos por litro para *Hypsiboas faber*. Essa proporção girino:volume ficou ainda menor ao longo do experimento, devido às altas taxas de mortalidade que observamos. Na meta-análise realizada por Skelly & Kiesecker (2001), as densidades de estocagem utilizadas em experimentos em mesocosmos de 0,3 ± 0,1 girinos/L, em laboratório, 43,8 ± 19 girinos/L e, em campo, 1,4 ± 0,3 girinos/L, são consideravelmente maiores do que as conduzidas em nossos experimentos. Para mesocosmos a densidade é até similar, mas somente aos valores iniciais de densidade de manutenção. Considerando uma taxa de mortalidade linear ao longo dos experimentos (Alford *et al.*, 1999), podemos dizer que, muito provavelmente, logo na segunda semana de experimento, as densidades de estocagem dos girinos que estudamos já estavam abaixo das observadas na meta-análise de Skelly & Kiesecker (2001), corroborando nossa hipótese de que não houve competição nos nossos mesocosmos.

Ademais, visto que essas espécies nativas do Brasil são muito menores (girinos *Physalaemus cuvieri* de até 1 cm e 84 mg e de *Hypsiboas faber* atingindo 3 cm e 240 mg) e demandam, portanto, para crescimento, um total de alimento reduzido em relação aos girinos de *Rana catesbeiana* (cujo desenvolvimento larval pode durar até 2 anos, com girinos atingindo 15cm e 10g de massa), acreditamos que realmente não tenha havido competição intraespecífica para ambas as espécies estudadas nos mesocosmos.

Ainda, podemos nos basear em respostas espécie-específicas para o consumo de algas por girinos. Kupferberg (1997a), por exemplo, observou queda na produtividade primária em 44% na presença de *Rana boylii*, mas não houve efeito nessa variável na presença de *Hyla regilla*, o que nos leva a crer que, de fato, as espécies de interesse com que trabalhamos são capazes de se alimentarem sem esgotar os recursos por, possivelmente, apresentarem menores taxas de filtração de água para alimentação.

O que pode ter ocorrido, adicionalmente, seria um incremento no montante de nutrientes disponíveis para as algas resultante da ciclagem interna e suspensão constante de nitrogênio e fósforo para a coluna d'água pela atividade de alimentação e movimentação dos girinos nos tanques (Holomuzki, 2011), configurando um efeito indireto dos consumidores nos produtores. Dessa forma, a atividade dos consumidores só teria provocado um aumento ainda maior no crescimento da biomassa fitoplanctônica, embora a análise desse potencial de ciclagem de nutrientes por parte dos girinos não tenha sido realizada.

Devemos considerar também que analisamos somente o componente fitoplâncton em coluna d'água da comunidade de produtores, e não os organismos do perifíton. Espécies diferentes podem causar diferentes impactos na comunidade perifítica, como observado por Kupferberg (1997a), que notou um aumento em 10% na produtividade primária específica do perifíton na presença de *Rana boylii* e um decréscimo de 18% na presença de *Hyla regilla*. Rossa-Feres *et al.* (2004) de fato percebeu que cerca de 60% do conteúdo intestinal de *Physalaemus cuvieri* era de algas perifíticas, enquanto somente 30% era de algas planctônicas. Proporções similares foram descobertas para girinos de outras cinco espécies de anfíbios: *Physalaemus centralis*, *Physalaemus nattereri*, *Physalaemus fuscomaculatus*, *Scinax fuscovarius* e *Scinax similis*. Posto isso, a produtividade primária do perifíton pode ter atuado como uma variável indireta adicional para os nossos experimentos, de modo a constituir um recurso potencialmente consumido, talvez até limitante, mas não quantificado.

Finalmente, nosso delineamento experimental foi sub-ótimo, de modo que não dedicamos mesocosmos exclusivamente para o crescimento de produtores sem introdução de consumidores. Dessa forma, não nos permitimos comparar efetivamente as taxas de crescimento algal na ausência e na presença dos girinos, comparamos somente o crescimento algal no período antecedente e sucessor à introdução dos girinos. Nossas comparações foram baseadas em um curto período em que a

comunidade algal estava se estabelecendo. Entretanto, nosso controle experimental teria capturado um efeito dos consumidores se este tivesse sido realmente expressivo.

EFEITOS DIRETOS E INDIRETOS DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES SOBRE CONSUMIDORES

A manipulação de nutrientes teve efeitos significativos sobre a performance das larvas de anuros. Em ambos os experimentos a mortalidade observada foi consideravelmente alta: a mortalidade média de *Physalaemus cuvieri* variou entre 34 a 83% no primeiro experimento e independeu da concentração de nitrogênio e da interação entre as concentrações de nitrogênio e fósforo. Houve uma tendência marginalmente significativa (p = 0,088) de maior mortalidade em tratamentos com alta concentração de fósforo. Por sua vez, a mortalidade média de *Hypsiboas faber* variou entre 40 e 79% no segundo experimento mesmo na ausência de predadores. Essa mortalidade foi significativamente influenciada pela manipulação de nutrientes, sendo que, em concordância com o experimento anterior, o tratamento de maior mortalidade foi o de padrão de fertilização de soja – por sua vez o mais rico em fósforo.

Essas taxas de mortalidade de fundo (i.e., acima de qualquer manipulação experimental adicional) em experimento de mesocosmos são na nossa experiência bastante altas (e.g., Schiesari *et al.*, 2006). Não sabemos em que momento ocorreu essa mortalidade, mas é certo que não ocorreu por metamorfose e posterior afogamento dos metamorfos, uma vez que os estágios máximos de desenvolvimento para *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas faber* foram respectivamente, 38 e 28 (Gosner, 1960). Na escala de Gosner, a emergência das patas dianteiras ocorre somente no estágio 42 e a metamorfose completa no estágio 46. Também parece improvável que tenha havido escassez de alimento, uma vez que os mesocosmos podem ser classificados como mesotróficos a eutróficos, e a comunidade fitoplanctônica não teve

crescimento reduzido em função da pastagem pelos girinos. Finalmente, fertilizantes podem ser tóxicos e, em princípio, poderiam ter efeito negativo direto sobre larvas de anuros. Ilha (2010) testou os efeitos letais e subletais de nitrato, nitrito e amônia sobre larvas de anfíbios e observou que a mortalidade de *Physalemus cuvieri* e *Hypsiboas faber* foi igual entre controle e concentrações de nitrato de até 10 mg/L; por sua vez, a mortalidade de *Physalaemus cuvieri* e de *Hypsiboas faber* quanto expostas à amônia foram iguais entre controle e até 10 e 2,5 mg/L, respectivamente. Estas concentrações são, no entanto, menores que as concentrações máximas medidas nos nossos experimentos (2,05 mg/L para nitrogênio total). Nitrito causou mortalidade parcial a partir de 2,5 mg/L para *Physalaemus cuvieri* e a partir de 10 mg/L para *Hypsiboas faber*, mas é improvável que o nitrito tenha atingido concentrações tão altas em nossos mesocosmos, uma vez que em condições aeróbicas o nitrito é rapidamente convertido para nitrato; nos nossos experimentos a concentração média de oxigênio dissolvido nunca esteve abaixo de 5,5 mg/L. Finalmente, a mortalidade foi maior em tratamentos com alta concentração de fósforo e não de nitrogênio, e a toxicidade do fosfato de um modo geral em geral, e sobre larvas de anuros em particular, é baixíssima em bioensaios padronizados (Ilha e Schiesari, obs. pess.). Cloreto de potássio (KCl), que adicionamos como forma de igualar as concentrações manipuladas para todos os tanques tendo como base a concentração de potássio do di-hidrogeno-fosfato de potássio (KH_2PO_4), possui toxicidade crônica e aguda somente em concentrações maiores que 100 mg/L, não sendo perigoso para organismos de ecossistemas aquáticos em geral (UNEP, 2001). Por estes motivos, não nos parece provável que a mortalidade de *Physalaemus cuvieri* e de *Hypsiboas faber* tenha sido causada por uma toxicidade direta dos sais manipulados.

Portanto, não sabemos ao certo as razões da alta mortalidade de fundo destas espécies, mas nosso laboratório teve repetidas experiências de alta mortalidade para *Physalaemus cuvieri,* e em menor grau *Hypsiboas faber* mesmo em condições supostamente benignas em laboratório (Ilha, 2010; Fekete, 2013).

Por sua vez, a mortalidade de girinos poderia ser um efeito indireto dos nutrientes via alterações na composição da comunidade de produtores. Diversos estudos realizados em laboratório, mesocosmos e campo demonstram que baixas proporções N:P promovem mudanças na comunidade fitoplanctônica, favorecendo o crescimento da população de cianobactérias fixadoras de nitrogênio e diatomáceas (Bulgakov & Bennett, 1999; Levine & Schindler, 1999; Smith & Bennett, 1999). Quando há disponibilidade de nitrogênio, células fitoplanctônicas eucarióticas tendem a se tornar dominantes, uma vez que as cianobactérias têm baixa habilidade competitiva (Hyenstrand, Blomqvist & Pettersson, 1998). Na escassez relativa desse nutriente, no entanto, cianobactérias e diatomáceas sobressaem porque diatomáceas fixam montantes consideráveis de nitrogênio diretamente da atmosfera; diatomáceas seguem a mesma tendência por terem associação endossimbiótica com algumas cianobactérias (Bulgakov & Levich, 1999; Smith & Bennett, 1999). Cianobactérias são geralmente impalatáveis e, às vezes, tóxicas e até mesmo muito tóxicas pela produção de cianotoxinas, entre eles peptideos cíclicos como microcistinas e nodularinas, e alcalóides como as anatoxinas (Savage, 1952; Kupferberg *et al.*, 1994; Who, 1999; Waringer-Löschenkohl & Schargerl, 2001).

A possibilidade da presença desses componentes impalatáveis e até tóxicos da comunidade de produtores nos permite explicar, com certa segurança, as altas taxas de mortalidade encontradas em ambos os experimentos, inclusive nos tratamentos considerados “controle” ($N_{REFERÊNCIA}$:$P_{REFERÊNCIA}$). Baixas proporções N:P, 5N:1P (Bulgakov & Levich, 1999), 2-5N:1P (Levich, 1996) e 6N:1P (Havens *et al.*, 2003), favorecem o desenvolvimento de blooms de cianobactérias em comparação à proporção 16N:1P de algas eucarióticas (Schreurs, 1992). Essas proporções se aproximam das proporções 1N:14P e 1N:1P dos nossos tratamentos de soja e ambiente de referência, respectivamente. Isso faz sentido especialmente quando analisamos a mortalidade diferencial de *Hypsiboas faber* nos tratamentos com

manipulação máxima de fósforo em concentrações de fertilizantes utilizadas em culturas de soja (P_{SOJA}), uma vez que concentrações maiores de fósforo relativas às de nitrogênio favorecem a formação de uma comunidade fitoplantônica com toxicidade aumentada.

Visto que não realizamos a análise hidrobiológica da comunidade fitoplanctônica, não podemos afirmar com certeza que isso tenha ocorrido, mas a literatura nos dá fortes embasamentos para conjecturarmos a ocorrência desse processo.

A manipulação de nutrientes também teve efeitos significativos sobre a performance das larvas de anuros conforme indicados por ganho de massa e estágio final de desenvolvimento. No primeiro experimento, o crescimento de *Physalaemus cuvieri* foi significa e negativamente influenciado pela concentração de fósforo. Altas concentrações de fósforo levaram a menores ganhos de massa que baixas concentrações de fósforo. Também houve uma tendência para um efeito de fósforo sobre o desenvolvimento. No segundo experimento, o crescimento de *Hypsiboas faber* foi significativamente influenciado por cenário de fertilização; cenários de cana-de-açúcar, com muito nitrogênio e pouco fósforo, levaram a ganhos de massa 30% maiores que cenários de soja, com pouco nitrogênio e muito fósforo. Ambos os cenários de fertilização levaram a maiores ganhos de massa que o controle. Esses resultados podem ter sido causados por alterações na estrutura da comunidade fitoplanctônica, por diferenciação da qualidade nutricional entre os tratamentos e por respostas espécie-específicas particulares para cada uma das espécies que estudamos.

Apesar de uma série de estudos observarem comportamento de alimentação oofágica, carnívora e necrófaga (Savage, 1952; Wassersug, 1975; Duellman & Trueb, 1986; Petranka & Kennedy, 1999; Alford, 1999; Hoff *et al.*, 1999; Altig *et al.*, 2007), larvas de anuros são tradicionalmente consideradas micrófagas herbívoras e detritívoras, se alimentando por suspensão (Duellman & Trueb, 1986; Altig *et al.*, 2007)

e tipicamente sem seletividade (Farlowe, 1928; Heyer, 1973; Seale, 1980; Seale & Beckvar, 1980; Kupferberg, 1997b), exceto em algumas determinadas situações (Kupferberg *et al.*, 1994).

Uma vez que os girinos não provocaram alteração no crescimento da biomassa fitoplanctônica e que, por outro lado, tiveram crescimento dependente indiretamente da manipulação de nutrientes, acreditamos que não houve limitação na quantidade de alimento, mas sim na qualidade deste.

A redução nas proporções N:P teriam causado, como abordamos anteriormente, uma mudança na estrutura da comunidade fitoplanctônica dirigida a um favorecimento na proliferação de diatomáceas e cianobactérias, que são mais impalatáveis que as algas verdes (Savage, 1952; Kupferberg *et al.*, 1994; Waringer-Löschenkohl & Schargerl, 2001). Dessa forma, nos mesocosmos em que a manipulação de nitrogênio relativa à de fósforo foi baixa, a quantidade de alimento com alta qualidade nutricional era baixa, levando às menores taxas de crescimento observadas em nossos experimentos. Schiesari (2006), estudando o efeito da densidade da cobertura de dossel na performance de girinos de *Rana sylvatica* e de *Rana pipiens*, encontrou maiores taxas de crescimento quando os alimentos tinham alta qualidade nutricional, ou seja, baixas proporções C:N, havendo, contudo, outros fatores intereferentes, como a temperatura e o oxigênio dissolvido nas poças analisadas.

Entretanto, o aumento de crescimento em altas proporções N:P para *Physalaemus cuvieri* não foi tão expressivo como encontrado para *Hypsiboas faber*. Considerando que em nenhum dos experimentos houve limitação dos consumidores por parte dos recursos, podemos explicar a diferença de crescimento em massa observada de *Physalaemus cuvieri* em relação a *Hypsiboas faber* por respostas espécie-específicas. Ou seja, acreditamos que os indivíduos de *Physalaemus cuvieri* estudados só não cresceram tão mais por estarem limitados fisiologicamente. Quer dizer, é provável que, em média, tenham chegado perto de atingir sua massa máxima pré-metamorfose, uma vez que muitos indivíduos já estavam com os apêndices

locomotores traseiros completamente formados (estágio 38; Gosner, 1960). Larvas de *Rana clamitans*, por exemplo, cessam a alimentação no estágio 42 de Gosner (Jenssen, 1967). Como abordado na seção 'Materiais e Métodos', girinos de *Physalaemus cuvieri* levam aproximadamente de 40 a 50 dias para a metamorfose completa. Tendo o experimento durado três semanas (21 dias) após a introdução dos girinos e quatro semanas (28 dias) após a fertilização, os organismos em teste já tinham passado cerca de 70% do seu período de desenvolvimento larval, estando relativamente próximos de sofrerem metamorfose, estágio próximo ao auge de massa. Isso também explica a ausência de resposta significa do estágio final de desenvolvimento à manipulação de nutrientes, visto que, em média, todos eles estavam se aproximando da metamorfose, havendo pouca heterogeneidade de estágios de desenvolvimento.

Ainda, como anteriormente mencionado, é possível que eles tenham se alimentado predominantemente do perifíton, que, por não termos sua produtividade primária quantificada, podemos elucubrar que este sim, estaria limitante, limitando, por sua vez, o crescimento dos girinos. O mesmo pode ter acontecido para *Hypsiboas faber*, mas estes não estavam limitados fisiologicamente. Em tanques com maior crescimento da comunidade de algas, os girinos tinham maior disponibilidade de alimento para ser filtrado – controle bottom-up. Esse processo, ocorrendo continuamente, favoreceu um maior crescimento destes em relação aos tratamentos em que o crescimento dos produtores foi baixo. Não acreditamos ter havido limitações fisiológicas para *Hypsiboas faber*, já que este apresenta maior tempo para metamorfose (8 meses), tendo transcorrido, durante o experimento (três semanas) apenas 9% do seu desenvolvimento larval. Indivíduos de *Hypsiboas faber* também adquirem maiores massas tanto quando girinos quanto como adultos. O que significa que os girinos que cresceram pouco poderiam ter crescido mais se não estivessem limitados pelos recursos, caracterizando uma resposta espécie-específica em relação à nutrição de *Physalaemus cuvieri*.

O ambiente não tão favorável para o crescimento dos girinos, resultando da proliferação de algas tóxicas, pode explicar o maior estágio de desenvolvimento, ainda que a diferença seja pequena, no tratamento simulando concentrações de nutrientes aplicados nas culturas de soja (NP_{SOJA}), uma vez que condições de stress, pelo menos à dessecação, parecem promover um desenvolvimento, à metamorfose, mais acelerado mesmo a tamanhos menores (Denver, 1997; Denver *et al.*, 1998).

Complementarmente, existe a possibilidade de que os girinos sobreviventes tenham se alimentado dos que foram morrendo ao longo de ambos os experimentos e que nós não retiramos pela impossibilidade visual de localizá-los, configurando outra fonte de recurso alimentar. O que é corroborado por Schiesari *et al*. (2009) que, estudando os níveis tróficos aos quais as larvas de anuros podem pertencer, observaram dieta oportunista em girinos morfologicamente generalistas. Alguns de seus resultados, por exemplo, sugerem que, para girinos de *Rana clamitans* e de *Rana catesbeiana*, os produtores primários são, de fato, secundariamente importantes para a nutrição, o que traz implicações sérias para o delineamento e a interpretação de dados em experimentos ecológicos envolvendo girinos, tendo sido por nós consideradas no desenvolvimento desse projeto.

Muito pouco se sabe sobre o verdadeiro status trófico das larvas de anuros (Altig *et al.*, 2007). Contudo, nossos resultados nos permitiram atribuir a estas um caráter essencialmente herbívoro, uma vez que a resposta ao crescimento da biomassa algal, reflexo da manipulação de nutrientes, foi perceptível e expressiva em ambos os experimentos.

EFEITOS DIRETOS DE PREDADORES SOBRE CONSUMIDORES

Contrariando nossas expectativas, a performance dos girinos não respondeu de forma diferente para a manipulação de estrutura de comunidade. Dentro de cada

grupo de manipulação de nutrientes, girinos dos tratamentos em que ninfas de libélulas não compunham a teia alimentar tiveram o mesmo crescimento em massa e atingiram o mesmo estágio de desenvolvimento dos girinos acompanhados pelos predadores, estando eles engaiolados ou soltos. O mesmo aconteceu para a taxa de mortalidade de girinos que, mantidas as manipulações de nutrientes, não respondeu à presença das ninfas de libélulas, nem das engaioladas nem das soltas.

Quando presentes no corpo d'água, os predadores tendem a induzir mudanças nas presas, geralmente com custos em termos de redução das taxas de crescimento e desenvolvimento (Skelly & Werner, 1990; Skelly, 1992). Como em nenhum dos tratamentos para estrutura de comunidade houve resposta por parte dos girinos de *Hypsiboas faber* à predação direta das ninfas de libélulas soltas e, indiretamente, à pista de predação das ninfas de Odonata engaioladas, podemos dizer que nem as ninfas de Odonata soltas se alimentaram efetivamente dos girinos dentro dos mesocosmos, nem as ninfas engaioladas se alimentaram suficientemente para criar uma pista química "ameaçadora" para os girinos de fora das gaiolas.

Estudos de predação – e pista de predação – com ninfas de Odonata do gênero *Anax* (família Aeshnidae) geralmente introduzem indivíduos de cerca de 6-7 cm de comprimento em aquários de 5-10 L contendo cerca de 10 girinos (Skelly & Werner, 1990; Relyea & Werner, 1999). No estudo conduzido com *Bufo americanus*, todas as ninfas de *Anax* ingeriram 100% dos girinos que lhes foram dados de alimento (Skelly & Werner, 1990), o que não aconteceu em nenhum dos nossos mesocosmos dos tratamentos 'girinos + predadores engaiolados'.

Peacor *et al.* (2007) realizaram estudos em mesocosmos (300 L), mas mantiveram o gênero estudado de Odonata, *Anax*. Nossos exemplares coletados e aplicados ao experimento – família Libellulidae – não superavam o tamanho de 3 cm, nos fazendo acreditar que eram muito pequenos em relação ao tamanho dos girinos ofertados, uma vez que ninfas de libélulas somente atacarm se as presas estiverem dentro de certos limites de tamanho, relacionados ao próprio tamanho corporal

(Pritchard, 1965). Desse modo, não houve 100% de predação em nenhuma das gaiolas (máximo 96% com média 84%), e só houve 100% de predação em um dos 12 mesocosmos cujo tratamento de estrutura de comunidade era ‘girinos + predadores soltos’.

Baixas taxas de sucesso na captura de presas por ninfas de libélulas são frequentes, podendo ser até menores que 50% (Richards & Bull, 1990a,b; Chovanec, 1992). Entretanto, essa diferença entre efetividade de predação entre famílias de Odonata já foi observada e é corroborada por Gascon (1992), que percebeu uma maior eficiência de predação de Aeshnidae em relação a Libellulidae, quando da predação de *Osteocephalus taurinus*, *Phyllomedusa tomopterna* e *Epipedobates femoralis*.

Atribuímos nossos resultados, então, a uma possível taxa de predação diferenciada dos exemplares da família que nós estudamos (Libellulidae) em relação aos da família Aeshnidae, cujos representantes foram usados como base para determinarmos a quantidade de predadores engaiolados e soltos nos mesocosmos, associada ao grande volume de água trabalhado dentro dos nossos mesocosmos.

Sendo assim, a pista química de predação, se produzida, pode ter sido muito fraca, em função da baixa taxa de captura por parte dos predadores. Caso ela tenha sido substancial, pode ter ficado muito diluída, devido ao grande volume dos nossos mesocosmos se comparados aos volumes utilizados em grande parte dos experimentos de predação com girinos e ninfas de libélulas. Ainda, pode ser que a pista de predação tenha sido perceptível e tenha atingido os girinos, porém, sem lhes causar alteração comportamental, sem consequente resposta nas variáveis analisadas (crescimento em massa, taxa de mortalidade e desenvolvimento).

A manipulação de nutrientes, por sua vez, pode ter amortecido contrastes no comportamento – e consequente influência no ganho de massa – dos girinos de forma a manter a concentração de biomassa algal constantemente alta. Essa produtividade primária elevada o suficiente pode ter garantido a nutrição dos girinos igualmente entre

todos os tratamentos de estrutura de comunidade, mesmo com alteração de atividade para alimentação.

Não fazia parte da nossa relação de variáveis analisadas a observação da taxa atividade dos girinos nos mesocosmos. Portanto, não é possível saber se houve ou não resposta comportamental por parte destes à presença dos predadores, tanto soltos quanto engaiolados, o que configura um outro fator para a interpretação dos nossos dados. De qualquer forma, as variáveis-resposta que nos propusemos medir ao final do experimento pareceram ser muito mais dependentes da manipulação de nutrientes do que de estrutura de comunidade.

EFEITOS INDIRETOS DE PREDADORES SOBRE PRODUTORES

A presença das ninfas de libélulas, estando engaioladas ou soltas, não resultou em qualquer alteração na performance dos girinos, como abordado há pouco. Uma vez que esses consumidores também não tiveram efeito sobre a comunidade de produtores, podemos afirmar que não houve indício de efeito, ainda que indireto, dos predadores sobre produtores – ausência de controle top-down.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Girinos e predadores de girinos provaram formar um ótimo sistema-modelo para estudos de ecologia comportamental e plasticidade fenotípica ante o risco de predação (Petranka *et al.*, 1987; Kats *et al.*, 1988; Lawler, 1989)

Como pesquisas desse tipo (com representantes da fauna nacional e concentrações manipuladas de nutrientes de culturas brasileiras) em mesocosmos são praticamente pioneiros, muitas das experiências obtidas durante a execução dos

experimentos podem ser úteis e importantes para o aprimoramento do sistema-modelo.

Nossos resultados nos permitiram atingir nossos objetivos. Entretanto, para que sejam alcançados em estudos futuros juntamente com a elucidação dos mecanismos de transferência de energia e proporções estequiométricas de nutrientes pela cadeia alimentar aquática, aconselhamos que equipes de pesquisadores acessem:

- análises mais detalhadas da comunidade fitoplanctônica, não somente em termos de biomassa (composição, diversidade, riqueza de espécies);

- análises do perifíton (biomassa, composição, diversidade, riqueza de espécies), visto que girinos são potenciais raspadores;

- análise da comunidade zooplanctônica (biovolume, composição, diversidade, riqueza de espécies), outra possível fonte de alimento dos girinos;

- análise do conteúdo intestinal dos girinos, para quantificação de quais os principais recursos alimentares;

E, para que demais fatores de confusão sejam minimizados, recomendamos:

- retirada da coluna inteira de água para alíquota, para que seja capturada toda a comunidade fito/zooplanctônica;

- análises de nutrientes (proporções N:P) não só da água, como também do fito/zooplâncton/perifíton, dos girinos e das ninfas de Odonata;

- conduzir experimentos de 24h, em laboratório, iniciados juntamente aos experimentos em mesocosmos, para avaliar a mortalidade na fase inicial de experimentos (‘over-night mortality’), em que fase ocorre e por qual motivo;

- modelar o experimento de modo que haja também réplicas temporais a serem desmontadas ao longo do experimento, permitindo avaliar temporalmente o incremento nas variáveis medidas dos girinos: massa, mortalidade e estágio de desenvolvimento;

- conduzir experimentos-piloto de efetividade de predação de girinos por ninfas de Odonata, de modo que se consiga estudar os efeitos comportamentais da presença destas na fisiologia dos girinos.

CONCLUSÕES

Dadas as nossas condições de trabalho, as concentrações manipuladas de nitrogênio e de fósforo e as composições de estrutura de comunidade que estudamos, podemos concluir que:

1. O nutriente limitante para produtividade primária do fitoplâncton foi o nitrogênio.
2. Diminuições na proporção N:P foram fortemente correlacionados a maiores taxas de mortalidade e menor desenvolvimento ontogenético.
3. Altas proporções N:P levaram a um crescimento diferenciado de girinos de *Hypsiboas faber*, o que foi observado em menor escala para *Physalaemus cuvieri* em função de respostas espécie-específicas distintas à alimentação.
4. As manipulações de nutrientes pareceram determinar muito mais significativamente as interações ecológicas do que as manipulações de estrutura de comunidade, tendo os predadores efeitos não-perceptíveis sobre os consumidores, ou seja, o controle da cadeia alimentar aparentou ser mais pelos recursos (bottom-up) do que pelos predadores (top-down).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, R.A. 1999. Ecology: resource use, competition, and predation. p. 240 – 278. In: McDIARMID, R.W. & ALTIG, R. (Eds.). Tadpoles: the biology of anuran larvae. Chicago, The University Chicago Press, 444 p.

ALTIG, R.; WHILES, M.R. & TAYLOR, C.L. 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudies and imperiled group of consumers in freshwater habitats. Freshwater Biology (52): 386-395.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION & WATER ENVIRONMENT FEDERATION. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

ANDERSON, D.M.; GLIBERT, P.M. & BURKHOLDER, J.M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. Estuaries, 25(4): 704-726.

ANJOS-SANTOS, D. & COSTA, J.M. 2006. A revised checklist of Odonata (Insecta) from Marambaia, Rio de Janeiro, Brazil with eight new records. Zootaxa 1300: 37-50.

BARRETO, L. & ANDRADE, G.V. 1995. Aspects of the reproductive biology of Physalaemus cuvieri (Anura:Leptodactylidae) in northeastern Brazil. Amphibia-Reptilia. v. 16. n. 1. pp. 67-76(10).

BEGON, M.; TOWNSEND, C.R..; HARPER, J.L.. Ecology: from individuals to ecosystems. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 738 p.

BELGRANO, A.; SCHARLER, U.M.; DUNNE, J. & ULANOWICZ, R.E. 2010. Aquatic food webs: an ecosystem approach. Oxford University Press Inc., NY. 262 p. cap. 1 (pp. 7-18).

BENNETT, E.M.; CARPENTER, S.R. & CARACO, N.F. 2001. Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: a global perspective. BioScience, 51(3): 227-234.

BERGSTRÖM, A.K. & JANSSON, M. 2006. Atmospheric nitrogen deposition hás caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. Global Change Biology, 12, 635-643.

BERGSTRÖM, A.-K. 2010. The use of TN:TP and DIN:TP ratios as indicators for phytoplankston limitation in oligotrophic lakes affected by N deposition. Aquatic Sciences, 72: 277-281.

BERGSTRÖM, A.K.; BLOMQVIST, P. & JANSSON, M. 2005. Effects of atmospheric nitrogen deposition on nutrient limitation and phytoplankton biomass in unproductive Swedish lakes. Limnology and Oceanography, 50, 987-994.

BONETTO, C.A.; ZALOCAR, Y. & LANCHELLE, H.G. 1984. A limnological study of an oxbow-lake covered by Eichhornia crassipes in the Paraná River. Internationale Verinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 22: 1315-1318.

BOONE, M.D. & JAMES, S.M. 2005. Use of aquatic and terrestrial mesocosmos in ecotoxicology. Applied Herpetology, 2, 231-57.

BOONE, M.D. & SEMLITSCH, R.D. 2009. Amphibian Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques. Edited by Kenneth Dodd Jr. Oxford University Press Inc., NY. 556 p. cap. 6 (pp. 87-104).

BRANDÃO, A.S.P.; REZENDE, G.C. & MARQUES, R.W.C. 2005. Crescimento agrícola no período 1999-2004, explosão da área plantada com soja e meio ambiente no Brasil. IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Rio de Janeiro, 22 p.

BRÖNMARK, C.; RUNDLE, S.D. & ERLANDSSON, A. 1991. Interactions between freshwater snails and tadpoles: competition and facilitation. Oecologia, 87: 8-18.

BULGAKOV, N.G. & LEVICH, A.P. 1999. The nitrogen:phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. Archiv für Hydrobikologie, 146: 3-22.

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORRELL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N. & SMITH, V.H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecological Applications, 8, 559-568.

CARPENTER, S.R.; KITCHELL, J.F.; HODGSON, J.R.; COCHRAN, P.A.; ELSER, J.J.; ELSER, M.M.; LODGE, D.M.; KRETCHMER, C. & HE, X. 1987. Regulation of lake primary production by food web structure. Ecology, 68: 1863-1876.

CARVALHO, A.L. 2007. Recomendações para a coleta, criação e colecionamento de larvas de Odonata. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v. 65, n.1, p. 3-15.

CAVALHEIRO, F.; BALLESTER, M.V.; KRUSHE, A.V.; MELO, S.A.; WAETCHER, J.L.; DA SILVA, C.J.; D'ARIENZO, M.C.; SUZUKI, M.S.; BOZELLI, R.L.; JESUS, T.P. & SANTOS, J.E. 1990. Propostas preliminares referentes ao plano de zoneamento e manejo da Estação Ecológica de Jataí. Acta Limnologica Brasiliensia 1990(3): 951-968.

CAVARZERE, V.; MORAES, G.P.; SILVEIRA, L.F. Boracéia Biological Station: na ornithological review. Pap. Avulsos Zool. (São Paulo), São Paulo, v. 50, n. 13, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0031-10492010001300001&lng=en&nrm=iso

CHAPIN, F.S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 11: 233-260.

CHOVANEC, A. 1992. The influence of tadpole swimming behavior on predation by dragonfly nymphs. Amphib.-Reptil. (13): 341-349.

CORBET, P.S. 1963. A biology of dragonflies. Quadrangle Books, Inc., Chicago. 247 p.

CTC (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA). 2008. Relatório do Centro de Tecnologia Canavieira. Piracicaba, São Paulo.

CUSTÓDIO FILHO, A. 1989. Flora da Estação Biológica de Boracéia: Listagem de espécies. Revista do Instituto Florestal, 1:161-199. → fazer citação de citação

DALZOCHIO, M.S.; COSTA, J.N.; UCHOA, M.A. Diverisity of Odonata (Insecta) in lotic systems from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rev. Bras. Entomol., São Paulo, v. 55, n. 1, Mar. 2011. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262011000100014&lng=en&nrm=iso.

DARCHAMBEAU, F.; FAERØVIG, P.J. & HESSEN, D.O. 2003. How Daphnia copes with excess carbon in its food. Oecologia 136: 336-346. Declines and Habitat Acidification. J. Herp. 26: 349-352.

DeMOTT, W.R. 2003. Implications of elemental deficits for zooplankton growth. Hydrobiologia 491:177-184.

DeMOTT, W.R.; GULATI, R.D. & SIEWERSTEN, K. 1998. Effects of phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of Daphnia magna. Limnology and Oceanography 43: 1147-1161.

DENVER, R.T. 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotrophin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptative phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. Hormones and Behavior (31): 169-179.

DENVER, R.T.; MIRHADI, N. & PHILLIPS, M. 1998. Adaptative plasticity in amphibian metamorphosis: response of Scaphiops hammondii tadpoles to habitat dessication. Ecology 79(6): 1859 – 1872.

DRAKE, J.A.; HUXEL, G.R. & HEWITT, C.L. 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. Ecology, 77, 670-7.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw Hill Book Co, New York, NY.

DUNSON, W.A.; WYMAN, R.L. & CORBETT, E.S. 1992. A Symposium on Amphibian

ELSER, J.J. & URABE, J. 1999. The stoichiometry of consumer-driven nutrient cycling: theory, observations and consequences. Ecology 80: 735-751.

ELSER, J.J.; ANDERSEN, T.; BARON, J.S.; BERGSTRÖM, A.-K., JANSSON, M. & KYLE, M. 2009. Shifts in lake N:P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. Science, 326: 835-837.

ELSER, J.J.; FAGAN, W.F.; DENNO, R.F.; DOBBERFUHL, D.R.; FOLARIN, A.; HUBERTY, A.; INTERLANDI, S.; KILHAM, S.S.; McCAULEY, E.; SCHULZ, K.L.; SIEMANN, E.H. & STERNER, R.W. 2000. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. Nature 408-578-580.

ELSER, J.J.; MARZOLF, E.R. & GOLDMAN, C.R. 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47, 1468-1477.

ESTEVES, F.A. 1998. Fundamentos de limnologia. Editora Interciência Ltda., Rio de Janeiro. 2 ed.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2007. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Rome, 390 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 1998. Guide to efficient plant nutrition management. Rome, 20 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 1996. Control of water pollution from agriculture. Rome, 101 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2008. Current world fertilizer trends and outlook to 2011/12. Rome, 45 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2006. Fertilizer use by crop. Rome, 109 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2004. Fertilizer use by crop in Brazil. Rome, 2004. 52 p.

FARJALLA, V.F. et al. 2002. Nutrient limitation of bacterial production in clear water Amazonian ecosystems. Hydrobiologia 489, 197-205.

FARLOWE, V. 1928. Algae of ponds as determined by and examination of intestinal contents of tadpoles. Biological Bulletin, 55: 443-448.

FEKETE, M.M. 2013. Ecotoxicidade comparative dos pesticidas usados em plantações de cana-de-açúcar sobre larvas de anfíbios. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Ecologia.

FERRO, V.G. & DINIZ, I.R. 2007. Arctiidae (Insecta: Lepidoptera) da Estação Biológica de Boracéia (Salesópolis, São Paulo, Brasil). Biota Neotropica 7(3): 1-8.

FIELD, A. 2000. Discovering statistics using SPSS for Windows. SAGE Publications, London, UK. 496 p. cap. 7 (pp. 243-293)

FLORES-NAVA, A. & VERA-MUÑOZ, P. 1999. Growth, metamorphosis and feeding behavior of Rana catesbeiana Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities. Aquaculture Research, 30: 341-347.

FLORES-NAVA, A. 1997. An overview of modern world frog farming. In: Proceeding of Techhnofrog. II International Meeting of Frog Research and Technology. 19-21 July, Santos, Brazil. Associação Braslera de Estudos Técnicos em Ranicultura, pp. 100-116.

FORRESTER, G.E.; DUDLEY, T.L. & GRIMM, N.B. 1999. Trophic interactions in open systems: effects of predator and nutrients on stream food chains. Limnology and Oceanography, 44: 1187-1197.

FOY, R.H. & WITHERS, P.J.A. 1995. The contribution of agricultural phosphorus to eutrophication. In: Proceedings No. 365. The Fertilizer Society, Greenhill House, Thorpewood, Peterborough, UK.

FRETWELL, S.D. 1977. The regulation of plant communities by food chains exploiting them. Perspectives in Biology and Medicine 20: 169-185.

FRETWELL, S.D. 1987. Food chains dynamics: the central theory of ecology? Oikos 50: 291-301.

GASCON, C. 1992. Aquatic predators and tadpole prey in Central Amazonia: field data and experimental manipulations. Ecology, 73: 971-980.

GIRDEN, E. 1992. ANOVA: Repeated measures. Newbury Park, CA: Sage.

GOSNER, K.L. 1960. A simple table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16:183-190.

GRAHAM, D.W. et al. 2000. Alachlor transformation patterns in aquatic field mecocosms under variable oxygen and nutrient conditions. Water Res. 34, 4054-4062.

GRANÉLI, E.; EDVARDSEN, B.; ROELKE, D.L. & HAGSTRÖM, J.A. 2012. The ecophysiology and bloom dynamics of Prymnesium spp. Harmful Algae, 14: 260-270.

GRIMM, N.B. & FISHER, S.G. 1986a. Nitrogen limitation in a Sonoran Desert stream. Journal of the North American Benthological Society, 5: 2-15.

GRIMM, N.B. & FISHER, S.G. 1986b. Nitrogen limitation potential of Arizona streams and rivers. J Ariz-Nev Acad Sci, 21: -31-43.

HADDAD, C.F.B. & SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In Morellato, L.P.C. (org.), História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil, pp. 188-211. Editora da UNICAMP/FAPESP, Campinas.

HAIRSTON, N.G.; SMITH, F.E. & SLOBODKIN, L.B. 1960. Community structure, population control, and competition. American Naturalist 94: 421-424.

HAVENS, K.E.; JAMES, R.T., EAST; T.L. & SMITH, V.H. 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. Environmental Pollution, 122(3): 379-390.

HESSEN, D.O. 1992. Nutrient element limitation of zooplankton production. American Naturalist 140: 799-814.

HEYER, W.R. 1973. Ecological interactions of frog larvae at a seasonal tropical location in Thailand. Journal of Herpetology, 7: 337-361.

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L. & NELSON, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. Arquivos de Zoologia 31(4): 231-410.

HOFF, K.S.; BLAUSTEIN, A.R.; McDIARMID, R.W. & ALTIG, R. 1999. Behavior: interactions and their consequences. In: Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae (Eds. McDIARMIS, R.W. & ALTIG, R.(, pp. 215-239. University of Chicago Press, Chicago.

HOLOMUZKI, J.R. 2011. Grazinf effects by Green Frog tadpoles (Rana clamitans) in a Woodland Pond. Journal of Freshwater Ecology, 13(1): 1-8.

HOPKINS, W.A. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. ILAR J 48(3): 270-7.

HOWARTH, R.W. 2002. Nutrient over-enrichment of coastal waters in the United States: steps towards a solution. Pew Oceans Commision.

HYENSTRAND, P; BLOMWVIST, P. & PETTERSSON, A. 1998. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems: a literature review. Ergebnisse der Limnologie, 51: 41-62.

IEL (INSTITUTO EUVALDO LODI), 2006. O Novo Ciclo da Cana: estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos investimentos. IEL/NC/SEBRAE. Disponível em: <www.lei.cni.org.br>.

ILHA, P.R.J. 2010. Efeitos letais e subletais da poluição por nitrogênio em larvas de anuros. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Ecologia. 85 p.

IUCN, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versions 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 13 February 2013.

JANSSON, M.; BLOMQVIST, P.; JONSSON, A. & BERGSTRÖM, A.-K. 1996. Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örträsk. Limnology and Oceanography, 41, 1552-1559.

JANUS, L.L. & VOLLENWEIDER, R.A. 1981. The OECD Cooperative Program on Eutrophication: Summary Report – Canadian Contribution. Inland Waters Directorate Scientific Series No. 131, Environment Canada, Burlington, Ontario, Canada.

JENSSEN, T.A. 1967. Food habits of the green frog, Rana clamitans, before and during metamorphosis. Copeia, 214-218.

LEVINE, S.N. & SCHINDLER, D.W. 1999. Influence of the nitrogen to phosphorus supply ratios on physicochemical conditions on cyanobacteria and phytoplankton species composition in the Experimental Lakes Area, Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56: 451-466.

KATS, L.B.; PETRANKA, J.W. & SIH, A. 1988. Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. Ecology (69), 1865-1870.

KIM, H.-S.; HWAG, S.-J.; SHIN, J.-K.; AN, K.-G. & YOON, C.G. 2007. Effects of limiting nutrients and N:P ratios on the phytoplankton growth in a shallow hypertrophic reservoir. Developments in Hydrobiology, 194: 255-267.

KUFERBERG, S. 1997b. The role of larval diet in anuran metamorphosis. Am. Zool. 37: 146-159.

KUPFERBERG, S. 1997a. Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. Freshwater Biology 37(2): 427-439.

KUPFERBERG, S.J.; MARKS, J.C. & POWER, M.E. 1994. Effects of variation in natural algal and detrital diets on larval anuran (Hyla regilla) life-history traits. Copeia 1994, 446-457

LAWLER, S.P. 1989. Behavioral responses to predators and predation risk in four species of larval anurans. Anim. Behav. (38) 1039-1047.

LEVICH, A.P. 1996. The role of nitrogen-phosphorus ratio in selecting for dominance of phytoplankton by cyanobacteria or green algae and its application to reservoir management. Journal of Aquatic Ecosystem Health, 5(1): 55-61.

LOMAN, J. 1997. Natural density regulation in tadpoles of the moor frog Rava arvalis – preliminary report of a field experiment. Herp. Bonnesis, 247-255.

LOPES-LIMA, S. & AGOSTINHO, C.A. 1988. A criaçao de Ras. Publicaçoes Globo Rural, Rio de Janeiro, Brazil.

LOPES-LIMA, S. & AGOSTINHO, C.A. 1992. A tecnologia da Criaçao de Ras. Imprenta Universitaria, Universidade de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). 2013. Estatísticas e dados básicos de economia agrícola. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Estatistica/Estat%C3%ADticas%20e%20Dados%20B%C3%A1sicos%20de%20Economia%20Agr%C3%ADcola/Pasta%20Abril%20-%202013.pdf

MARTINS, M. & HADDAD, F.B. 1988. Vocalizations and reproductive behavior in the smith frog, Hyla faber Wied (Amphibia: Hylidae). Amphibia-Reptilia 9: 49-60.

MARTINS, M. 1993. Observations on nest dynamics and embryonic and larval development in the nest building gladiator frog, Hyla faber. Amphibia-Reptilia. v. 14. n. 4. pp. 411-421(11).

MENGE, B.A. & SUTHERLAND, J.P. 1976. Species diversity gradients: synthesis of the roles of predation, competition, and temporal heterogeneity. American Naturalist 110: 351-369.

MITRA, A. & FLYNN, K.J. 2005. Predator-prey interactions: is “ecological stoichiometry” sufficient when good food goes bad? J Plankt Res, 27: 393-299.

MORAN, M.D.; ROONEY, T.P. & HURD, L.E. 1996. Top-down cascade from a bitrophic predator in an old-field community. Ecology, 77: 2219-2227.

MORRIS, D.P. & LEWIS, W.M. Jr. 1988. Phytoplankton nutrient limitation in Colorado mountain lakes. Freshwater Biology, 20: 315-327.

MÜELLER, C.C. Expansion and modernization of agriculture in the cerrado – the case of soybeans in Brazils Center-West. Brasília: Departamento de Economia, Universidade de Brasília, Outubro de 2003.

MUZÓN, J.; VON ELLENRIEDER, N.; PESSACQ, P.; LOZANO, F.; GARRÉ, A.; LAMBRUSCHINI, J.; RAMOS, L. & WEIGEL MUÑOZ, M.S. 2008. Odonata from Iberá Wetland (Corrientes, Argentina): preliminary inventory and biodiversity. Revista da Sociedade Entomológica Argentina, 67: 59-67.

NOLAN, B.T.; RUDDY, B.C.; HITT, K.J. & HELSEL, D.R. 1997. Risk of nitrate in groundwaters of the U.S. – A national perspective. Environmental Science and Technology, 31, 2229-2236.

NÜRNBERG, G.K. 1996. Trophic state of clear and colored, soft- and hard-water lakes with special consideration of nutrients, anoxia, phytoplankton and fish. Lakes and Reservoir Management, 12: 432-447.

NUSCH, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. Arch Hydrbiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14:14-36.

PEACOR, S.D.; SCHIESARI, L. & WERNER, E.E. 2007. Mechanisms of nonlethal predator effect on cohort size variation: ecological and evolutionary implications. Ecology, 88(6): 1536-1547.

PERSSON, L.; JOHANSSON, L; ANDERSSON, G.; DIEHL, S. & HAMRIN, S.F. 1993. Density dependent interactions in lake ecosystems – whole lake perturbation experiments. Oikos, 66: 193-208.

PETRANKA, J.W. & KENNEDY, C.A. 1999. Pond tadpoles with generalizes morphology: is it time to reconsider their functional roles in aquatic communities: Oecologia, 120: 621-631.

PETRANKA, J.W.; KATS, L.B. & SIH, A. 1987. Predator-prey interactions among fish and larval amphibians: use of chemical cues to detect predatory fish. Anim. Behav. (35) 420-425.

PIRES, A.M.Z.C.R.; DOS SANTOS, J.E. & PIRES, J.S.R. 2000. Caracterização ambiental de uma Unidade de Conservação. Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP; p. 59-72 In J.E. DOS SANTOS e J.S.R. PIRES (org.). Estudos

Integrados em Ecossistemas. Estação Ecológica de Jataí. São Carlos: Rima Editora.

POWER, M.E.; MATTHEWS, W.J. & STEWART, A.J. 1985. Grazing minnows, piscivorous bass and stream algae: dynamics of a strong interaction. Ecology, 66: 1448-1456.

PRADA, S.M.; GUCKEZIAN, M.; SUAREZ-LHA, M.E.V. 1997. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. Química Nova 21(3)(1998).

PRITCHARD, G. 1965. Prey capture by dragonfly larvae (Odonata, Anisoptera). Can. J. Zool., (43): 271-289.

REDFIELD, A.C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. American Scientist, 46: 205-221.

REGESTER, K.J.; LIPS, K.R. & WHILES, M.R. 2006. Energy flow and subsidies associated with complex life cycle of ambystomatid salamanders in ponds and adjacent forest in southern Illinois. Oecologia 147: 303-314.

RELYEA, R.A. & WERNER, E.E. 1999. Quantifying the relation between predator-induced behavior and growth performance in larval anurans. Ecology, 80(6): 2117-2124.

RELYEA, R.A. 2002. Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. Ecological Monographs, 72(4): 523-540.

RICHARDS, S.J. & BULL, C.M. 1990a. Non-visual detection of anuran larvae by odonate larvae. J. Herpetol. (24)-311-313.

RICHARDS, S.J. & BULL, C.M. 1990b. Size-limited predation on tadpoles of three Australian frogs. Copeia, 1041-1046.

ROSSA-FERES, D.C.; JIM, J. & FONSECA, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). Revista Brasileira de Zoologia 21(4): 745-754.

ROWE, C.L. & DUNSON, W.A. 1994. The value of simulated pond communities in mesocosms for studies of amphibian ecology and ecotoxicology. Journal of Herpetology, 28, 346-56.

RUDORFF, B.F.T.; AGUIAR, D.A.; SILVA, W.F.; SUGUWARA, L.M.; ADAMI, M. & MOREIRA, M.A. 2010. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo state (Brazil) using Landsat data. Remote Sensing, 2(4): 1057-1076. doi: <10.3390/rs2041057>.

SAVAGE, R.M. 1952. Ecological, physiological and anatomical observations on some species of anuran tadpoles. Proc. Zool. Soc. 122: 467-514.

SCHANZ, F. & JUON, H. 1983. Two different methods of evaluating nutrient limitations of periphyton bioassays, using water from the River Rhina and eight of its tributaries. Hydrobiologia, 102: 187-195.

SCHIESARI, L. 2006. Pond-canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. Freshwater Biology, 51(3): 412-423.

SCHIESARI, L.; PEACOR, S.D. & WERNER, E.E. 2006. The growth-mortality tradeoff: evidence from anuran larvae and consequences for species distributions. Oecologia, 149(2): 194-202.

SCHIESARI, L.C., GRILLITSCH, B. & GRILLITSCH, H. 2007. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. Conservation Biology, 21(2): 465-471.

SCHIESARI, L.; WERNER, E.E. & KLING, G.W. 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. Freshwater Biology, 54(3): 572-586.

SCHINDLER, D.W. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes. Science, 195-260-262.

SCHINDLER, D.W. 1998. Replication versus realism: the need for ecosystem-scale experiments. Ecosystems, 1, 323-34.

SCHMITZ, O.J. 1998. Direct and indirect effects of predation and predation risk in old-field interaction webs. The American Naturalist, 151(4): 327-342.

SCHREURS, H. 1992. Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology. Thesis, University of Amsterdam.

SEALE, D.B. & BECKVAR, N. 1980. The comparative ability of anuran larvae (genera: Hyla, Bufo and Rana) to ingest suspended blue-green algae. Copeia, 495-503.

SEALE, D.B. 1980. Obligate and facultative suspension feeding in anuran larvae: feeding regulation in Xenopus and Rana. Biological Bulletin, 162: 214-231.

SKELLY, D.K. & KIESECKER, J.M. 2001. Venue and outcome in ecological experiments: manipulations of larval anurans. Oikos 94:1.

SKELLY & WERNER, 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to and odonate predator. Ecology (71): 2313-2322.

SKELLY, D.K. 1992. Field evidence for a cost of behavioral antipredator defense in a larval amphibian. Ecology (73): 704-708.

SKELLY, D.K. 2002. Experimental venue and estimation of interaction strength. Ecology, 83, 2097-2101.

SMITH, R.V; LENNOX, S.D.; JORDAN, C.; FOY, R.H. & McHALE, E. 1995. Increase in soluble phosphorus transported in drainflow from a grassland catchment in respose to soil phosphorus accumulation. Soil Use and Management 11, 204-209.

SMITH, V.H. & BENNET, S.J. 1999. Nitrogen:phosphorus ratios and phytoplankston community structure in lakes. Archiv für Hydrobiololgie, 146: 37-53.

SMITH, V.H. & SCHINDLER, D.W. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? Trends in Ecology and Evolution 24-4: 201-207.

SMITH, V.H. 1998. Cultural eutrophication of indland, estuarine, and coastal waters. Pages 231-249 in Akatsuka I, ed. Introduction to Applied Phycology. Amsterdam (The Netherlands): SPB Academic Publishing.

SMITH, V.H. 2003. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems: a global problem. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 10, 126-139.

SOUZA, L.O.I. & COSTA, J.M. 2006. Inventário da Odonatofauna no Complexo Aporé-Sucuriú, p. 81-88. In: PAGOTTO, T.C.S. & SOUZA, P.R. (Orgs.). Biodiversidade do Complexo Aporé-Sucuriú. Subsídios à conservação e manejo do bioma Cerrado. Campo Grande, Editora UFMS, 310 p.

SOUZA, L.O.I.; COSTA, J.M. & OLDRINI, B.B. 2007. Odonata. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online

SRIVASTAVA, S.S.; KOLASA, J.; BENGTSSON, J.; GONZALEZ, A.; LAWLER, S.P.; MILLER, T.E.; MUNGUIA, P.; ROMANUK, T.; SCHNEIDER, D.C. & TRZCINSKI, M.K. 2004. Are natural microcosms useful model systems for ecology? Trends In Ecology and Evolution, 19(7): 379-384.

STERNER, R.W. & ELSER, J.J. 2002. Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press, Princeton, NJ.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM). 2001. Potassium chloride CAS nº: 7447-40-7. UNEP Publications, Norway.

UNRINE, J.M.; HOPKINS, W.A.; ROMANEK, C.S. & JACKSON, B.P. 2007. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. Environ. Pollut (no prelo).

VERDADE, V.; CARNAVAL, A.; RODRIGUES, M.T.; SCHIESARI, L.; PAVAN, D. & BERTOLUCI, J. 2011. Decline of amphibians in Brazil. In: HEATWOLE, H. & WILKINSON, M. (eds.). Amphibians Biology v. 9. Status of Decline of Amphibians: Western Hemisphere. Part 2: Uruguay, Brazil, Ecuador and Colombia. Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty and Sons, p. 85-127.

VERDADE, V.K.; RODRIGUES, M.T. & PAVAN, D. 2009. Anfíbios anuros da região da Estação Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. In Lopes, M.I.M.S.;

KIRIZAWA, M. & MELO, M.M.R.F (Eds.), Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra. São Paulo: Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, pp. 579-604.

VITOUSEK, P.M.; MOONEY, H.A.; LUBCHENKO, J. & MELILLO, J.M. 1997a. Human domination of Earth's ecosystems. Science, 277, 87-115.

VITOUSEK, P.M.; ABER, J.; HOWARTH, R.W.; LIKENS, G.E.; MATSON, P.A.; SCHINDLER, D.W.; SCHLESINGER, W.H. & TILMAN, G.D. 1997b. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. Ecological Applications, 7, 737-750.

VOLLENWEIDER, R.A. & KEREKES, J. 1982. Eutrophication of Waters, Monitoring, Assessment and Control. OECD, Paris.

VREDE, K.; VREDE, T.; ISAKSSON, A. & KARLSSON A. 1999. Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton – a seasonal study. Limnology and Oceanography, 44, 1616-1624.

VREDE, T.; BALLANTYNE, A.; MILLE-LINDBLOM, C.; ALGESTEN, C.; GUDASZ, C.; LINDAHL, S.; & BRUNBERG, A.K. 2009. Effects of N:P loading ratios on phytoplankton community composition, primary production and N fixation in a eutrophic lake. Freshwater Biology, 54: 331-344.

WARINGER-LÖSCHENKOHL, A. & SCHARGERL, M. 2001. Algal exploitation by tadpoles – an experimental approach. International Review of Hydrobiology 86, 105-125.

WASSERSUG, R.J. 1975. The adaptative significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans. Amer. Zool. 15: 405-417.

WELLBORN, G.A.; SKELLY, D.K. & WERNER, E.E. 1996. Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. Annual Review of Ecology and Systematics, 27: 337-363.

WERNER, E.E. & PEACOR,S.D. 2003. A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. Ecology, 84(5): 1083-1100.

WHITE, T.R.C. 1978. The importance of relative shortage of food in animal ecology. Oecologia (Berlin) 33: 71-86.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London and New York.

WILBUR, H.M. & COLLINS, J.P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. Science, 182: 1305-1314.

WILBUR, H.M. & COLLINS, J.P. 1977. Interactions of food level and population density in Rana sylvatica. Ecology, 58: 206-209.

WILBUR, H.M. 1987. Regulation in complex systems: experimental temporary pond communities. Ecology, 68, 1437-52.

WILSON, W.H. et al. 1996. The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium Synechococcus sp. WH7803. J. Phycol. 32, 506-516.

WOOD, S.L.R. & RICHARDSON, J.S. 2009. Impact of sediment and nutrient inputs on growth and survival of tadpoles of the Western Toad. Freshwater Biology 54, 1120-1134.