



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Resposta de *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E.
Hegewald ao sombreamento e lixiviado de *Cabomba
caroliniana* A. Gray sob diferentes concentrações de
nitrato: uma abordagem experimental**

Manuela Passos Tourinho

Orientadora: Ana Silvia Rolon
Coorientadora: Emanuela Garbin Martinazzo

Rio Grande
2021



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Resposta de *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald ao
sombreamento e lixiviado de *Cabomba caroliniana* A. Gray sob
diferentes concentrações de nitrato: uma abordagem experimental**

Aluna: Manuela Passos Tourinho

Orientadora: Ana Silvia Rolon

Coorientadora: Emanuela Garbin Martinazzo

Colaborador: Pablo Santos Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2021

Ficha Catalográfica

T727r Tourinho, Manuela Passos.

Resposta de *Desmodemus communis* (E. Hegewald) E.
Hegewald ao sombreamento e lixiviado de *Cabomba caroliniana* A.
Gray sob diferentes concentrações de nitrato: uma abordagem
experimental / Manuela Passos Tourinho. – 2021.
76 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Ana Silvia Rolon.

Coorientadora: Dra. Emanuela Garbin Martinazzo.

Colaborador: Dr. Pablo Santos Guimarães.

1. Alelopatia 2. Competição 3. Eutrofização 4. Lagos rasos
I. Rolon, Ana Silvia II. Martinazzo, Emanuela Garbin III. Guimarães,
Pablo Santos IV. Título.

CDU 581.526.33

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 001/2021

Às 14:00 hs (quatorze horas) do dia 25 (vinte e cinco) do mês de fevereiro de 2021 (dois mil e vinte e um), via Webconferência (<https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/ana-silvia-rolon-ana>) reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da acadêmica **Manuela Passos Tourinho**. A dissertação intitulada “**Resposta de *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald ao sombreamento e lixiviado de *Cabomba caroliniana* A. Gray sob diferentes concentrações de nitrato: uma abordagem experimental**” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Prof^ª Dra Ana Silvia Rolon (Orientadora) Prof^ª Dra Emanuela Garbin Martinazzo (Co-orientadora), Prof^ª Dra. Sônia Marisa Heffer (FURG), Prof^º Dr Ng Haig They (UFRGS) e Dra Marianna de Oliveira Lanari (Pós-Doc/FURG). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, a acadêmica concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 17:45h (**dezessete horas e quarenta e cinco minutos**) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.

Prof^ª Dra. Ana Silvia Rolon

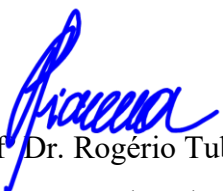
Prof^ª Dra. Emanuela Garbin Martinazzo

Prof^ª. Dra. Sônia Marisa Heffer

Prof^º Dr. Ng Haig They

Dra Marianna de Oliveira Lanari

Manuela Passos Tourinho



Prof. Dr. Rogério Tubino
Vianna Coordenador do
Curso

Dedico à minha mãe,
Sra. Silvia Passos Tourinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minhas orientadoras e ao colaborador, Dra. Ana Silvia Rolon, Dra. Emanuela Martinazzo e Dr. Pablo Guimarães, por abdicarem do seu tempo, pela receptividade e construção de uma grande equipe. O apoio, paciência e carinho dedicados/doados a mim, tornou esta trajetória possível e mais leve. Agradeço pela confiança e enorme habilidade que vocês possuem em buscar soluções práticas e eficientes frente à problemas profissionais e também pessoais. Agradeço pelas palavras de conforto e estímulo e também pelos puxões de orelha. *Obrigada, obrigada, obrigada!*

Um agradecimento especial ao professor e ao técnico responsáveis pelo laboratório de Microalgas (ICB – FURG), obrigada por me receberem de portas abertas e por disponibilizar toda estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa, que foi minha segunda casa durante estes anos. Obrigada aos amigos e colegas de laboratório, de PPG, Andrea, Patricia, Mavi, Muryllo, Ana Cecília, Pablo. É um prazer enorme trabalhar ao lado de pessoas tão inspiradoras, pró-ativas, responsáveis e generosas! Muito obrigada!!!

Agradeço a CAPES pela disponibilização de bolsa de estudos. Agradeço aos professores do PPG-BAC pelo conhecimento compartilhado. Agradeço também aos professores e técnicos da Botânica e, também do laboratório de Limnologia (ICB).

Agradecimento especial a minha mãe pela compreensão, por todo incentivo, suporte e que nunca mediu esforços para investir na minha educação e nos meus estudos, por acreditar em mim e por nunca permitir que eu desistisse dos meus sonhos. Muito obrigada pela amizade e por acreditar em mim. És meu maior exemplo de integridade, lealdade e cumplicidade; obrigada por me ensinar a amar a vida, em todas suas formas, mas sobretudo, obrigada por lutar, ferozmente, por ela. És uma guerreira! Juntas somos (*muito*) mais fortes.

Agradeço ao meu querido companheiro, Rodrigo, pelo dom em tornar todos os momentos difíceis em momentos leves e alegres. Obrigada pela parceria, compreensão, pela amizade e pelo incentivo incansável.

Um muitíssimo obrigada aos meus amados e perfeitos amigos, Ana, Amanda, Aline, Andrea e Pati, Bruna, Camila, Fabi, Henrique, Jordana, Ju, Kim, Larissa, Maiby, vocês são demais!

Aos familiares, amigos, obrigada por todo carinho, compreensão e incentivo!

Sou grata por ter pessoas tão especiais na minha vida.

RESUMO

Cobrindo aproximadamente 8% da superfície terrestre, os ecossistemas de água doce enquanto recurso natural, são responsáveis por sustentar funções sociais, ecológicas e abrigar uma elevada biodiversidade. Apesar da importância de ecossistemas aquáticos os níveis de eutrofização têm sido um problema mundial, pois estes ambientes fornecem diferentes serviços ecossistêmicos. A eutrofização é oriunda do excesso de nutrientes como nitrogênio e fósforo e pode desencadear o crescimento excessivo do fitoplâncton e, conseqüentemente, aumento da turbidez da água. Entretanto a presença de macrófitas aquáticas pode influenciar no controle de microalgas, através de mecanismos competitivos, como liberação de compostos aleloquímicos, competição por luz e nutrientes. A partir do exposto, nosso trabalho avaliou experimentalmente a influencia da *Cabomba caroliniana* sobre a microalga *Desmodesmus communis*, expostas a três concentrações de nitrato. Para verificar o efeito da presença física, realizamos o experimento coexistência, e para analisar, exclusivamente, o efeito do lixiviado foi realizado o experimento alelopatia. Os resultados obtidos indicam que o sombreamento gerado pela presença física da macrófita submersa *C. caroliniana* influencia negativamente no crescimento de *D. communis*, assim como o lixiviado da planta. O segundo fator propulsor para inibição do crescimento da microalga foi o nitrato, em ambos experimentos. Logo, este estudo mostrou que a competição interespecífica entre estas espécies pode ser uma forma de mitigação do processo de eutrofização em lagos rasos, além disso, é essencial que haja controle no aporte nutricional destes locais.

Palavras-chave: Alelopatia, Competição, Eutrofização, Lagos rasos.

ABSTRACT

Covering approximately 8% of the Earth's surface, fresh water ecosystems as natural resource are responsible for sustaining ecological and social functions, and harbor high biodiversity. Even though their significance, the high levels of eutrophication have been a global problem given that those environments provide several ecosystem services. The eutrophication rises from the excess of nutrients, including nitrogen and phosphorus. It can initiate the overgrowth of phytoplankton and, therefore, rise the water turbidity. However, the presence of aquatic macrophytes can influence in the microalgae growth through competitive mechanisms, including the release of allelochemical compounds, shading and nutrient uptake. Given this, the aim of this work is to experimentally evaluate the influence of *Cabomba caroliniana* on the microalgae *Desmodesmus communis*, exposed to three nitrate concentrations. The effect of its physical presence was assessed by a coexistence experiment, and the exclusive effect of the leachate was analyzed by an allelopathy experiment. The results indicated that shading caused by the physical presence of the submersed macrophyte *C. caroliniana* influences the growth of *D. communis*, as well as the leachate. The second propellant factor for the growth inhibition was nitrate, on both experiments. Therefore, this study shows the interspecific competition between those species can be a method for the mitigation of eutrophication in shallow lakes. Moreover, it is essential to control the nutritional support in these sites.

Key-words: Allelopathy, Competition, Eutrophication, Shallow lake

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação segue o modelo sugerido pelo PPG em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Federal do Rio Grande – FURG e está estruturada em três seções. Na primeira seção corresponde a uma introdução geral abordando temas sobre ambientes aquáticos continentais e influências do processo de eutrofização, além da importância do fitoplâncton e das macrófitas aquáticas nestes ambientes, cujas referências seguem as normas ABNT. A segunda seção é composta por um manuscrito que será submetido à revista *Aquatic Botany* e segue a formatação da revista, com exceção da língua e da disposição das figuras. O manuscrito conta com Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figuras e Material Suplementar. A terceira parte consiste nas considerações finais e perspectivas referentes ao tema da dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
APRESENTAÇÃO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
<i>Eutrofização de ambientes aquáticos.....</i>	<i>15</i>
<i>Macrófitas aquáticas.....</i>	<i>17</i>
<i>Fitoplâncton.....</i>	<i>20</i>
Objetivos.....	22
Referências.....	23
ARTIGO.....	31
Resumo.....	31
Introdução.....	32
2. Material e métodos.....	34
2.1 Organismos teste.....	34
2.1.1 <i>Desmodesmus communis</i>	34
2.1.2 <i>Cabomba caroliniana</i>	35
2.2 Experimentos.....	36
2.2.1 Experimento de coexistência de <i>Desmodesmus communis</i> e <i>Cabomba caroliniana</i>	36
2.2.2 Experimento alelopatia.....	37
2.3. Análises de densidade e viabilidade celular.....	37
2.4. Análise de dados.....	38
3. Resultados.....	39
3.1. Experimento de coexistência de <i>Desmodesmus communis</i> e <i>Cabomba caroliniana</i>	39
3.2 Experimento Lixiviado.....	43
4. Discussão.....	46
Referências.....	51
Material suplementar.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	60
ANEXO.....	61

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral

Figura 1) Desenho ilustrado, por Schooler, da macrófita submersa *Cabomba caroliniana*, (a) planta inteira, (b) fruto, (c) flor, (d) folhas superiores inteiras, e (e) folhas inferiores dissecadas. (Fonte: Schooler et al., 2009).

Figura 2) Imagem da coexistência da macrófita submersa *Cabomba caroliniana* no Lago do Centro Esportivo, localizado na Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Imagem: Autores.

Figura 3) A) Imagem da alga *Desmodesmus communis* não exposta ao corante vermelho neutro, Imagem: Manuela Passos Tourinho. B) Imagem adaptada de Da Luz e colaboradores (2016) *Desmodesmus communis* corado com Vermelho Neutro. Barra de escala = 10 μm .

Manuscrito

Figura 1) Densidade celular (Cél.mL^{-1}) de *D. communis* ao longo de um período de dez dias. O controle (linha preta), *Cabomba caroliniana* em coexistência com *D. communis* (linha azul) e *D. communis* na presença da planta artificial (linha vermelha) nas três concentrações de nitrato NO_3 1 (elevada = 1000 $\mu\text{g/L}$), NO_3 1/3 (intermediária = 333,33 $\mu\text{g/L}$) e NO_3 1/9 (baixa = 111,11 $\mu\text{g/L}$).

Figura 2) Taxa de inibição (%) com base na densidade celular de *Desmodesmus communis*. Controle (barra verde), coexistência de *D. communis* e *C. caroliniana* (barra vermelha), *D. communis* e planta artificial (barra azul), foram expostos as três concentrações de nitrato.

Figura 3) Viabilidade celular (%) de *D. communis* em coexistência com macrófita submersa *Cabomba caroliniana* natural (azul) e artificial (vermelho), grupo controle (preto) ao longo de dez (10) dias, nas três concentrações de nitrato: NO_3 1 (elevada = 1000 $\mu\text{g/L}$), NO_3 1/3 (intermediária = 333,33 $\mu\text{g/L}$) e NO_3 1/9 (baixa = 111,11 $\mu\text{g/L}$).

Figura 4) Percentual da taxa de inibição baseado na viabilidade celular de *D. communis*. Controle (barra verde), coexistência *D. communis* e planta natural (barra vermelha), *D. communis* e planta artificial (barra azul), foram expostos as três níveis de nitrato: NO_3 1 (elevada = 1000 $\mu\text{g/L}$), NO_3 1/3 (intermediária = 333,33 $\mu\text{g/L}$) e NO_3 1/9 (baixa = 111,11 $\mu\text{g/L}$).

Figura 5) Densidade celular de *D. communis* (Cél.mL^{-1}) na presença do lixiviado (azul) e no controle (vermelho) expostos a três concentrações de nitrato : NO_3 1 (elevada = 1000 $\mu\text{g/L}$), NO_3

1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO₃ 1/9 (baixa = 111,11 µg/L) por um período de tempo de dez dias.

Figura 6) Taxa de inibição (%) baseada na densidade celular de *D. communis* no controle (vermelho) e expostas ao lixiviado (azul) em três diferentes níveis de nitrato : NO₃ 1 (elevada = 1000 µg/L), NO₃ 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO₃ 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).

Figura 7) Percentual de viabilidade celular de *D. communis* ao longo dos dez dias de experimento no controle (vermelho) e expostas ao lixiviado (azul) expostos a três concentrações de nitrato: elevada (NO₃⁻ = 1000 µg/L), intermediária (NO₃⁻ = 333,33 µg/L), e baixa (NO₃⁻ = 111,11 µg/L) por um período de tempo de dez dias.

Figura 8) Taxa de inibição com base na viabilidade celular de *D. communis* no controle (azul) e expostas ao lixiviado (vermelho) nos três níveis de nitrato.

INTRODUÇÃO GERAL

1 Ecossistemas aquáticos de água doce cobrem cerca de 11 a 13 milhões de km², cerca de
2 8-9%, da superfície terrestre, contemplando lagos, reservatórios, áreas úmidas, rios, planícies
3 inundáveis e pântanos (Lehner & Döll, 2004). Estes ambientes englobam valores essenciais
4 enquanto recurso natural, político, recreativo e científico. Os serviços ecossistêmicos
5 promovidos pelos ecossistemas aquáticos são responsáveis por sustentar funções sociais, como
6 disponibilidade e abastecimento de água potável para consumo, alimentação, e recursos
7 energéticos, além de funções ecológicas, como hospedar uma elevada biodiversidade (Hughes
8 et al., 2019, MEA, 2005, Moss, 2018), cerca de 10% da fauna e flora descritas habitam estes
9 ecossistemas (Balian et al., 2007).

10 Os lagos brasileiros, em sua maioria, são rasos, dificilmente ultrapassam 20 metros de
11 profundidade (Esteves, 2011). Ao longo do tempo os sedimentos que circundam os
12 ecossistemas aquáticos podem adentrar no ecossistema, gerando uma diminuição na
13 profundidade, além de acarretar aumento na carga nutricional (Esteves, 1998). Em decorrência
14 da baixa profundidade dos lagos e da ação do vento, a coluna d'água dos lagos subtropicais do
15 sul do Brasil é frequentemente misturada, dificultando as estratificações químicas e físicas,
16 porém a ressuspensão do sedimento promovida pela ação dos ventos pode ocasionar a redução
17 da transparência da água (Scheffer, 2004; Trindade et al., 2009). Em relação ao fluxo hídrico,
18 possuem assinatura “hidrológica” e são caracterizados por possuir pouca movimentação natural
19 da água decorrente do seu sistema fechado e distribuição irregular (Thorp & Covich, 2001). Já
20 do ponto de vista geológico, são relativamente jovens e possuem origem e tempo de duração
21 variáveis (Esteves, 1998).

22 A ressuspensão do sedimento pode ser minimizada com a presença abundante de
23 macrófitas aquáticas submersas, a presença destas plantas pode ser um fator determinante para
24 controlar o crescimento excessivo do fitoplâncton, além de aumentar a transparência da água,
25 esta conjuntura é conhecida como estado alternativo de águas claras (Scheffer et al., 1993). Em
26 contraposição, o estado alternativo de águas turbidas é caracterizado pela ausência ou baixa
27 densidade de macrófitas submersas, ressuspensão do sedimento, aumento da disponibilidade de
28 nutrientes, e elevada biomassa de cianobactérias e fitoplâncton (Scheffer et al., 1993).

29 *Eutrofização de ambientes aquáticos*

30 O processo de eutrofização é conceituado como aumento no aporte nutricional e de
31 matéria orgânica dentro de um ecossistema aquático, tornando-o mais produtivo, porém têm
32 capacidade de simplificar a estrutura dos componentes bióticos (Esteves, 2011; Wetzel, 1993).
33 O nitrogênio e o fósforo são considerados nutrientes limitantes para os ecossistemas terrestres
34 e aquáticos, porém o excesso está diretamente associado à eutrofização, influenciando a
35 produtividade destes ecossistemas (Conley et al., 2009; Smith, 2003; Wang & Wang, 2009).

36 O nitrogênio é um dos elementos mais importantes na biosfera e mais abundante na
37 atmosfera (N_2). Embora presente em grande quantidade na atmosfera, somente alguns
38 organismos, como cianobactérias e bactérias, conseguem assimilar o nitrogênio atmosférico
39 (Galloway et al., 2010). E para que este nitrogênio atmosférico (N_2) esteja disponível no
40 ecossistema aquático ele precisa passar por um processo de transformação em N biológico
41 (Esteves e Amado, 2011). Após a assimilação e fixação do N_2 , ocorre a sua transformação em
42 amônia, amônio ou em outros componentes, como o nitrato (Scott et al., 2008). Tal processo é
43 conhecido como fixação biológica de nitrogênio, o qual constitui a principal fonte natural desse
44 nutriente (Ridley et al., 1996).

45 Sabe-se também que as chuvas e tempestades atmosféricas de raios provêm energia para
46 que haja combinação entre oxigênio molecular e N_2 , transformando em o nitrogênio em formas
47 assimiláveis pelos produtores primários, como nitrato e amônio (Esteves e Amado, 2011).
48 Diversos trabalhos enfatizaram a importância da limitação de nitrogênio na regulação da
49 biomassa fitoplanctônica e de sua estrutura (Setaro & Melack, 1984; Abell et al., 2010), pois a
50 disponibilidade deste elemento pode influenciar no crescimento de microalgas (Akgül, 2020).

51 As condições tróficas dos ecossistemas lênticos brasileiros variam de mesotróficas a
52 eutróficas (Abe et al., 2006). Porém existem lagos rasos caracterizados como hipereutróficos
53 (Albertoni et al., 2014). Em síntese, o processo de eutrofização pode refletir a ação antrópica
54 sobre estes ecossistemas (Wetzel, 1993) e tem sido considerada um impacto de ordem global
55 (Hu et al., 2014; Smith & Schindler, 2009). Há relatos de eutrofização de 53% dos lagos e
56 reservatórios na Europa, na Ásia estima-se que 54% dos lagos e reservatórios estão
57 eutrofizados, na África 28%, e na América do Sul o percentual é de aproximadamente 40%
58 (Nyenje et al., 2010).

O processo de eutrofização está diretamente relacionado com crescimento populacional e econômico, exploração de recursos naturais, queima de combustíveis fósseis e descarte incorreto de rejeitos industriais e domésticos (Rosolen et al., 2015; Smith et al., 2006). Sendo também associado à prática agrícola, devido ao uso excessivo e inapropriado de fertilizantes químicos (Andreoli & Carneiro, 2005) e, também, introdução de espécies invasoras (Agostinho, et al.; MEA, 2005)

Ecossistemas de água doce perderam uma proporção maior de suas espécies e habitat do que os ecossistemas em terra ou nos oceanos, e enfrentam ameaças crescentes de represas, captação de água, poluição, espécies invasivas e colheita excessiva (MEA, 2005, Revenga et al. 2005). Ecossistemas de água doce e as diversas comunidades de espécies encontradas em lagos, rios e pântanos podem ser os mais ameaçados de todos (MEA, 2005).

Vale ressaltar que a eutrofização pode ser também ocasionada de maneira natural, ou seja, através de perturbações na estrutura das comunidades aquáticas e nos processos funcionais, como por exemplo, ocorrência de predadores piscívoros (Smith & Schindler, 2009). Trindade e colaboradores (2009) associaram o enriquecimento nutricional em um lago raso subtropical durante a primavera ao período de maior incidência de aves, ocasionando florações de microalga e cianobactérias.

O crescimento acelerado de microalgas pode ocasionar florações, ou *blooms*, que são massas de algas e/ou cianobactérias, responsáveis por diversos impactos nos ecossistemas aquáticos (Silva, 2012). Estes impactos geram alterações nos padrões de qualidade de água, como modificação do pH, condutividade elétrica, depleção de oxigênio dissolvido e redução de espelho d'água (De Moraes, 2009; Guimarães et al., 2003).

As alterações nos padrões da qualidade de água e processos interativos, como mudanças nas condições físicas (temperatura e luminosidade) e químicas (nutrientes), ocorrem em curtos intervalos de tempo (Falkowski & Raven, 2013). A eutrofização altera a coexistência entre espécies devido a alteração nos fatores abióticos, tais como temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, e com isso podem mediar a competição entre espécies aquáticas (Henry-Silva & Camargo, 2005). Entretanto o benefício em relação à concentração de nutriente pode variar entre as espécies, de acordo com suas oscilações temporais (Henry-Silva & Camargo, 2005). Logo, é importante conhecer mecanismos de competição entre espécies, pois

alguns fatos fatores podem levar à alterações dos produtores primários e estados alternativos do ambiente (Scheffer et al., 1993).

Macrófitas aquáticas

O termo macrófita aquática refere-se a vegetais macroscópicos e incluem também as macroalgas, briófitas, pteridófitas e as angiospermas (Esteves, 2011). É considerado um grupo bem diverso de organismos (Chambers et al., 2007). Podendo ser considerada uma das assembleias mais produtivas dentre os ecossistemas continentais (Esteves, 1988).

Ao longo da escala evolutiva, as macrófitas obtiveram um conjunto de estratégias adaptativas, as quais as permitem colonizar diversos ecossistemas aquáticos, como corredeiras, ambientes marinhos, córregos, rios, áreas úmidas, lagos e também reservatórios (Kalff, 2002; Wetzel, 2001). As macrófitas são um componente importante para ecossistemas aquáticos, pois influenciam em atributos de outras assembleias anexas, como diversidade de espécies, produtividade e a ciclagem de nutrientes do ecossistema (Thomaz & Cunha, 2010).

Por apresentar alta sensibilidade a mudanças na qualidade da água, as macrófitas são consideradas boas indicadoras para o estado de conservação de ambientes aquáticos (Van Geest et al., 2003), incluindo o estresse ambiental associado à eutrofização (Zhang et al., 2016). As macrófitas aquáticas podem ser classificadas em sete categorias, sendo elas: anfíbia, epífita, emergente, flutuante fixa, flutuante livre, submersa fixa e submersa livre (Pedralli, 1990).

As espécies submersas apresentam um papel importante na regulação de processos aquáticos, particularmente em lagos rasos (Scheffer et al., 1993; Søndergaard et al., 2010; Wetzel, 1993). Estudos demonstraram que estas espécies respondem rapidamente e positivamente à redução de carga nutricional, além de influenciar na redução na proliferação de algas (Jeppesen et al., 2007; Zeng et al., 2017), como por exemplo através da alelopatia.

Em 1937 o termo alelopatia foi utilizado pela primeira vez por Hans Molish em "Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie", onde descreveu ser interações entre plantas e organismos, são interações químicas e podem ter consequências/efeitos positivas e negativas (Ferreira & Aquila, 2000). Essas interações ocorrem a partir da liberação de compostos químicos provenientes de vegetais e ocasionam efeitos diretos e indiretos em outros organismos e pode ser danoso ou benéfico (Rice, 1984). A alelopatia pode ser observada em diversos ecossistemas, tanto por organismos terrestres como aquáticos, como as macrófitas.

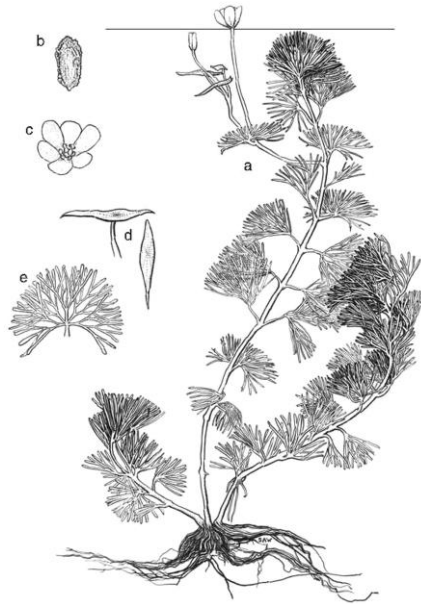
A macrófita aquática submersa *Cabomba caroliniana* A. Gray (Figuras 1, 2) pode ser encontrada em água doce e salobra, e apresenta crescimento rápido através de propágulos vegetativos (Bickel & Schooler, 2015). A sua ocorrência está frequentemente associada a lagos rasos com baixas concentrações de clorofila-a e nutrientes, e também baixa matéria orgânica suspensa, bem como, têm preferência por ambientes com baixo pH (4-6) (Bickel & Schooler, 2015; Pereira et al., 2012).

A presença de macrófitas aquáticas submersas e o sombreamento ocasionado por elas pode ser um fator limitante ao crescimento do fitoplâncton (Cummins & Wilzbach, 2008), pois estes organismos ocupam o mesmo estrato na coluna d'água e, assim como as cianobactérias fotossintetizantes, são dependentes de radiação solar como fonte de energia para fixação de carbono (Litchman et al., 2004; Reynolds, 2006). Além disso, *C. caroliniana* possui a capacidade diminuir a concentração de nutrientes disponível na água em função da sua absorção foliar (Meerhoff et al., 2003). Portanto, o conhecimento detalhado desta espécie e sua vantagem competitiva podem auxiliar no manejo e restauração de ambientes aquáticos (Bickel & Perret, 2014).

Entretanto, a *C. caroliniana* frequentemente é utilizada como planta de aquário (Bickel & Schooler, 2015; Hogsden et al., 2007; Ørgaard, 1991) em razão do uso ornamental, esta planta foi comercializada em diferentes países, e introduzida acidentalmente, através de despejo de água de aquário, ou propositalmente, através do cultivo e venda do organismo para fins paisagístico ou aquarismo (Schooler et al., 2009). Esta espécie é originária da América do Sul, porém tem sido relatada em diversos países como África do Sul, Austrália e Inglaterra, onde tem gerado impactos socioeconômicos e ambientais, alterando a qualidade d'água desses ecossistemas (Bickel & Schooler, 2015).

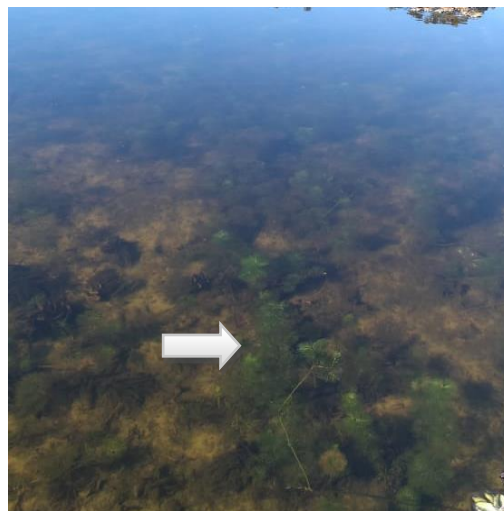
As invasões biológicas quando estabelecidas requerem estratégias de manejos e compromissos de gestão, pois estas invasões são consideradas análogas a desastres ambientais (Ricciardi et al., 2010), pois geram elevados impactos ambientais e econômicos. Dentre os impactos ambientais podemos destacar o potencial risco de interrupção entre interações ecológicas, podendo gerar um desequilíbrio no fluxo de energia através das teias alimentares (Spencer et al., 1991), pois há uma alteração no padrão do funcionamento do ecossistema como perturbação na ciclagem de nutrientes, alteração das comunidades biológicas e da produtividade primária (Mack et al., 2000). Além disso, vale ressaltar que a invasão de novas espécies é considerada uma das principais causadoras do declínio de espécies nativas, e possui também

151 capacidade de levar a extinção (Clavero e Garcia-Berthou., 2005). Logo, a introdução de
152 espécies exóticas para manejo de ambientes aquáticos é considerada um risco para o
153 ecossistema.



154

155 Figura 1) Desenho ilustrado, por Schooler, da macrófita submersa *Cabomba caroliniana*, (a) planta
156 inteira, (b) fruto, (c) flor, (d) folhas superiores inteiras, e (e) folhas inferiores dissecadas. (Fonte:
157 Schooler et al., 2009).



158

159 Figura 2) Fotografia da ocorrência da macrófita submersa *C. caroliniana* no Lago do Centro Esportivo,
160 localizado na Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Imagem: Autores.

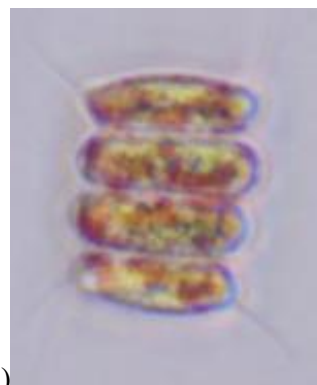
161 *Fitoplâncton*

162 O plâncton é definido como um conjunto de organismos errantes, ou seja, que não realizam
163 movimentos opostos aos movimentos da água. E este grupo é constituído pelo zooplâncton,
164 bacterioplâncton e pelo fitoplâncton (Esteves & Suzuki, 2011). O fitoplâncton, por sua vez, é
165 composto por microrganismos fotoautotróficos, mixotróficos, coloniais ou solitários, e a grande
166 maioria vivem em suspensão na coluna d'água (Esteves & Suzuki, 2011; Reynolds, 1988).

167 Em ecossistemas continentais, a comunidade fitoplanctônica, juntamente com as
168 macrófitas aquáticas, representa a base da teia trófica aquática, transferindo o carbono orgânico
169 para níveis tróficos superiores (Fernandes et al., 2005). Vale ressaltar que o fitoplâncton é
170 responsável por cerca de 60% da produção primária global (Falkowski & Raven, 2013), sendo
171 de extrema importância na região oceânica. Porém, a predominância de um ou outro grupo que
172 compõem o fitoplâncton está associado a características do local em que se encontram, por
173 exemplo, *Chlorophyceae* e *Cyanophyceae* estão entre os grupos predominantes em ambientes
174 de água doce (Esteves & Suzuki, 2011).

175 O grupo *Chlorophyceae* é representado por algas verdes, como a microalga
176 *Desmodesmus communis* (Figura 3) é um grupo cosmopolita, altamente polimórfico, cuja
177 ocorrência foi relatada para ambientes com diferentes estados tróficos (Bicudo e Meneses,
178 2006), e compõem a ordem *Chlorococcales*. Sua característica polimórfica permite que sejam
179 encontrados cenóbios com duas, quatro ou oito células (Trainor, 1998). O número de cenóbios
180 pode variar de acordo com mudanças no ambiente em que se encontram, uma vez que células
181 na presença de predadores obtiveram maior volume (Lürling et al., 1997).

182 Por outro lado, sabe-se que as florações de algas e cianobactérias, estão frequentemente
183 correlacionadas à eutrofização dos ambientes aquáticos, causando problemas ambientais em
184 todo o mundo (O'Neil et al., 2012; Zhang, 2014). Comumente períodos de maior
185 desenvolvimento fitoplanctônico estão associados a alterações em fatores que regulam o
186 crescimento celular (Reynolds, 2006).



A)

B)

Figura 3) A) Imagem da alga *D. communis* não exposta ao corante vermelho neutro, fonte: Autores. B) Imagem adaptada de Da Luz e colaboradores (2016) *D. communis* corado com Vermelho Neutro. Barra de escala = 10 μ m.

O restabelecimento de comunidades de macrófitas pode propiciar o controle no crescimento fitoplanctônico (Chen et al., 2012), viabilizar a reabilitação da qualidade de água e promover alternativas para manejo em lagos rasos (Søndergaard et al., 2010)

Dessa forma, o aumento nutricional em ambientes aquáticos, principalmente de nitrogênio e fósforo, acarreta em um aumento significativo destes organismos (Câmara et al., 2009). Por causa das florações, os ecossistemas aquáticos diminuem a transparência da água, passando para o estado alternativo de águas turbas (Scheffer et al., 1993; Wetzel, 2001). Devido ao aumento da turbidez há uma diminuição da penetração de luz nestes corpos d'água, diminuindo os níveis de oxigênio e levando a perdas significativas de diversidade (Codd et al., 2005; Wetzel, 2001).

A dinâmica de ecossistemas aquáticos pode ser regulada por mecanismo como o *bottom-up*, determinados por nutrientes (micronutrientes e macronutrientes), temperatura da água e/ou disponibilidade de luz (Bohnenberger et al., 2018; Horn & Horn, 2008). Diversos processos biológicos, físicos e químicos influenciam a distribuição desses organismos (Falkowski & Raven, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar experimentalmente a influência do sombreamento e do lixiviado de *Cabomba caroliniana* na microalga *Desmodesmus communis*, sob diferentes concentrações de nitrato.

Objetivos específicos

- 1) Comparar o padrão de crescimento de *D. communis* frente a diferentes concentrações de nitrato;
- 2) Verificar se o sombreamento gerado pelas macrófitas natural e artificial de *Cabomba caroliniana* expostos à três concentrações de nitrato influenciarão no crescimento de *D. communis*;
- 3) Analisar o efeito do lixiviado de *C. caroliniana* no crescimento de *D. communis* expostos às três concentrações de nitrato;

REFERÊNCIAS

- 206 ABE, D. S.; TUNDISI, J. G.; et al. A continental-scale survey by hydroplane of the ecological
207 quality of the superficial waters in Brazil. In **Proceedings of the 11 th World Lakes**
208 **Conference—Proceedings**, v. 1, p. 324-330, 2006.
- 209 ABELL, J. M.; ÖZKUNDAKCI, D.; HAMILTON, D. P. Nitrogen and Phosphorus Limitation
210 of Phytoplankton Growth in New Zealand Lakes: Implications for Eutrophication Control.
211 **Ecosystems**, v. 13, n. 7, p. 966–977, nov. 2010.
- 212 ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C.; et al. Field evidence of the influence of aquatic
213 macrophytes on water quality in a shallow eutrophic lake over a 13-year period. **Acta**
214 **Limnologica Brasiliensia**, v. 26 n. 2, 176-185, 2014.
- 215 ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Ed.). **Gestão integrada de mananciais de**
216 **abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar, 2005.
- 217 BALIAN, E. V.; SEGERS, H.; MARTENS, K.; LÉVÉQUE, C. The freshwater animal diversity
218 assessment: an overview of the results. **Freshwater animal diversity assessment**, p. 627-637,
219 2007.
- 220 BICKEL, T. O.; PERRETT, C. **Competitive performance of Cabomba caroliniana**. 2014.
- 221 BICKEL, T.O.; SCHOOLER, S. S. Effect of water quality and season on the population
222 dynamics of Cabomba caroliniana in subtropical Queensland, Australia. **Aquatic Botany**, v.
223 123, p. 64-71, 2015.
- 224 BOHNENBERGER, J. E., RODRIGUES, L. R., DA MOTTA-MARQUES, D., CROSSETTI,
225 L. O. Environmental dissimilarity over time in a large subtropical shallow lake is differently
226 represented by phytoplankton functional approaches. **Marine and Freshwater Research**, v.
227 69, n. 1, p. 95-104, 2018.
- 228 CODD, G. A., LINDSAY, J., YOUNG, F. M., MORRISON, L. F., METCALF, J. S. Harmful
229 cyanobacteria. In: **Harmful cyanobacteria**. Springer, Dordrecht, 2005. p. 1-23.
- 230 CÂMARA, F. R. A., LIMA, A. K. A., ROCHA, O., CHELLAPPA, N. T. The role of nutrient
231 dynamics on the phytoplankton biomass (chlorophyll-a) of a reservoir-channel continuum in a
232 semi-arid tropical region. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 21, n. 4, p. 431-439, 2009.

233 CHAMBERS, P. A., LACOUL, P., MURPHY, K. J., THOMAZ, S. M. Global diversity of
 234 aquatic macrophytes in freshwater. In: **Freshwater animal diversity assessment**. Springer,
 235 Dordrecht, 2007. p. 9-26.

236 CHEN, J., ZHANG, H., HAN, Z., YE, J., LIU, Z. The influence of aquatic macrophytes on
 237 *Microcystis aeruginosa* growth. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 130-133, 2012.

238 CLAVERO, M.; GARCÍA-BERTHOUE, E.. Invasive species are a leading cause of animal
 239 extinctions. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 3, p. 110, 2005.

240 CONLEY, D. J., PAERL, H. W., HOWARTH, R. W., BOESCH, D. F., SEITZINGER, S. P.,
 241 KARL E, K. E.; GENE E, G. E. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. **Science**,
 242 v. 123, p. 1014-1015, 2009.

243 CUMMINS, K. W., WILZBACH, M. A. Rivers and streams: ecosystem dynamics and
 244 integrating paradigms. 2008.

245 DA LUZ, D. S., DA SILVA, D. G., SOUZA, M. M., GIROLDO, D., MARTINS, C. D. M. G.
 246 Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae
 247 *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. **Phycological research**, v. 64, n. 1, p. 56-
 248 60, 2016

249 DE MORAES, L. A. F. A visão integrada da ecohidrologia para o manejo sustentável dos
 250 ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 676-687, 2009.

251 ESTEVES, F.A. Considerações sobre a aplicação da tipologia de lagos temperados a lagos
 252 tropicais. **Acta Limnologia Brasiliensia**, v. 2, p. 3-28, 1988

253 ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. 3ª edição. **Interciência, Rio de Janeiro**, 2011.

254 ESTEVES, F.A.; SUZUKI, M. S. Comunidade fitoplanctônica. **fundamentos de Limnologia**,
 255 v. 3, p. 375-445, 2011.

256 ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia (2nd edn.) Interciência/FINEP. **Rio de Janeiro**,
 257 1998.

258 ESTEVES, F. A.; AMADO, A. M. Nitrogênio. **Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro:**
 259 **Interciências**, p. 239-258, 2011.

260 FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. Princeton University Press,
261 2013

262 FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da
263 ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

264 FERNANDES, L. F.; LAGOS, P. D.; WOSIACK, A. C.; PACHECO, C. V.; DOMINGUES,
265 L.; ZENDER-ALVES, L. Comunidades fitoplanctônicas em ambientes lênticos. **ANDREOLI,**
266 **CV; CARNEIRO, C. Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados.**
267 **Curitiba: Finep**, p. 303-366, 2005.

268 GALLOWAY, J. DENTENER, F., BURKE, M.; DUMONT, E.; BOUWMAN, A. F.; KOHN,
269 R. A. The impact of animal production systems on the nitrogen cycle. **Livestock in a changing**
270 **landscape**, v. 1, p. 83-96, 2010.

271 GRINNELL, J. The origin and distribution of the chest-nut-backed chickadee. **The Auk**, v. 21,
272 n. 3, p. 364-382, 1904.

273 GUIMARÃES, G. L. et al. Metodologia para avaliação de impacto ambiental de macrófitas em
274 mesocosmos. **Planta daninha**, v. 21, n. SPE, p. 37-42, 2003.

275 HENRY-SILVA, G. Z.; CAMARGO, A. F. M. Interações ecológicas entre as macrófitas
276 aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes*. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 445-452,
277 2005.

278 HOGSDEN, K. L.; SAGER, E. P.S; HUTCHINSON, T. C. The impacts of the non-native
279 macrophyte *Cabomba caroliniana* on littoral biota of Kaskashabog Lake, Ontario. **Journal of**
280 **Great Lakes Research**, v. 33, n. 2, p. 497-504, 2007.

281 HORN, H.; HORN, W. Bottom-up or top-down—How is the autotrophic picoplankton mainly
282 controlled? Results of long-term investigations from two drinking water reservoirs of different
283 trophic state. **Limnologica**, v. 38, n. 3-4, p. 302-312, 2008.

284 HU, Z., GUO, L.; LIU, T., CHUAI, X.; CHEN, Q.; SHI, F.; YANG, L. Uniformisation of
285 phytoplankton chlorophyll a and macrophyte biomass to characterise the potential trophic state
286 of shallow lakes. **Ecological indicators**, v. 37, p. 1-9, 2014.

287 HUGHES, J.; BOND, H.; KNIGHT, C.; STANLEY, K. Challenges for Freshwater
 288 Ecosystems. **Water Science, Policy, and Management: A Global Challenge**, p. 75-95, 2019.

289 JEPPESEN, E.; SØNDERGAARD, M.; MEERHOFF, M.; LAURIDSEN, T. L.; JENSEN, J.
 290 P. Shallow lake restoration by nutrient loading reduction—some recent findings and challenges
 291 ahead. In: **Shallow Lakes in a Changing World**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 239-252.

292 JUNK, W.J. Áreas inundáveis-um desafio para limnologia. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 4, p.
 293 775-795, 1980.

294 KALFF, J. **Limnology: inland water ecosystems**. 2002.

295 LEHNER, B; DÖLL, P. Development and validation of a global database of lakes, reservoirs
 296 and wetlands. **Journal of hydrology**, v. 296, n. 1-4, p. 1-22, 2004.

297 LITCHMAN, E.; KLAUSMEIER, C. A.; BOSSARD, P. Phytoplankton nutrient competition
 298 under dynamic light regimes. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 4 part 2, p. 1457-1462,
 299 2004.

300 LÜRLING, M.; VAN DONK, E. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by
 301 infochemicals released in situ from zooplankton grazers. **Limnology and oceanography**, v.
 302 42, n. 4, p. 783-788, 1997.

303 MACK, R.N. et al. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and
 304 control. **Ecological applications**, v. 10, n. 3, p. 689-710, 2000.

305 MEA, Millennium Ecosystem Assessment. Ecosystems and Human Well-Being: wetlands and
 306 water synthesis. 2005.

307 MEERHOFF, M; MAZZEO, N; MOSS, B. RODRÍGUEZ-GALLEGO, L. The structuring role
 308 of free-floating versus submerged plants in a subtropical shallow lake. **Aquatic Ecology**, v. 37,
 309 n. 4, p. 377-391, 2003.

310 MOSS, B. R. **Ecology of Freshwaters: Earth's Bloodstream**. John Wiley & Sons, 2018.

311 NYENJE P. M., FOPPEN, J. W., UHLENBROOK, S., KULABAKO, R., MUWANGA,
 312 A. Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa—a review. **Science**
 313 **of the total environment**, v. 408, n. 3, p. 447-455, 2010.

- 314 O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J. The rise of harmful
315 cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful**
316 **algae**, v. 14, p. 313-334, 2012.
- 317 ØRGAARD, M. The genus *Cabomba* (Cabombaceae)—a taxonomic study. **Nordic Journal of**
318 **Botany**, v. 11, n. 2, p. 179-203, 1991.
- 319 PEDRALLI, G. Macrófitos aquáticos: técnicas e métodos de estudos. **Estudos de Biologia**, v.
320 26, p. 5-24, 1990.
- 321 PEREIRA, S. A.; CRT TRINDADE; ALBERTONI E. F.; PALMA-SILVA C. Aquatic
322 macrophytes as indicators of water quality in subtropical shallow lakes, Southern Brazil. **Acta**
323 **Limnologica Brasiliensia**, v. 24, n. 1, p. 52-63, 2012.
- 324 REYNOLDS, C.S. The ecology of phytoplankton-Ecology, biodiversity and conservation.
325 2006.
- 326 RICCIARDI, A.; PALMER, M. E.; YAN, N. D. Should biological invasions be managed as
327 natural disasters?. **BioScience**, v. 61, n. 4, p. 312-317, 2011.
- 328 RICE, E. L. Allelopathy (2nd ed.). New York: Academic, 1984.
- 329 RIDLEY, B. A; DYE, J. E.; WALEGA, J. G.; ZHENG, J.; GRAHEK, F. E.; RISON, W. On
330 the production of active nitrogen by thunderstorms over New Mexico. **Journal of Geophysical**
331 **Research: Atmospheres**, v. 101, n. D15, p. 20985-21005, 1996.
- 332 ROSOLEN, V., DE-CAMPOS, A. B.; GOVONE, J. S.; ROCHA, C., Contamination of wetland
333 soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas
334 Gerais, Brazil). **Catena**, v. 128, p. 203-210, 2015
- 335 SCHEFFER, M. Ecology of shallow lakes. Boston: Kluwer Academic Publishers. 357 p., 2004.
- 336 SCHEFFER, M.; HOSPER, S. H.; MEIJER, M. L.; MOSS, B.; JEPPESEN, E. Alternative
337 equilibria in shallow lakes. **Tree**, v. 8, n. 8, p. 275-279, 1993.
- 338 SCHEFFER, M. **Ecology of shallow lakes**. Springer Science & Business Media, 1997.
- 339 SCHOOLER, S; CABRERA-WALSH, W.; JULIEN, M. *Cabomba caroliniana* gray
340 (Cabombaceae). **Biological control of tropical weeds using arthropods**, p. 88-107, 2009.

341 SCOTT, J. Thad et al. Denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and
 342 nitrogen fixation along a nitrate concentration gradient in a created freshwater
 343 wetland. **Biogeochemistry**, v. 87, n. 1, p. 99-111, 2008

344 SETARO, F. V.; MELACK, J. M. Responses of phytoplankton to experimental nutrient
 345 enrichment in an Amazon floodplain lake1: Amazon lake nutrient limitation. **Limnology and**
 346 **Oceanography**, v. 29, n. 5, p. 972–984, 1984.

347 SILVA, D. S.; MARQUES, E. E.; LÓLIS, S. F. Macrófitas aquáticas: “vilãs ou
 348 mocinhas”? **Revista Interface (Porto Nacional)**, n. 04, 2012.

349 SMITH, V. H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem.
 350 **Environmental Science and Pollution Research**, v. 10, n. 2, p. 126–139, 2003.

351 SMITH, V. H. Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and
 352 phosphorus enrichment. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 1part2, p. 377–384, 2006.

353 SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here?
 354 **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 4, p. 201–207, 2009.

355 SPENCER, C.N.; MCCLELLAND, B. R.; STANFORD, J. A. Shrimp stocking, salmon
 356 collapse, and eagle displacement. **BioScience**, v. 41, n. 1, p. 14-21, 1991.

357 SØNDERGAARD, M. et al. Submerged macrophytes as indicators of the ecological quality of
 358 lakes. **Freshwater Biology**, v. 55, n. 4, p. 893–908, 2010.

359 THOMAZ, S. M.; CUNHA, E. R. DA. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic
 360 ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages’
 361 composition and biodiversity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 02, p. 218–236, 2010.

362 THORP, J. H. (ED.). **Ecology and classification of North American freshwater**
 363 **invertebrates**. 2. ed ed. San Diego: Academic Press, 2001.

364 TRAINOR, F. R. **Biological aspects of Scenedesmus (Chlorophyceae)--phenotypic**
 365 **plasticity**. Berlin: J. Cramer, 1998.

366 VAN GEEST, G. J. et al. Vegetation abundance in lowland flood plan lakes determined by
 367 surface area, age and connectivity: *Regulation of vegetation abundance in flood plain lakes*.
 368 **Freshwater Biology**, v. 48, n. 3, p. 440–454, 2003.

369 WANG, H.; WANG, H. Mitigation of lake eutrophication: Loosen nitrogen control and focus
 370 on phosphorus abatement. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 10, p. 1445–1451, 2009.

- 371 WETZEL, R. G. et al. **Limnologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. Serviço de
372 Educação, 1993.
- 373 WETZEL, R. G. **Limnology: lake and river ecosystems**. 3rd ed ed. San Diego: Academic
374 Press, 2001.
- 375 ZENG, L. et al. Effect of submerged macrophyte restoration on improving aquatic ecosystem
376 in a subtropical, shallow lake. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 578–587, 2017.
- 377 ZHANG, C. et al. Modeling nutrients, oxygen and critical phosphorus loading in a shallow
378 reservoir in China with a coupled water quality – Macrophytes model. **Ecological Indicators**,
379 v. 66, p. 212–219, 2016.
- 380 ZHANG, T. et al. Allelopathic control of freshwater phytoplankton by the submerged
381 macrophyte *Najas minor* All. **Acta Ecologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 351–355, 2014.

Artigo

Manuscrito a ser submetido para revista *Aquatic Botany*¹

¹ O manuscrito foi formatado seguindo as normas gerais da revista *Aquatic Botany*, entretanto as figuras foram incluídas no corpo do texto, não seguindo essa norma do periódico, com intuito de facilitar a leitura

Resposta de *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald ao sombreamento e lixiviado de *Cabomba caroliniana* A. Gray sob diferentes concentrações de nitrato: uma abordagem experimental

Manuela Passos Tourinho^{1*}, Pablo Santos Guimarães¹, Emanuela Garbin Martinazzo¹, Ana Silvia Rolon²

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Avenida Itália, Km 8, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS – Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Av. Marechal Floriano Peixoto nº 2236, Centro, 96170-000, São Lourenço do Sul, RS – Brasil.

*Autora para correspondência: manuela.passos@hotmail.com

Resumo

A eutrofização em lagos rasos é uma problemática mundial. A relação antagônica macrófita-fitoplâncton tem recebido atenção crescente como potencial fator controlador de florações de algas. Nosso objetivo foi avaliar a influência do sombreamento e do lixiviado da macrófita *Cabomba caroliniana* sobre a microalga *Desmodesmus communis*, em diferentes concentrações de nitrato. Para isso foram realizados dois experimentos distintos a fim de avaliar a presença física da planta natural, artificial e seu lixiviado sobre a população de *D. communis* em diferentes concentrações de nitrato. Encontramos um efeito negativo no crescimento da alga resultante do sombreamento de estruturas submersas e do lixiviado da macrófita, assim como a influência das concentrações do nitrato. Nossos resultados demonstram que macrófitas submersas têm o potencial de mitigar ecossistemas aquáticos dominados por *D. communis*.

Palavras-chave: Alelopatia, Competição, Eutrofização, Lagos rasos, Nitrogênio.

Introdução

Os ecossistemas de água doce possuem valor essencial enquanto recurso natural, científico e político (Hughes et al., 2019). Tais ecossistemas provêm recursos imprescindíveis à manutenção da biodiversidade e de outros serviços ecossistêmicos, os quais possibilitam desenvolvimento social e econômico com qualidade de vida.

Os ecossistemas aquáticos sustentam funções como o abastecimento de água potável para consumo, alimentação, transporte, recreação e recursos energéticos (Moss, 2018). Apesar de cobrir 0,8% da superfície terrestre (Gleick, 1996), estes ecossistemas suportam/comportam elevada diversidade de espécies, cerca de 10% de plantas e animais globalmente descritos habitam estes ambientes (Balian et al., 2008).

Ainda que estes ecossistemas sejam de extrema relevância ecológica e social, eles estão entre os mais ameaçados do mundo (Dudgeon et al., 2005; Gardner et al., 2015). A degradação destes ambientes está frequentemente associada à exploração de recursos naturais, desenvolvimento urbano e deposição excessiva de nutrientes (Hughes et al., 2019). Resultando na alteração dos padrões de precipitação e escoamento, além de influenciar no declínio da qualidade da água e na biodiversidade destes ecossistemas (Bogardi, 2020; Dudgeon et al., 2005).

A eutrofização é caracterizada como a resposta do ecossistema à entrada excessiva de nutrientes como fósforo e nitrogênio, e têm sido relatada como um problema recorrente em ecossistemas aquáticos e também, está entre as principais causas da degradação e poluição da água (Schindler, 2012). Embora o processo de eutrofização e suas consequências estejam bem documentados na literatura, há uma lacuna sobre quais processos biológicos estão sendo influenciados pelo aumento da carga nutricional (Rabalais, 2002), como o nitrato.

O crescimento excessivo do fitoplâncton pode gerar um aumento da turbidez, podendo cobrir a superfície d'água, e com isso limitar a penetração de luz, diminuir os níveis de oxigênio dissolvido na água, e consequentemente diminuir a qualidade da água (Declerck et al., 2011). A diminuição dos níveis de oxigênio afeta toda a biota aquática. Em relação às plantas aquáticas, o crescimento excessivo de fitoplâncton e suas consequências tendem a ocasionar a senescência e aumento na decomposição das plantas aquáticas, intensificando a condição de hipóxia do sistema e a perda de habitat para outros organismos, impactando severamente a biodiversidade aquática (Jeppensen et al., 1998; Phillips et al., 2016).

No entanto, a presença de macrófitas aquáticas submersas tende a exercer um efeito positivo nos ecossistemas aquáticos, pois diminuem a ressuspensão do sedimento, controlam o crescimento excessivo de fitoplâncton, assim promovendo o estado alternativo de águas claras (Scheffer, 1993). Além disso, servem de refúgio e esconderijos para outros organismos,

auxiliando na biodiversidade destes locais (Lürling et al., 2006; Schriver et al., 1995; Zhao 2016).

A relação antagônica entre fitoplâncton e as plantas aquáticas podem resultar da competição por nutrientes na coluna d'água, sombreamento e alelopatia (Pokorny' et al., 1984; Vanderstukken et al., 2011). Diversas linhas de pesquisa evidenciam/elucidam, através de experimentos, que algumas plantas possuem capacidade de inibir ou retardar crescimento do fitoplâncton (Amorim et al., 2019; Vanderstukken et al., 2011; Zhao et al., 2016), porém esta competição pode ocorrer em detrimento de diversos fatores como alelopatia, competição por nutrientes e também por luz. Logo, para identificar quais fatores estão influenciando é necessário realizar experimentos que consigam minimizar ou eliminar algumas variáveis.

Os efeitos da competição interespecífica são mecanismos ecológicos importantes na relação antagônica entre macrófita e fitoplâncton e podem ser elucidados por meio de experimentos de coexistência (Cross et al., 2007; Vanderstukken et al., 2011). Como por exemplo, os trabalhos que utilizam extrato ou filtrados com lixiviado conseguem elucidar se há competição por alelopatia, através da liberação de compostos alelopáticos oriundo das plantas (Lürling et al., 2006, Vanderstukken et al., 2014). Sendo que, o efeito da competição por sombreamento pode ser evidenciado por meio de experimentos com a presença de plantas artificiais, enquanto competição por nutrientes através de experimentos com condições nutricionais controladas na coocorrência dos organismos (Lürling et al., 2006; Vanderstukken et al., 2011).

O entendimento destes mecanismos interespecíficos e das interações biológicas, em termos de dinâmica de populações, podem auxiliar no entendimento do funcionamento e da estabilidade dos ecossistemas aquáticos (Santonja et al., 2018). Consequentemente possuem capacidade de contribuir no desenvolvimento de estratégias manejo afim de promover a restauração destes ambientes aquáticos, como por exemplo, reverter eutrofização e estado alternativo de águas turbas (Zhao et al., 2016). através do controle da entrada excessiva de matéria orgânica, e com isso promover a integridade ecológica destes ambientes (Vanderstukken et al., 2011; Santonja et al., 2018).

A macrófita submersa *Cabomba caroliniana* A. Gray possui crescimento vegetativo rápido, é originária da América do Sul (Bickel & Schooler, 2015; Hogsden et al., 2007; Ørgaard, 1991), e frequentemente é relatada em áreas úmidas do Sul do Brasil (Pereira et al., 2012; Rolon et al., 2010; They et al., 2015). Esta espécie é considerada uma competidora eficaz por nutriente e seus compostos alelopáticos possuem a capacidade de reduzir a biomassa de algas verdes e de cianobactérias (Finkler, 2009; Nakai et al., 1996). Por outro lado, em decorrência do uso

ornamental, como planta de aquário e paisagismo, a *C. caroliniana* foi introduzida em diversos ecossistemas de água doce pelo mundo, como países da Oceania e Europa (Bickel & Schooler, 2015; Wilson et al., 2007).

As algas planctônicas da classe *Chlorophyceae* são frequentemente utilizadas em experimentos para identificar a produção e atividade de compostos alelopáticos oriundo de macrófitas aquáticas (Leflaive et al., 2008; Lürling et al., 2006). O gênero *Desmodesmus* está entre os mais distribuídos, e possui capacidade de gerar floração algal, principalmente em ambiente com elevada concentração nutricional (Hentschke & Torgan, 2010; Saadoun et al., 2008). A alga *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald já foi relatada associada a condições de poluição, em um lago raso subtropical no sul do Brasil (Andrade & Giroldo, 2014). Essa espécie é cosmopolita, tem alta capacidade de tolerar diferentes condições ambientais, e também por ser de fácil cultivo, frequentemente, é utilizada em experimentos de coexistência com macrófitas, assim como, em experimentos toxicológicos (Santonja et al., 2018, Trainor, 1998).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar experimentalmente o potencial regulatório da macrófita submersa *Cabomba caroliniana* sobre a microalga *Desmodesmus communis*, em termos de sombreamento, competição por nitrato e alelopatia. Nesse sentido, buscamos responder as seguintes questões: 1) A macrófita aquática pode influenciar a densidade e viabilidade da microalga, por ação do sombreamento e competição por nitrato?; 2) O lixiviado de *C. caroliniana* controla a microalga *D. communis*?; 3) O potencial competitivo e alelopático varia conforme a concentração de nitrato?

2. Material e métodos

2.1 Organismos teste

2.1.1 *Desmodesmus communis*

Foram utilizadas cepas de *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald (*Chlorophyceae*) do Banco de Cultivo de Microalgas Dulcícolas do Instituto de Ciências Biológicas (BCMD-FURG) registrada com o código CH002. As cepas do banco são mantidas em sala de cultivo com irradiância controlada em aproximadamente 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotoperíodo ajustado com ciclos de 12:12 h claro:escuro e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foi preparada uma pré-cultura da cepa em meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972), ao qual já estava aclimatada, esta cresceu por sete (7), até atingir a fase exponencial. Ao

482 fim do crescimento, a densidade da pré-cultura foi estimada através de contagem em
483 hemocitômetro para verificar se a cultura estava na fase exponencial de crescimento. Antes de
484 ser inoculada no experimento, frações da pré-cultura foram lavadas 3 vezes por centrifugação
485 a 4000 rpm, durante cinco minutos, com os meios de cultura modificados para cada tratamento
486 no qual seria utilizado. Este procedimento foi feito a fim de evitar que os nutrientes do meio
487 WC completo influenciassem nos tratamentos. Após o procedimento de lavagem, a densidade
488 celular foi novamente estimada a fim de definir o volume inicial de inóculo para obter densidade
489 celular inicial entre 10^4 e 10^5 cel mL⁻¹.

490 2.1.2 *Cabomba caroliniana*

491 Os espécimes de *Cabomba caroliniana* A. Gray foram coletados de tanques de cultivo
492 expostos a temperatura e iluminação natural. Os tanques de cultivos estão anexos ao prédio da
493 Botânica, na Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Campus Carreiros. Após coletadas,
494 as plantas foram lavadas em água corrente, e emersas por dez minutos em solução de
495 permanganato de potássio a 5% afim de obter uma efetiva remoção do biofilme com o mínimo
496 de dano a macrófita (adaptado de Sartori, 2004).

497 Antes de ser utilizada no experimento, a macrófita passou por um período de sete dias de
498 aclimação às condições da sala de cultivo. A macrófita de plástico (com arranjo estrutural
499 similar a planta natural) foi exposta ao mesmo procedimento de limpeza que as naturais.
500 Posteriormente as plantas, naturais e artificiais, foram cortadas com tamanho padronizado de
501 aproximadamente 6 cm de comprimento para o experimento de competição.

502 Para experimento de alelopatia, foram cortados nove ramalhetes de plantas naturais,
503 tamanho das plantas e volume de água destilada foram proporcionais aos utilizados no
504 experimento de competição. As plantas ficaram submersas em carboy com 1L de água destilada
505 durante 10 dias para liberação de compostos alelopáticos. O carboy ficou acondicionado na sala
506 de cultivo climatizada, nas mesmas condições dos experimentos, $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de
507 12:12h claro:escuro, luminosidade de $\pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posteriormente, a água destilada
508 exposta às plantas foi filtrada através de papel filtro GF-3, com auxílio de bomba a vácuo, para
509 retirada de partículas maiores. Para evitar contaminação, os sais do meio de cultura WC do
510 grupo 1 foram filtrados em holder com filtro milipore (0,2 μm) e adicionados na água com o
511 lixiviado.

512 2.2 Experimentos

513 2.2.1 Experimento coexistência

514 Para analisar a competição por luz da macrófita *Cabomba caroliniana* e *Desmodesmus*
515 *communis* sob três concentrações de nitrato, foi realizado um experimento com duração de 10
516 dias. O experimento ocorreu em Erlenmeyer de 100 ml cobertos com tela sombrite (50% de
517 cobertura) no fundo e na lateral (até a altura de 50 mL), afim de simular condições de incidência
518 natural de luz.

519 O experimento foi delineado considerando três níveis: 1) Controle: *D. communis* na
520 ausência da macrófita; 2) Planta artificial: *D. communis* juntamente com macrófita artificial,
521 com a finalidade de avaliar o sombreamento causado pelas plantas; 3) Planta natural: *D.*
522 *communis* coexistindo com *C. caroliniana*, para avaliar competição por sombreamento e
523 nutrientes.

524 Os três níveis de tratamento acima descritos foram submetidos a três concentrações de
525 nitrato – “Nitrato - NO_3^- ”, sendo a maior concentração foi de 1000 $\mu\text{g/L}$, aqui denominada
526 elevada, presente no meio de cultura WC, e os demais valores foram diluídos, apenas no nitrato,
527 na razão 1/3, sendo a concentração intermediária equivalente a 333,33 $\mu\text{g/L}$ e a concentração
528 mais baixa equivalente a 111,11 $\mu\text{g/L}$ (Material suplementar 1).

529 A alteração nas concentrações do nutriente foi realizada a partir da diluição do nitrogênio
530 presente no meio de cultura, sob a forma de nitrato de sódio (NaNO_3). Todas as concentrações
531 são equivalentes a valores encontrados em ambientes lênticos subtropicais hipereutrofizados
532 (Albertoni et al., 2014). Cada réplica recebeu 50 mL de meio WC com sua respectiva
533 concentração de nitrato.

534 Para cada nível de tratamento (3 de Coexistência X 3 de Nitrato) foram realizadas
535 triplicatas, totalizando 27 amostras. Os experimentos ocorreram em sala de cultivo sob as
536 mesmas condições da pré-cultura. Os recipientes foram agitados diariamente através da mesa
537 agitadora, duas vezes por dia por 10 min a 60 rpm, em períodos alternados de luz, para
538 homogeneização da biomassa (adaptado de Lüring et al., 2006). Os frascos foram rearranjados
539 randomicamente, a cada dois dias, para diminuição do efeito de possível diferença de
540 intensidade luminosa. Amostras para densidade e viabilidade celular foram retiradas em
541 condições de assepsia a cada dois dias.

542

2.2.2 Experimento alelopatia

O experimento foi delineado para analisar o efeito que o lixiviado da macrófita *C. caroliniana* exerce sobre a alga *D. communis* e teve duração de 10 dias em condições de exposição semelhantes ao experimento coexistência.

O experimento consistiu de dois níveis do fator “Lixiviado”: 1) Controle: *D. communis* em meio de cultura WC preparado com água destilada e 2) Lixiviado: *D. communis* em meio de cultura WC preparado com água do lixiviado. Ambos os níveis de tratamentos foram expostos a três concentrações de nitrato (NO_3^-), (Material suplementar 2). Para cada nível de tratamento (2 de Alelopatia X 3 de Nitrato) foram realizadas réplicas, totalizando 18 amostras.

2.3. Análises de densidade e viabilidade celular

Amostras para análise de densidade celular foram retiradas, em condições de assepsia, a cada 48h em cada um dos experimentos. Foram coletadas alíquotas de 1 ml. Posteriormente foram adicionados 100 µl do corante vermelho neutro (VN) (Saul da Luz et al., 2016), em cada amostra. As amostras foram acondicionadas no escuro à temperatura ambiente durante duas horas, após foram fixadas com formaldeído 4% (concentração final).

As células coradas em vermelho foram consideradas viáveis, pois o corante VN adentra o vacúolo e/ou citoplasma das células vegetais viáveis (Crippen & Perrier, 1974, Zetsche & Meysman, 2012). As células não coradas foram consideradas inviáveis, os valores obtidos foram expressos em porcentagem, seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade celular}(\%) = \frac{\text{total de células coradas}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

A densidade celular total, cujo valor foi expresso em cél mL^{-1} , seguindo a fórmula abaixo. A contagem celular foi realizada no microscópio (CX41F Olympus, Tokyo, Japan), com auxílio de câmara de Neubauer. Para atingir a suficiência amostral, foram contadas pelo menos 400 células por amostra, e calculadas de acordo com a fórmula abaixo (Lourenço, 2006):

$$\text{Densidade celular (cél. mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{número total de células}}{\text{número de quadrantes contados}} \times 10.000$$

A densidade e a viabilidade celular foram usadas para calcular a taxa de inibição de crescimento da alga baseada em cada um destes fatores (*endpoints*), utilizando a fórmula que compara o crescimento algal médio de todos os tratamentos ao longo de dez dias de

experimento, com a média do controle no mesmo período de acordo com a fórmula abaixo (Zuo et al., 2016):

$$\text{Taxa de inibição de crescimento}(\%) = \left(1 - \frac{N}{N_0}\right) \times 100$$

Onde: N e N_0 são a densidade celular (cél mL^{-1}) ou a viabilidade celular dos tratamentos e do controle, respectivamente. Resultados negativos indicam um crescimento algal superior ao controle, enquanto que valores positivos indicam uma diminuição na densidade celular ou viabilidade.

2.4. Análise de dados

Para verificar se houve diferenças significativas na densidade e viabilidade celular da alga entre os tratamentos ao longo dos 10 dias dos experimentos, bem como as interações das variáveis preditoras (Nitrato * Coexistência / Alelopatia Alelopatia * Dia), realizamos Análises de Variância de medidas repetidas com três fatores (dias, coexistência e nitrato) (ANOVA – *Three-Way Mixed*) utilizando os pacotes “tidyverse” (Wickham & Wickham 2017), “ggpubr” e “rstatix” (Kassambra, 2019) no ambiente R (R core team, 2017). Os tratamentos de coexistência (controle, planta artificial e planta natural), os tratamentos de alelopatia (controle e lixiviado) e os níveis de nitrato (elevado, intermediário e baixo) fatores utilizados como fatores independentes entre os sujeitos (*between-subject*) e as coletas realizadas ao longo do tempo experimental foram tratadas como fator dependente dentro dos sujeitos (*within-subject*) (Kassambara, 2018). Previamente as análises foi feito o teste de Shapiro para analisar normalidade e a homogeneidade foi testada pelo teste de Esfericidade.

Para verificar o potencial inibitório gerado pela presença das plantas e do lixiviado no organismo alvo, as taxas de inibição foram calculadas a partir dos valores de densidade e viabilidade. As taxas de inibição da densidade e de viabilidade foram comparadas por meio de Análises de Variância de dois fatores *Two-Way* (Coexistência / Alelopatia e Nitrato) “tidyverse” (Wickham & Wickham 2017), “ggpubr” e “rstatix” (Kassambra, 2019) no ambiente R (R Core Team, 2017). Os fatores coexistência, alelopatia e nitrato foram considerados como fatores independentes entre os sujeitos. Para analisar a normalidade, previamente as análises, realizamos o teste de Shapiro e para verificar a homogeneidade realizamos o teste de Levene.

Para todas as análises estatísticas foram consideradas primeiramente as interações entre os fatores, e sendo essas significativas ($p < 0,05$), os modelos eram decompostos para análises post-hoc (testes de Tukey com correção de Bonferroni para múltiplas comparações).

3. Resultados

3.1. Experimento de coexistência de *Desmodesmus communis* e *Cabomba caroliniana*

3.1.1 Densidade Celular de *D. communis*

Ao longo de todo o experimento (10 dias) a densidade de *D. communis* foi menor na presença da planta natural ou artificial se comparada ao controle (ausência de plantas), nas três concentrações de nitrato ($p < 0,05$, Figura 1). Observou-se uma interação significativa entre os fatores Coexistência *Nitrato*Dia ($F_{20,90} = 2,277$, $p = 0,038$, Figura 1). Indicando que os efeitos da coexistência e do nitrato variaram ao longo do tempo.

No sexto dia de experimento, a presença de plantas naturais ou artificiais influenciaram de forma similar, limitando o aumento na densidade da alga em relação ao controle na maior e menor concentração de nitrato ($p < 0,05$). Em concentração média de nitrato, apenas a presença de planta natural resultou em uma menor densidade de algas ($p < 0,05$), sendo que, os grupos controle e planta artificial tiveram densidades similares e superiores a planta natural ($p < 0,05$).

No oitavo dia, o controle teve maior densidade que na presença de plantas naturais e artificiais apenas na maior concentração do nutriente, nas demais concentrações o controle foi superior apenas a presença de plantas naturais ($p < 0,05$). Já no último dia de experimento, plantas naturais e artificiais demonstraram menor densidade nos níveis de maior e média concentração de nitrato ($p < 0,05$), sendo todos os grupos similares em termos de densidade na menor concentração de nitrato.

A influência da concentração de nitrato na densidade de algas foi detectada no oitavo dia de experimento no grupo controle, quando a densidade celular na maior concentração do nitrato foi superior às demais concentrações do nutriente ($p < 0,05$). No entanto, no décimo dia a densidade foi similar nas três concentrações de nitrato para todos os grupos de coexistência (Figura 1).

Experimento de Coexistência

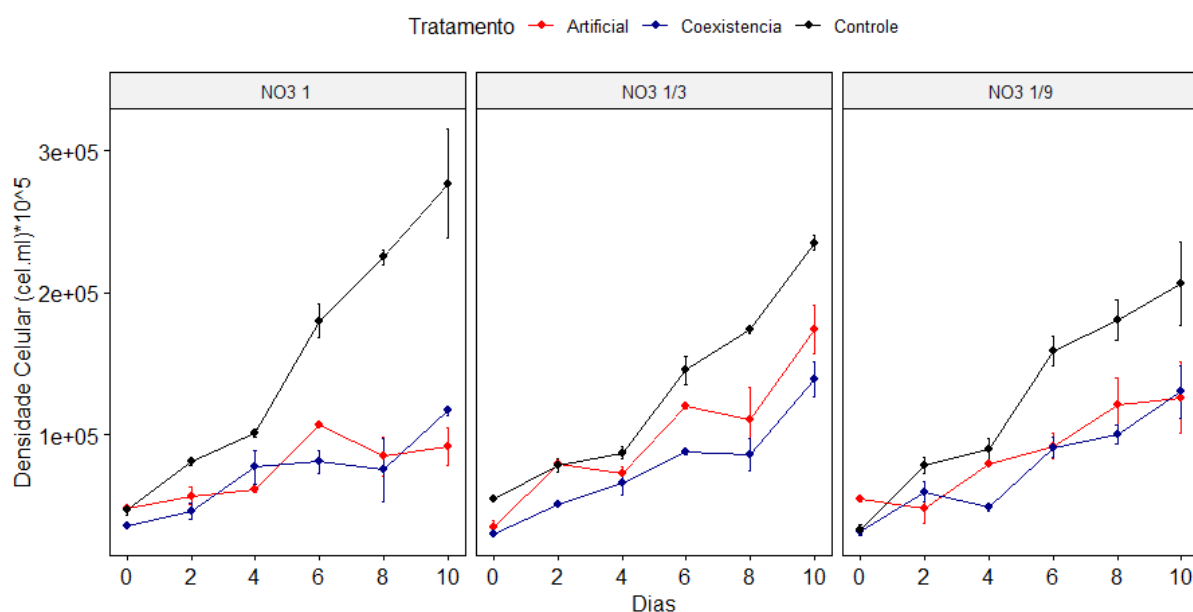


Figura 1) Densidade celular (Cél.ml⁻¹) de *D. communis* ao longo de um período de dez dias. O controle (linha preta), *Cabomba caroliniana* em coexistência com *D. communis* (linha azul) e *D. communis* na presença da planta artificial (linha vermelha) nas três concentrações de nitrato NO3 1 (elevada = 1000 µg/L), NO3 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO3 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).

A taxa de inibição da densidade da densidade celular *D. communis* foi similar entre as três concentrações de nitrato ($F_{2,18}=1,512$; $p=0,24$; Figura 2). Porém variou entre os níveis de coexistência ($F_{2,18}=27,365$; $p<0,0001$). A presença de planta artificial ou planta natural apresentaram uma taxa de inibição da densidade significativamente maior que o grupo controle ($p_{adj}<0,05$).

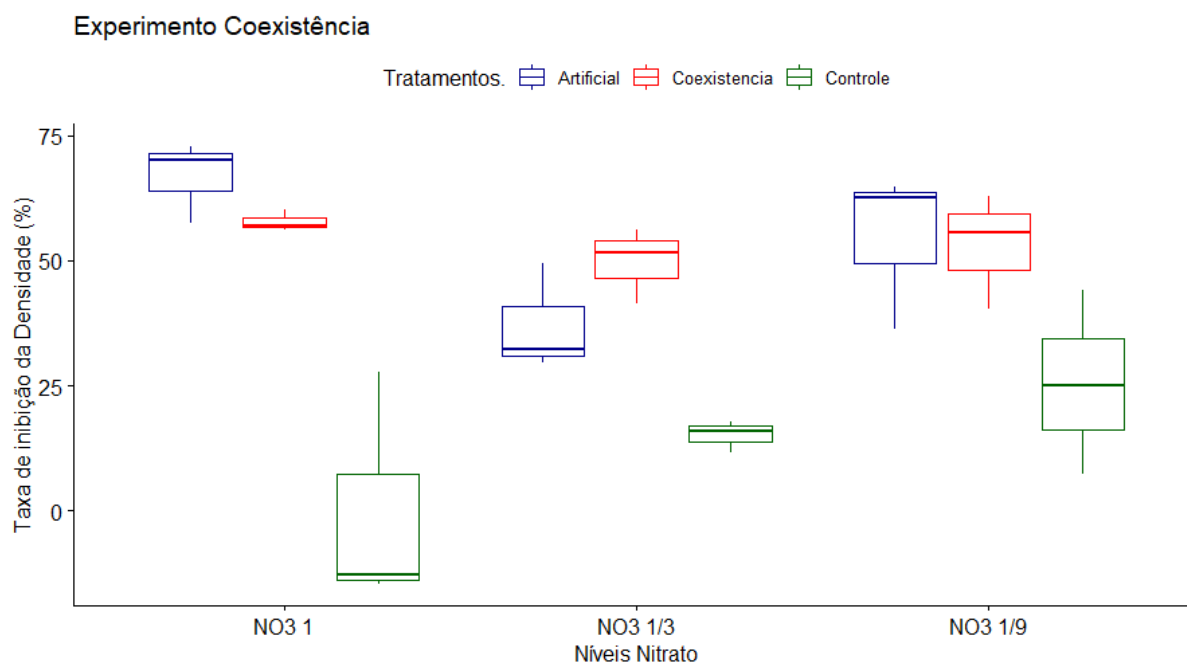


Figura 2) Taxa de inibição (%) com base na densidade celular de *Desmodesmus communis*. Controle (barra verde), coexistência de *D. communis* e *C. caroliniana* (barra vermelha), *D. communis* e planta artificial (barra azul), foram expostos as três concentrações de nitrato.

3.1.2 Viabilidade Celular de *D. communis*

Houve uma interação entre os fatores coexistência e concentração de nitrato no percentual da viabilidade celular de *D. communis* ($F_{4,18} = 3,646$; $p = 0,024$). Considerando os três níveis de concentração de nitrato, a coexistência de plantas naturais ou artificiais não reduziram a viabilidade celular da alga se comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). Assim como, as concentrações de nutrientes não afetaram a viabilidade celular na maioria das amostras analisadas (Figura 3). A única influência da concentração de nitrato verificada foi no grupo controle, onde a menor concentração de nitrato apresentou valores de viabilidade celular menores em relação às demais concentrações ($p < 0,05$).

Experimento de Coexistência

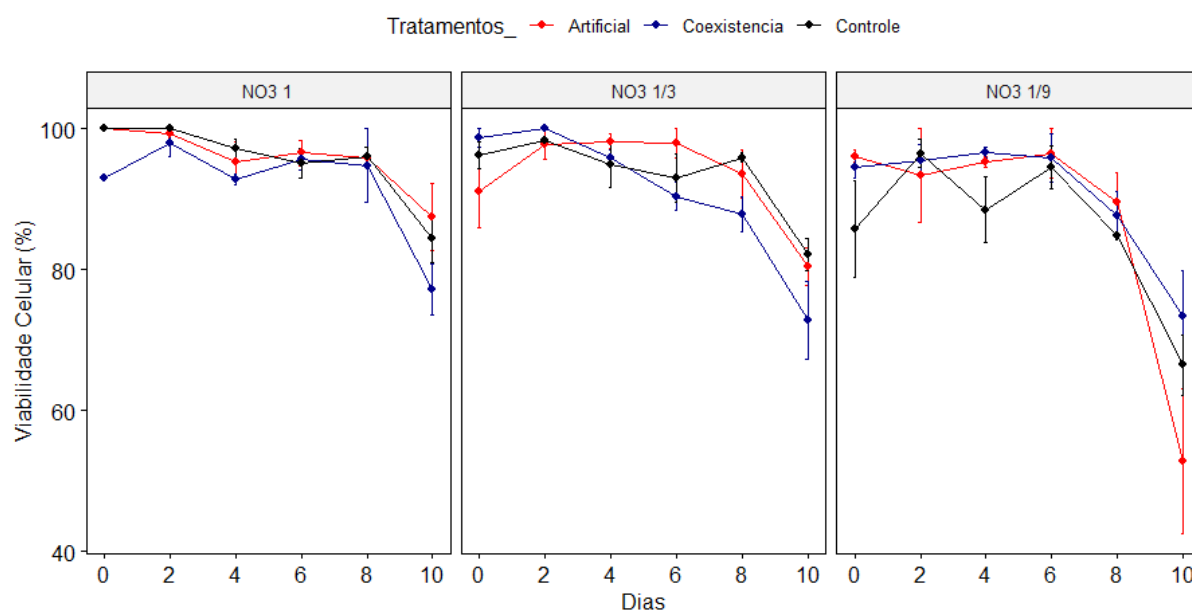


Figura 3) Viabilidade celular (%) de *D. communis* em coexistência com macrófita submersa *Cabomba caroliniana* natural (azul) e artificial (vermelho), grupo controle (preto) ao longo de dez (10) dias, nas três concentrações de nitrato: NO3 1 (elevada = 1000 µg/L), NO3 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO3 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).

A taxa de inibição de crescimento (Figura 4), baseada na viabilidade celular, apresentou uma interação entre coexistência e nitrato marginalmente significativos ($F_{4,18}=2,597$; $p=0,071$). Nas concentrações elevada e intermediária de nitrato a presença da planta natural apresentou maior capacidade inibitória (ca. 8% e 13% respectivamente), quando comparada ao tratamento controle (ca. 0 e 2%, respectivamente).

Entretanto, as diluições do nutriente exerceram um potencial inibitório ($F_{2,18}=10,115$, $p=0,001$), independente do tratamento coexistência, sendo que a baixa concentração do nutriente teve uma taxa de inibição superior às demais concentrações (elevada $p_{adj}=0,002$ e intermediária $p_{adj}=0,021$).

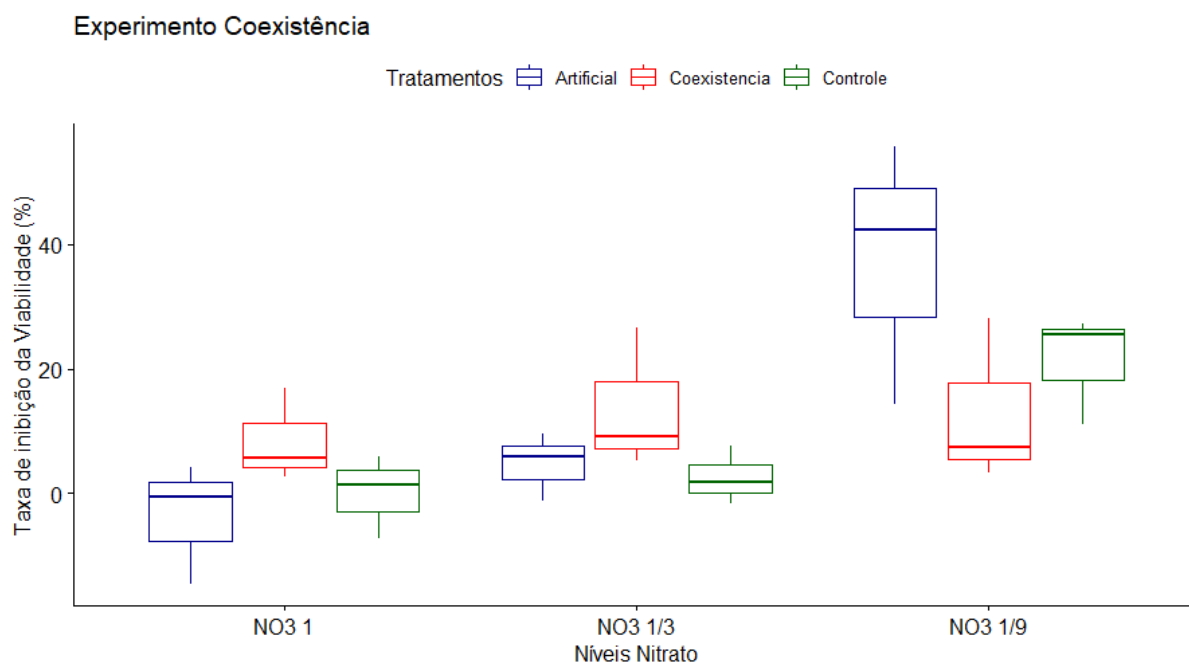


Figura 4) Percentual da taxa de inibição baseado na viabilidade celular de *D. communis*. Controle (barra verde), coexistncia *D. communis* e planta natural (barra vermelha), *D. communis* e planta artificial (barra azul), foram expostos as três níveis de nitrato: NO3 1 (elevada = 1000 µg/L), NO3 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO3 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).

3.2 Experimento lixiviado

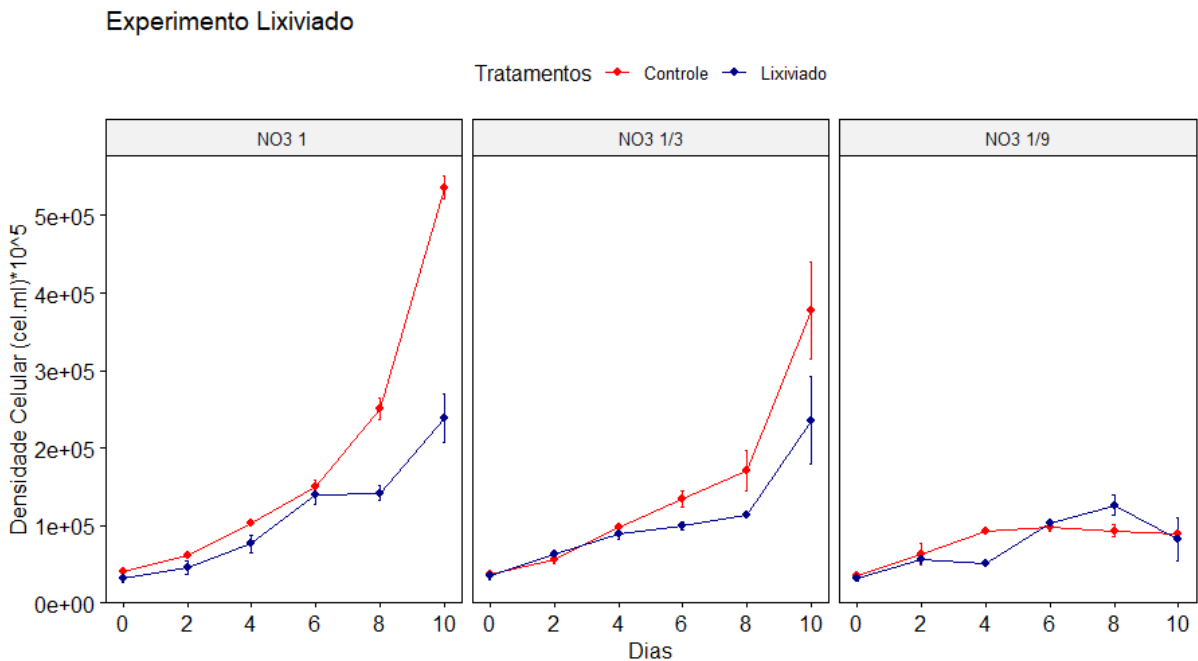
3.2.1 Densidade Celular de *D. communis* exposta ao lixiviado de *C. caroliniana*

Houve interação entre os tratamentos os fatores Lixiviado*Nitrato*Dia ($F_{2,18}=6,093$ $p=0,005$; Figura 5). Verificou-se que a densidade celular, partir do quarto dia de experimento, era resultante do efeito interativo entre os fatores lixiviado e nitrato ($p<0,05$).

Na baixa concentração de nutriente foi possível observar o efeito da ação do lixiviado apenas no quarto dia ($p<0,001$) e nos dias posteriores o efeito não foi evidenciado. No entanto, para concentração intermediária do nitrato esta ação do lixiviado foi observado apenas do sexto dia ($p=0,039$). Na concentração elevada de nitrato, o efeito do lixiviado apareceu a partir do oitavo dia, sendo que, nessa concentração a densidade celular no grupo foi inferior ao controle até o final do experimento ($p<0,003$).

Considerando o efeito das concentrações de nitrato, no grupo controle, a densidade na baixa concentração foi significativamente inferior que na concentração elevada do nutriente do quarto ao décimo dia ($p<0,05$), e inferior à concentração intermediária no sexto e décimo dia ($p<0,05$). No grupo sob a ação do lixiviado, o efeito da concentração de nutriente foi detectada somente no quarto e sexto dia, sendo que as menores densidades ocorreram na menor

686 concentração de nitrato ($p<0,05$), posteriormente, o efeito do nitrato não foi significativo
 687 ($p>0,05$).



689 Figura 5) Densidade celular de *D. communis* (Cél.ml⁻¹) na presença do lixiviado (azul) e no controle
 690 (vermelho) expostos a três concentrações de nitrato : NO3 1 (elevada = 1000 µg/L), NO3 1/3
 691 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO3 1/9 (baixa = 111,11 µg/L) por um período de tempo de dez dias.

692 A taxa de inibição com base na densidade celular pôde ser explicada pela interação entre
 693 os tratamentos lixiviado e nitrato ($F_{2,12}=6,952$; $p=0,01$; Figura 6). Para o grupo controle, houve
 694 um aumento significativo na taxa de inibição da densidade com a redução da concentração de
 695 nitrato, onde a baixa concentração do nutriente apresentou taxa de inibição superior a
 696 concentração elevada ($p_{adj}<0,001$) e intermediária do nitrato ($p_{adj}<0,001$). Foi possível observar
 697 que a concentração intermediária do nitrato apresentou uma taxa de inibição superior à elevada
 698 concentração ($p_{adj}=0,041$). Para o grupo lixiviado, a taxa de inibição da densidade foi similar
 699 entre as concentrações elevada e intermediária, sendo estas significativamente maiores que na
 700 baixa concentração do nutriente ($p_{adj}=0,04$ para ambas). O efeito do lixiviado na inibição da
 701 densidade celular foi significativo nas concentrações elevada ($p_{adj}<0,001$) e intermediária
 702 ($p_{adj}=0,02$).

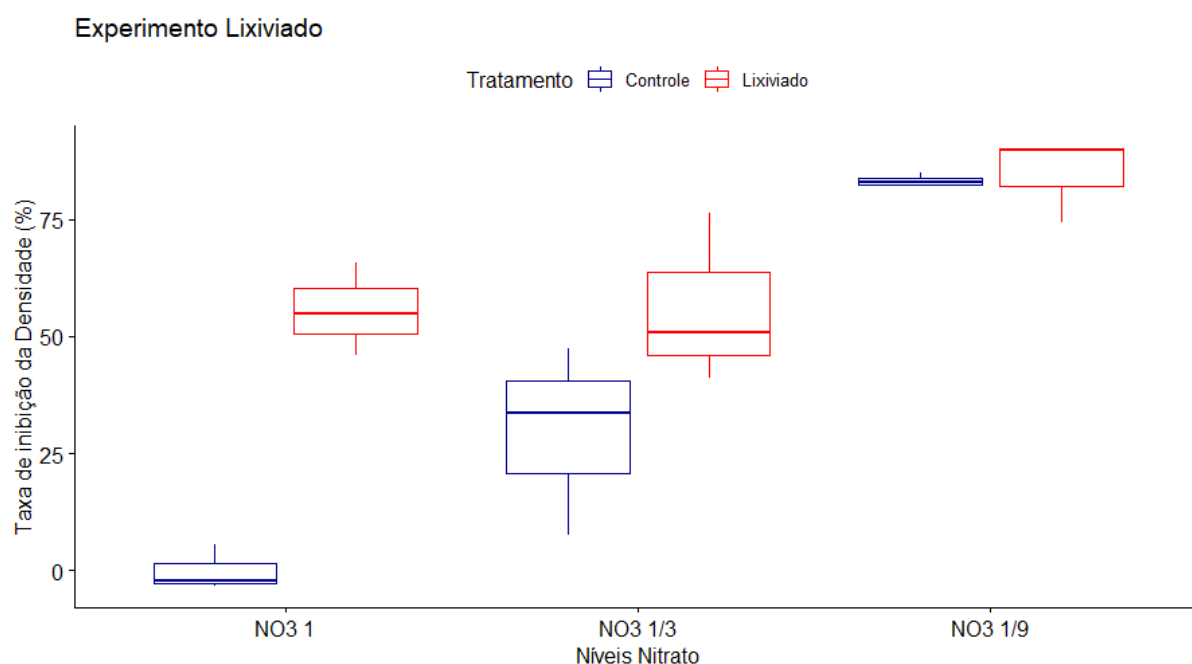


Figura 6) Taxa de inibição (%) baseada na densidade celular de *D. communis* no controle (vermelho) e expostas ao lixiviado (azul) em três diferentes níveis de nitrato : NO₃ 1 (elevada = 1000 µg/L), NO₃ 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO₃ 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).

3.2.2 Viabilidade celular de *D. communis* exposta ao lixiviado de *C. caroliniana*

Para a viabilidade celular (Figura 7), os efeitos dos tratamentos alelopátia e nitrato foram independentes e ambos significativos. A viabilidade no grupo lixiviado foi inferior ao grupo controle ($p_{adj}=0,045$), independente das concentrações de nitrato. A viabilidade na concentração NO₃⁻1/9 foi inferior à observada na concentração NO₃⁻1 ($p_{adj}=0,006$).

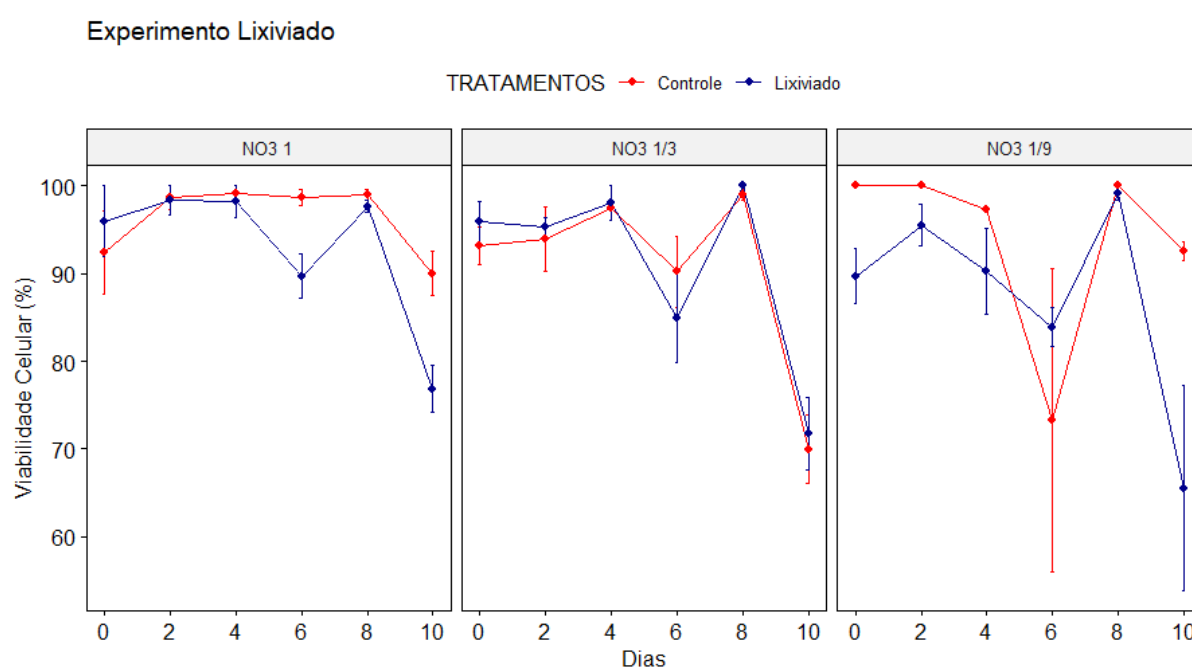


Figura 7) Percentual de viabilidade celular de *D. communis* ao longo dos dez dias de experimento no controle (vermelho) e expostas ao lixiviado (azul) expostos a três concentrações de nitrato: elevada ($\text{NO}_3^- = 1000 \mu\text{g/L}$), intermediária ($\text{NO}_3^- = 333,33 \mu\text{g/L}$), e baixa ($\text{NO}_3^- = 111,11 \mu\text{g/L}$) por um período de tempo de dez dias.

Foram observadas distintas respostas para taxa de inibição de crescimento da viabilidade para o fator alelopatia ($F_{1,12}=8,036$; $p=0,015$; Figura 8), sendo que a taxa de inibição do lixiviado foi superior à taxa de inibição no controle ($p=0,034$). Contudo, não houve diferença significativa entre as concentrações de nitrato ($F_{2,12}=2,648$; $p=0,112$).

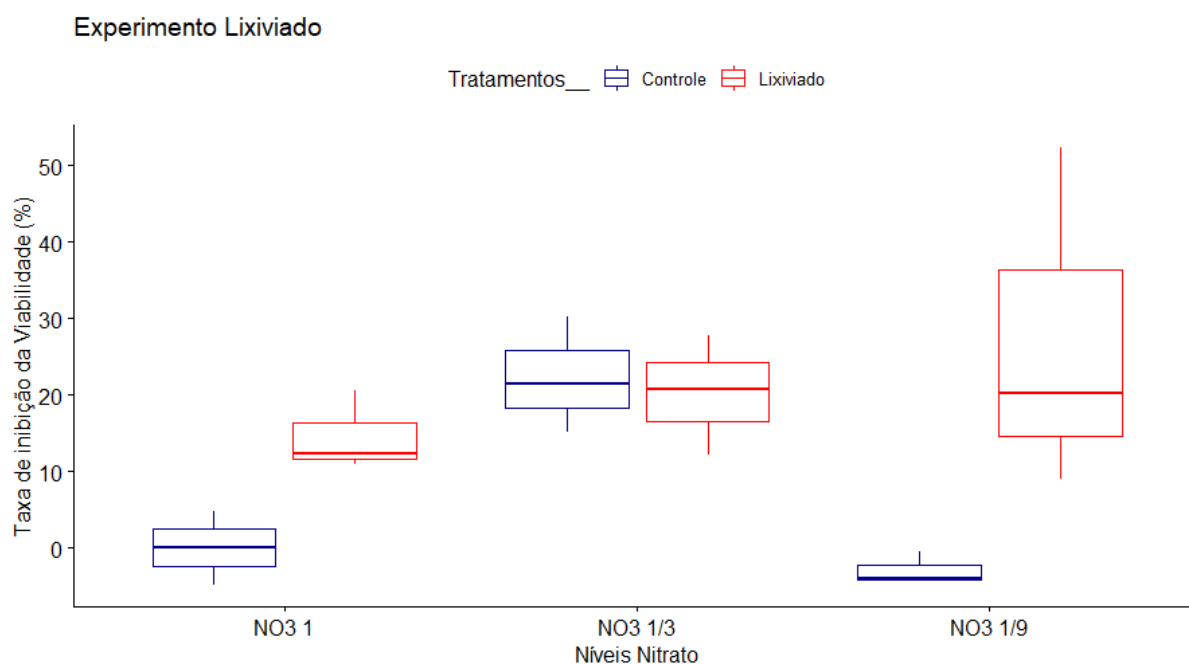


Figura 8) Taxa de inibição com base na viabilidade celular de *D. communis* no controle (azul) e expostas ao lixiviado (vermelho) nos três níveis de nitrato.

4. Discussão

Diversos mecanismos biológicos estão envolvidos na relação interespecífica macrófita-fitoplâncton, porém distinguir os mecanismos (como por exemplo, alelopatia, competição por luz ou nutrientes) que são responsáveis pela dinâmica e estrutura de comunidades aquáticas ainda é um desafio (Lürling et al., 2006; Van Donk e Van de Bund, 2002). No experimento coexistência observamos a influência negativa da presença de macrófita submersa em *Desmodemus communis*, principalmente em razão do sombreamento gerado pela estrutura vegetativa das plantas. Assim como no experimento alelopatia, foi possível verificar que o lixiviado de *Cabomba caroliniana* influenciou o crescimento e a viabilidade de *D. communis*.

4.1. Efeitos da coexistência

A ausência de raízes grossas em *C. caroliniana* explica parcialmente sua ocorrência preferencialmente em ambiente lânticos (Schooler et al., 2009). As raízes dessa planta correspondem a uma pequena fração da planta, tanto em biomassa quanto em extensão, e isto pode estar relacionada a capacidade da planta em absorver os nutrientes por outras estruturas não radiculares (Meerhoff *et al.*, 2003). Assim, a presença dessa espécie nestes ambientes estimula positivamente a transparência da água, diminuindo o fluxo de água e a ressuspensão de sedimentos, bem como, pelo potencial de ciclagem de nutrientes nesses ecossistemas (Jeppesen, 1998; Scheffer, 1993). Além disso, a presença desta macrófita pode influenciar, negativamente, a intensidade luminosa disponível ao fitoplâncton, uma vez que estes organismos ocupam o mesmo estrato no hábitat natural (Pokorny' et al., 1984).

Nós verificamos que o sombreamento promovido por *C. caroliniana* pode ser considerado um mecanismo importante na dinâmica populacional de *D. communis*. Isso foi evidenciado pela redução de alguns indicadores populacionais, como a densidade celular, taxa de inibição da densidade e taxa de inibição da viabilidade de *D. communis* na presença de plantas submersas artificiais ou naturais. O atraso no crescimento de *D. communis* na presença física da planta (natural ou artificial) permite identificar a importância do fator sombreamento, uma vez a densidade celular da alga foi limitada por não atingir o pico fotossintético. Sendo assim, a presença de estruturas submersas (folhas e caule) e o sombreamento gerado por essas estruturas são capazes de reduzir o crescimento de *D. communis*, principalmente em concentrações elevadas de nitrato (*ad libitum*), onde os nutrientes não eram um fator limitante. Além disso, a presença da planta natural e artificial apresentou uma taxa de inibição de densidade maior que o grupo controle.

Entretanto, com a diluição do nitrato (concentrações intermediária e reduzida) foi possível evidenciar que, além do sombreamento gerado pelas estruturas submersas (planta artificial), a presença da planta natural também passou a ser um fator relevante para limitação de *D. communis*, sugerindo competição por nutrientes. Outros estudos com plantas submersas, como *Elodea*, *Myriophyllum* e a macroalga *Chara* também evidenciaram que a biomassa fitoplanctônica pode ser influenciada negativamente pela presença destes organismos, porém tais estudos indicaram o potencial alelopático como fator limitante (Lürling et al., 2006; Vanderstukken et al., 2014). Vários mecanismos influenciam na relação antagônica macrófita-fitoplâncton, porém evidenciar na prática segue sendo um desafio (Lürling et al., 2006; Van Donk & Van de Bund, 2002).

Evidenciamos que o nutriente é um fator limitante para densidade celular, pois quando comparamos a densidade celular na presença das plantas (natural e artificial) e no controle, observamos uma queda na densidade de *D. communis* (cél.ml⁻¹), conforme o nitrato é diluído, principalmente no grupo controle, indicando uma elevação na competição intraespecífica de *D. comunnis* com a redução da disponibilidade do nitrato. No entanto, a redução na densidade de *D. communis* em coexistência com a macrófita submersa (natural e artificial) foi mais sutil, indicando que o efeito regulatório causado pelo sombreamento interfere na influencia do nitrato como fator limitante na densidade de *D. communis*.

Todavia, a presença das plantas (natural e artificial) e as diferentes concentrações do nitrato não foram capazes de inibir a viabilidade celular de *Desmodesmus communis*. Já a taxa de inibição da viabilidade aumentou gradativamente com a redução da concentração de nitrato, nos três grupos de coexistência testados, e a competição por nitrato entre a microalga e a planta submersa foi mais evidente, em termos de inibição da viabilidade, nas maiores concentrações de nitrato. A viabilidade celular realizada através do método do vermelho neutro permite avaliar a proporção de células saudáveis, a partir da atividade metabólica, em uma cultura celular (Da Luz et al., 2016). Embora a taxa de inibição baseada na viabilidade celular nos permitiu identificar que a presença da planta natural teve capacidade inibitória nas concentrações maiores e intermediárias de nitrato. As diluições do nutriente, sobretudo a maior diluição (NO₃⁻ 1/9), teve capacidade inibitória, independente da presença ou não das plantas natural e artificial.

Dessa forma, nós observamos que, com base na disparidade entre as concentrações de nitrato e as diferentes respostas do fitoplâncton em coexistência com plantas naturais e artificiais, a limitação por nutriente, nas concentrações testadas, é um fator secundário frente à competição por luz. Considerado um fator essencial, a disponibilidade de luz, é um fator limitante para o crescimento das algas (Bouterfas, 2002). O'Farrel e colaboradores (2009) observaram a partir de experimentos que o sombreamento gerado pela persistência de macrófitas flutuantes influenciou no crescimento fitoplanctônico, ocasionando um desequilíbrio entre produção e respiração, pois a limitação de luz influenciou em uma elevada absorção dos nutrientes disponíveis no sedimento, e diminuiu os níveis de oxigênio. A partir disso, inferimos que nossos resultados demonstram que, apesar da limitação de luz a disponibilidade de nutrientes pode ter sido um fator imprescindível para crescimento da alga. Esse resultado vai de encontro com a ideia de que as clorofíceas são boas estrategistas (Reynolds, 1988).

Apesar de a luz ser um recurso essencial, e claramente um limitante da taxa de crescimento algal (Bouterfas, et al., 2002), alguns estudos realizados para avaliar a influência

do sombreamento gerado por estruturas submersas de macrófitas de plástico, observaram que o sombreamento não teve capacidade de inibir o crescimento fitoplanctônico (Lürling et al., 2006, Vanderstukken et al., 2011). Poucos trabalhos conseguiram demonstrar o efeito do sombreamento como um dos principais fatores de controle do crescimento do fitoplâncton, tal como no presente estudo. Cabe destacar que para simular condições mais naturais de direção de luz e sombreamento, diminuindo a intensidade de luz natural, nós adicionamos sombrite (50%) ao entorno dos recipientes onde foram realizados os ensaios. Outro fator importante é o tamanho do fragmento utilizado, no experimento conduzido para esse estudo, tentamos simular uma alta abundância da planta no sistema e efetivo sombreamento. Além disso, os organismos utilizados em cada estudo, que podem apresentar respostas diferentes de acordo com sua biologia.

4.2. Efeitos do lixiviado

A alelopatia, definida por Molisch (1937), se refere a interações bioquímicas entre plantas e também entre plantas e microrganismos. As interferências podem ser positivas ou negativas (Rice, 1984). A produção e excreção de compostos aleloquímicos oriundo das macrófitas aquáticas pode ser considerada uma estratégia de defesa contra outros organismos fotossintéticos, e têm capacidade de suprimir o crescimento fitoplanctônico (Hutchinson, 1975). Logo, a presença de macrófitas submersas tem potencial para auxiliar na manutenção de estado estável de águas claras (Hilt & Gross, 2008), podendo ter influência mesmo em diferentes condições de disponibilidade de nutrientes (Vanderstukken et al., 2010). Todavia, a variação no efeito alelopático entre organismos competidores indica que este é um fator relativo, que depende sobretudo da espécie estudada (Rabalais et al., 2002).

O experimento realizado a partir do lixiviado de *Cabomba caroliniana* demonstrou que a planta tem potencial para inibir o crescimento *Desmodesmus communis* através da liberação de compostos alelopáticos, embora o fator que mais afetou a densidade da microalga foi a limitação por nutriente. A alelopatia e sua influência no controle de microalgas vem sendo descrito para diversas macrófitas, tais como *Myriophyllum*, *Ceratophyllum* e *Elodea* (Hilt & Gross, 2008), e é considerada um mecanismo confiável no controle do fitoplâncton, pois não sofre alteração em curtas escalas de tempo (Vanderstukken et al., 2014). Os compostos aleloquímicos como poliacetilenos, polifenóis, ácidos graxos, são conhecidos por influenciar negativamente o desenvolvimento do fitoplâncton (Gross, 1999; Wium-Andersen et al., 1983).

Nós observamos que a taxa de inibição de densidade celular indicou uma maior importância da concentração de nutriente sobre o efeito alelopático (experimento alelopatia). Entre os trabalhos que estudaram a importância da disponibilidade de nutriente, alelopatia e

sombreamento na competição interespecífica de microalgas e macrófitas a grande maioria destacou a importância da alelopatia (Vanderstukken et al., 2010) e da disponibilidade de nutrientes (Lürling et al., 2006). They e colaboradores (2014) corroboram com nosso estudo ao evidenciar que o potencial alelopático induzido pela macrófita *Cabomba caroliniana* influencia no crescimento de *Microcystis aeruginosa*, independente da concentração da concentração de nutriente.

No entanto, a maior importância da disponibilidade nutricional no experimento de alelopatia deve-se ao fato de que o nitrogênio na forma de nitrato e amônio são as mais importantes para comunidade fitoplancônica (Domingues et al., 2011). Para muitos estudos, a competição por nutriente é um elemento chave para o controle do crescimento de microalgas (Lürling et al., 2006) além de possuir capacidade de afetar a ecologia desta comunidade (Reynolds, 2006). Logo, experimentos que esclarecem /lançam luz ao/ problemas de eutrofização em água doce são necessários para auxiliar na mitigação desses corpos d'água (Smith & Schindler, 2009).

Foi possível observar que a viabilidade das células *D. communis* decaíram ao longo do experimento, independente do tratamento e da concentração do nitrato. No entanto os resultados indicaram efeito apenas no último dia nos tratamentos com maior e menor concentração de nitrato no experimento. Em contrapartida, a exposição ao lixiviado elevou os valores da taxa de inibição de viabilidade quando as células foram expostas à maior e menor concentrações do nutriente. Diversas condições ambientais e fatores estressores, como limitação de nutriente podem influenciar e potencializar o efeito de compostos aleloquímicos (Reigosa et al., 1999). Sendo assim, seriam necessários mais estudos para compreender melhor este efeito.

Em suma, nossos resultados indicam que a presença de estruturas submersas de *Cabomba caroliniana* e o sombreamento gerado em *Desmodesmus communis* foi o fator propulsor inibitório da microalga. Secundariamente, observamos que a diluição do nutriente (nitrato) foi importante, nos dois experimentos, para redução do crescimento de *Desmodesmus communis*. A alelopatia evidenciada através do experimento lixiviado torna-se relevante apenas quando não há restrição do nutriente, nem competição por luz.

867 **Referências**

- 868 Albertoni, E. F., Palma-Silva, C., Trindade, C. R. T., Furlanetto, L. M., 2014. Field evidence of
869 the influence of aquatic macrophytes on water quality in a shallow eutrophic lake over a 13-
870 year period. *Acta Limnol.*, 26(2), 176-185.
- 871 Amorim, C.A., Moura-Falcão, R.H.D., Valença, C.R., Souza, V.R.D., Moura, A.D.N., 2019.
872 Allelopathic effects of the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. on phytoplankton
873 species: contrasting effects between cyanobacteria and chlorophytes. *Acta. Limnol.* 31.
- 874 Andrade, R.D.R., Girollo, D., 2014. Limnological characterisation and phytoplankton seasonal
875 variation in a subtropical shallow lake (Guaíba Lake, Brazil): a long-term study. *Acta Limnol.*
876 *Bras.* 26(4), 442-456.
- 877 Balian, E.V., Segers, H., Martens, K., Lévêque, C., 2007. The freshwater animal diversity
878 assessment: an overview of the results. *FADA.* 627-637.
- 879 Bickel, T. O., Perrett, C., 2014. Competitive performance of *Cabomba caroliniana*. In: 19th
880 Australasian Weeds Conf.
- 881 Bickel, T.O., 2015. A boat hitchhiker's guide to survival: *Cabomba caroliniana* desiccation
882 resistance and survival ability. *Hydrobiologia* 746, 123–134.
- 883 Bickel, T.O., Schooler, S.S., 2015. Effect of water quality and season on the population
884 dynamics of *Cabomba caroliniana* in subtropical Queensland, Australia. *Aquat. Bot.*, 123, 64-
885 71.
- 886 Bogardi, J.J., Leentvaar, J., Sebesvári, Z., 2020. *Biologia Futura: integrating freshwater*
887 *ecosystem health in water resources management. Biol. Futur.* 1-22.
- 888 Bouterfas, R., Belkoura, M., Dauta, A., 2002. Light and temperature effects on the growth rate
889 of three freshwater [2pt] algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia.* 489(1), 207-217.
- 890 Crippen, R.W., Perrier, J.L., 1974. the use of neutral red and evans blue for live-dead
891 determinations of marine plankton. *Stain Technol.* 49(2), 97-104.

892

893 Da Luz, D.S., Da Silva, D.G., Souza, M.M., Girollo, D., Martins, C.D.M.G., 2016. Efficiency
 894 of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae
 895 *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Phycol. Res.*, 64(1), 56-60.

896 Declerck, S. A. J., Bakker, E. S., van Lith B., Kersbergen A., van Donk E., 2011. Effects of
 897 nutrient additions and macrophyte composition on invertebrate community assembly and
 898 diversity in experimental ponds. *BAAE*. 12: 466–475.

899 Domingues, R.B., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvão, H.M., 2011. Ammonium, nitrate and
 900 phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural
 901 eutrophication. *Aquat. Sci.* 73(3), 331-343.

902 Driscoll, C.T., Lawrence, G.B., Bulger, A.J., Butler, T.J., Cronan, C.S., Eagar, C., Lambert,
 903 K.F., Likens, G.E., Stoddard, J.L., Weathers, K.C., 2001. Acidic deposition in the northeastern
 904 United States: Sources and inputs, ecosystem effects, and management strategies. *BioScience*.
 905 51, 180–198.

906 Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C.,
 907 Naiman, R.J., Prieur-Richard, A., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater
 908 biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81(2), 163-182.

909 Gardner, R.C., Barchiesi, S., Beltrame, C., Finlayson, C., Galewski, T., Harrison, I., Paganini,
 910 M., Perennou, C., Pritchard, D., Rosenqvist, A., Walpole, M., 2015. State of the world's wetlands
 911 and their services to people: a compilation of recent analyses.

912 Gleick, P.H., 1996. Water resources. *Encyclopedia of climate, weather*. University Press,
 913 Oxford.

914 Gross, E. 1999. Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from
 915 benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. CRC press, Flórida.

916 Gross, E. M., Hilt, S., Lombardo, P., Mulderij, G., 2007. Searching for allelopathic effects of
 917 submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. *Shallow Lakes*
 918 *in a Changing World*. Springer, EUA.

919 Guillard, R.L.R., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with Chlorophyllide. *J. Phycol.* 8,
 920 10-14.

921 Harper, D. 1992. Eutrophication of freshwater. Chapman Hall, Reino Unido.

922 Hentschke, G.S., Torgan, L.C., 2010. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae,
 923 Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande
 924 do Sul, Brasil. *Rodriguésia*. 61(4), 585-601.

925 Hilt, S., Gross, E.M., 2008. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-
 926 water states in shallow lakes?. *BAAE.*, 9(4), 422-432.

927 Hogsden, K.L., Sager, E.P., Hutchinson, T.C., 2007. The impacts of the non-native macrophyte
 928 *Cabomba caroliniana* on littoral biota of Kaskashog Lake, Ontario. *J. great lakes res.* 33(2),
 929 497-504.

930 Hutchinson, G.E., 1975. A Treatise on Limnology. Limnological Botany. Wiley, Nova York.

931 Jeppensen, E., Lauridsen, T.L., Kairesalo, T., Perrow, M.R., 1998. Impact of submerged
 932 macrophytes on fish-zooplankton interactions in lakes. The structuring role of submerged
 933 macrophytes in lakes. Springer-Verlag, Nova York.

934 Kassambara, A., 2018. ggpubr: “ggplot2” based publication ready plots. R package version 0.1,
 935 7.

936 Leflaive, J., Lacroix, G., Nicaise, Y., Ten-Hage, L., 2008. Colony induction and growth
 937 inhibition in *Desmodesmus quadricapsa* (Chlorococcales) by allelochemicals released from the
 938 filamentous alga *Uronema confervicolum* (Ulotrichales). *Environmental microbiology*, 10(6),
 939 1536-1546.

940 Lourenço, S.O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas - Princípios e aplicações. Rima, São
 941 Paulo.

942 Lürling, M., van Geest, G., Scheffer, M., 2006. Importance of nutrient competition and
 943 allelopathic effects in suppression of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the macrophytes
 944 *Chara*, *Elodea* and *Myriophyllum*. *Hydrobiologia*. 556(1), 209-220.

945

- 946 Meerhoff, M., Mazzeo, N., Moss, B., Rodríguez-Gallego, L., 2003. The structuring role of free-
947 floating versus submerged plants in a subtropical shallow lake. *Aquatic Ecology*, 37(4), 377-
948 391.
- 949 Molisch, H., 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere, Allelopathie*. Fischer, Jena.
- 950 Moss, B., 2018. *Ecology of Freshwaters: Earth's Bloodstream*. Hoboken N.J. Wiley, Nova
951 Jersey.
- 952 Nakai, S., Hosomi, M., Okada, M., Murakami, A., 1996. Control of algal growth by
953 macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds. *Water. Sci. Technol*, 34(7-8),
954 227-235.
- 955 O'Farrell, I., De Tezanos P., Rodriguez, P.L., Chaparro, G., Pizarro, H.N., 2009. Experimental
956 evidence of the dynamic effect of free-floating plants on phytoplankton ecology *Freshw. Biol.*
957 54(2), 363-375.
- 958 Ørgaard, M., 1991. The genus *Cabomba* (Cabombaceae): a taxonomic study. *Nordic. J. Bot.*
959 11, 179–203.
- 960 Pereira, S.A., Trindade, C.R.T., Albertoni, E.F, Palma-Silva, C., 2012. Aquatic macrophytes as
961 indicators of water quality in subtropical shallow lakes, southern Brazil. *Acta. Limnol.* 24(1),
962 52-63
- 963 Pereira, S.A., Trindade, C.R.T., Albertoni, E.F., Palma-Silva, C., 2012. Aquatic macrophytes
964 of six subtropical shallow lakes, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil. *Check List*, 8(2), 187-
965 191.
- 966 Phillips, G., Willby, N., Moss, B., 2016. Submerged macrophyte decline in shallow lakes: What
967 have we learnt in the last forty years? *Aquat. Bot.* 135, 37-45.
- 968 Pokorný, J., Květ, J., Ondok, J. P., Toul, Z., Ostrý, I., 1984. Production-ecological analysis of
969 a plant community dominated by *Elodea canadensis* Michx. *Aquat. Bot.*, 19(3-4), 263-292.
- 970 Rabalais, N.N., 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *J.Hum.* 31(2), 102-112.
- 971 Reigosa, M.J., Sanchez-Moreiras, A., Gonzalez, L., 1999. Ecophysiological approach in
972 allelopathy. *Crit. Rev Plant Sci.* 18, 577–608

- 973 Reynolds, C.S., 1984. The Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press,
974 Londres.
- 975 Reynolds, C.S., 1988. Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater
976 phytoplankton. Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton,
- 977 Reynolds, C.S., 2006. The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and
978 Conservation). Cambridge University, Cambridge.
- 979 Rice, E.L., 1984. Allelopathy. Academic, New York
- 980 Rolon, A.S., Homem, H.F., Maltchik, L., 2010. Aquatic macrophytes in natural and managed
981 wetlands of Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. Acta Limnol. Bras. 22(2), 133-146.
- 982 Saadoun, I.M., Bataineh, E., Alhandal, A., 2008. Phytoplankton Species Composition and
983 Seasonal Variation at Wadi Al-Arab Dam Lake, Jordan. Turk. J. Biol. 32(4), 291-298.
- 984 Sartori, L. Adequação da qualidade microbiológica de efluentes de tratamento secundário de
985 esgoto sanitário pela aplicação dos desinfetantes ozônio, permanganato de potássio e ácido
986 peracético. Tese (Hidráulica e Saneamento) – UFSCar. São Paulo, 2004.
- 987 Santonja, M., Le Rouzic, B., Thiébaud, G., 2018. Seasonal dependence and functional
988 implications of macrophyte–phytoplankton allelopathic interactions. Freshw. Biol., 63(9),
989 1161-1172.
- 990 Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.L., Moss, B., Jeppesen, E., 1993. Alternative Equilibria
991 in Shallow Lakes. Tree, 8(8), 275-279.
- 992 Schooler, S., Cabrera-Walsh, W., Julien, M., 2009. *Cabomba caroliniana* gray (Cabombaceae).
993 Biological control of tropical weeds using arthropods. Cambridge, Inglaterra.
- 994 Schriver, P.E.R., Bøgestrand, J., Jeppesen, E., Søndergaard, M., 1995. Impact of submerged
995 macrophytes on fish-zooplanl phytoplankton interactions: large-scale enclosure experiments in
996 a shallow eutrophic lake. Freshwat. Biol. 33, 255-270.
- 997 Smith, V.H., Schindler, D.W., 2009. Eutrophication science: where do we go from here?.
998 Trends. Ecol. Evol., 24(4), 201-207.

999 They, N.H., da Motta Marques, D., Crossetti, L.O., Becker, V., Canterle, E., Rodrigues, L.R.,
1000 Júnior, C.R.F., 2014. Phytoplankton ecological interactions in freshwater ecosystems—
1001 integrating relationships in subtropical shallow lakes. SEBASTIÁ, MT Phytoplankton: biology,
1002 classification and environmental impacts. Nova Science Publishers, New York.

1003 They, N.H., Ferreira, T., Marques, D., Rodrigues, L. R., Silveira, S. B., Arriada, A. A., Fragoso
1004 Junior, C.R., 2015. Allelopathic effects of macrophytes in subtropical shallow lakes. New
1005 Developments in Allelopathy Research. Nova Science Publishers, New York.

1006 Trainor F.R., 1998. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)- phenotypic plasticity.
1007 Nova Hedwigia, Beiheft.

1008 Van Donk, E., Van de Bund, W.J., 2002. Impact of submerged macrophytes including
1009 charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms.
1010 Aquat. Bot. (72) 261–274.

1011 Vanderstukken, M., Declerck, S. A. J., Pals, A., De Meester, L., Muylaert, K., 2010. The
1012 influence of plant-associated filter feeders on phytoplankton biomass: a mesocosm study.
1013 Hydrobiologia, 646(1), 199-208.

1014 Vanderstukken, M., Declerck, S. A., Decaestecker, E., Muylaert, K., 2014. Long-term
1015 allelopathic control of phytoplankton by the submerged macrophyte *Elodea nuttallii*. Freshw.
1016 Biol., 59(5), 930-941.

1017 Vanderstukken, M., Mazzeo, N., Van Colen, W., Declerck, S.A., Muylaert, K., 2011. Biological
1018 control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes *Egeria densa* and
1019 *Potamogeton illinoensis*: a mesocosm study. Freshw. Biol. 56(9), 1837-1849.

1020 Wickham, H., Wickham, M.H., 2017. Package tidyverse; Easily Install and Load
1021 the 'Tidyverse'. R (3.5. 0), MIT+ file LICENSE

1022 Wilson, c. E.; darbyshire, s.j.; jones, r. 2007. The biology of invasive alien plants in Canada. 7.
1023 *Cabomba caroliniana* A. Gray. Canadian Journal of Plant Science, 87(3), 615-638.

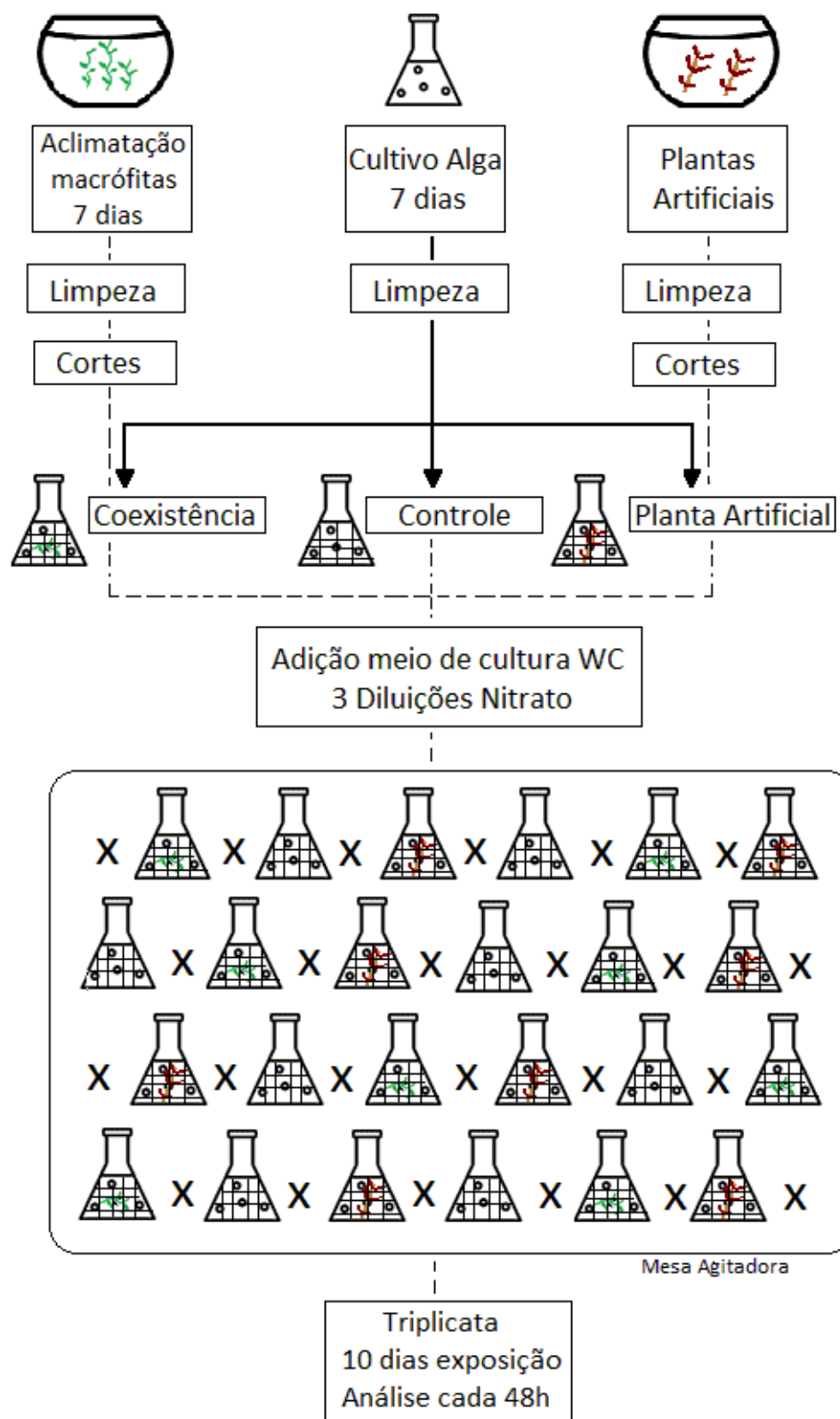
1024 Wium-Andersen, S., Anthoni, U., Houen, G., 1983. Elemental sulphur, a possible allelopathic
1025 compound from *Ceratophyllum demersum*. Phytochemistry. 22, 2613.

1026 Zetsche, E.M., Meysman, F.J.R., 2012. Dead or alive? Viability assessment of micro- and
1027 mesoplankton. J. of Plankton Res. 34(6), 493-509.

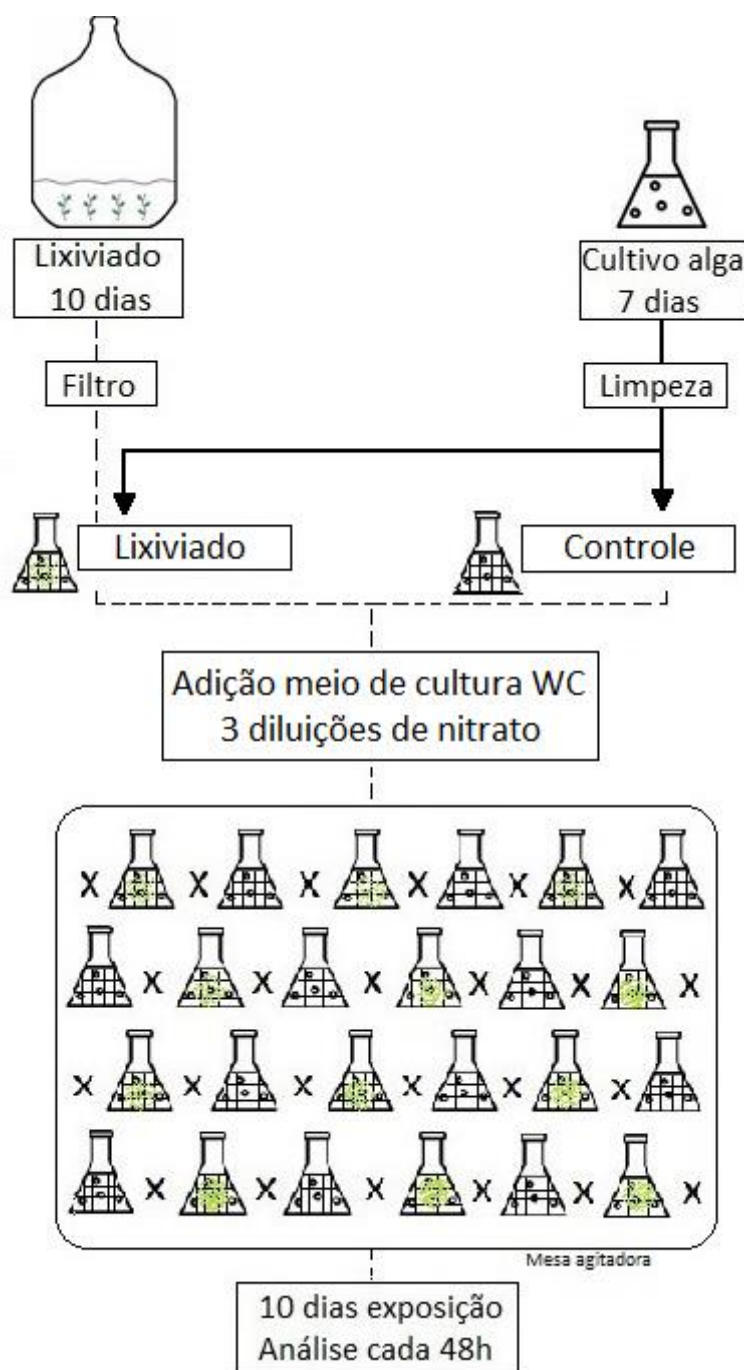
- 1028 Zhang, L., Liu, B., Ge, F., Liu, Q., Zhang, Y., Zhou, Q., Xu, D., Wu, Z., 2019 Interspecific
1029 Competition for Nutrients between Submerged Macrophytes (*Vallisneria natans*,
1030 *Ceratophyllum demersum*) and Filamentous Green Algae (*Cladophora oligoclona*) in a Co-
1031 Culture System. Pol. J. Environ. Stud. 28(3), 1483–1494.
- 1032 Zhao, J.G., Chen, Z.H., 2016. Effect of two macrophyte species on phytoplankton growth and
1033 water quality in a eutrophic pond. Aquat. Ecosyst. Health, 19(4), 393-400.
- 1034 Zuo, S., Zhou, S., Ye, L., Ding, Y., Jiang, X., 2016. Antialgal effects of five individual
1035 allelochemicals and their mixtures in low level pollution conditions, Environ. Sci. Pollut. Res.
1036 (23) 15703–15711.

Material suplementar

Material suplementar 1) Esquema do experimento coexistência de *Cabomba caroliniana* sobre *Desmodemus communis*. As diferentes concentrações de nitrato, foram: NO₃ 1 (elevada = 1000 µg/L), NO₃ 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO₃ 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).



Material suplementar 2) Esquema do experimento lixiviado de *Cabomba caroliniana* sobre *Desmodesmus communis*. As diferentes concentrações de nitrato, foram alteradas no meio de cultura WC, respectivamente NO₃ 1 (elevada = 1000 µg/L), NO₃ 1/3 (intermediária = 333,33 µg/L) e NO₃ 1/9 (baixa = 111,11 µg/L).



CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados nesta pesquisa experimental abordam a relevância da competição interespecífica macrófita-fitoplâncton e contribui para o conhecimento acerca desta relação antagônica, validando o papel da macrófita submersa *C. caroliniana* na manutenção do período de águas claras. Vale salientar que foi utilizado no experimento espécies nativas e que coexistem na região, com isso, é preciso ter cuidado para não inserir acidentalmente espécies invasoras ou exóticas, e com isso gerar mais danos ao meio ambiente.

Foi possível observar através dos experimentos que o sombreamento gerado pela macrófita submersa possui capacidade de ser utilizado como um novo parâmetro regulatório na proliferação de microalgas, como *Desmodesmus communis*. Ressalto que o uso de materiais em experimentos laboratoriais que simulem o ambiente natural e a entrada vertical de luminosidade pode ser importante na avaliação experimental da competição por luz entre estes organismos.

Foi possível verificar também que as concentrações de nitrato utilizadas no experimento influenciam nesta dinâmica, demonstrando que, medidas eficazes de controle de aporte nutricional para ambientes aquáticos continentais são de extrema importância para o grau de trofia do lago e influenciam na dinâmica populacional do fitoplâncton. Vale salientar, ainda, que o potencial alelopático observado no experimento com o lixiviado, permite afirmar que os compostos aleloquímicos de *Cabomba caroliniana* também podem auxiliar na mitigação de florações, tornando-se ainda mais relevante quando não há competição por luz, nem restrição por nutriente entre as espécies.

Assim, acredito que este estudo agrega aos demais experimentos realizados na compreensão da relação macrófita-fitoplâncton. Nesse sentido, novas abordagens experimentais com outros organismos são necessárias para compreensão das relações entre as comunidades. E também experimentos *in situ* são necessários para melhor avaliar a influência da planta natural, e o sombreamento de macrófitas artificiais sobre a comunidade fitoplanctônica, e compreender melhor esta competição.

ANEXO I - Normas da revista a qual o manuscrito será submetido: *Aquatic Botany*

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Aquatic Botany is concerned with fundamental studies on structure, function, dynamics and classification of plant-dominated aquatic communities and ecosystems, as well as molecular, biochemical and physiological aspects of aquatic plants. It is also an outlet for papers dealing with applied research on plant-dominated aquatic systems, including the consequences of disturbance (e.g. transplantation, influence of herbicides and other chemicals, thermal pollution, biological control, grazing and disease), the use of aquatic plants, conservation of resources, and all aspects of aquatic plant production and decomposition.

Types of paper

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Regular papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Number of references should not exceed 50 and number of displayed items (figures, plates, tables) should be limited to 6 to 8.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Authors should preferably contact editors with a short description of the review before submitting.

For Short Communication results and discussion can be combined in a short communication, while they should be separate sections in regular papers. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 3500 words including references, 2 figures or 2 tables or one of each. Number of references should not exceed 25.

Letters to the Editor offering comment or appropriate critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly

accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (<http://www.gbif.org>) or data centers endorsed by GBIF, including BioFresh (<http://www.freshwaterbiodiversity.eu>)"

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines journal publication.

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required. If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We

recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use

by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post submission please visit <https://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <https://service.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <https://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Please submit your article <https://www.editorialmanager.com/aqbot/default.aspx>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and e-mail addresses of 4 potential referees.

Page charges

Aquatic Botany has no page charges.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. The document must have line numbers inserted. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the

article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the

text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is appropriate for short communications or when results cannot easily be presented without direct interpretation. Avoid extensive citations and discussion of published literature. The main conclusions of the study should be presented in a short concluding paragraph at the end of the discussion.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required, no longer than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide keywords, using American spelling avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the sentence: This

research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a

low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference

so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/aquatic-botany> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Free Reference Style

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following example: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference style

Text:

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
 3. Three or more authors: first author's name followed by "et al." and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed chronologically. List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Stewart, D.A., Agnew, D., Boyd, R., Briggs, R., Toland, P., 1993. The derivation of changes in Nephrops per unit effort values for the Northern Ireland fishing fleet. *Fish. Res.* 17, 273-292.

b. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical

Roberts, R.J., 1993. Ulcerative dermal necrosis (UDN) in wild salmonids. In: Bruno, D.W. (Ed.), *Pathological conditions of wild salmonids*. *Fish. Res.* 17, 3-14.

c. For books

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. For multi-author books

Bucke, D., 1989. Histology. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. Wiley, New York, pp. 69-97.

In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To

facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page. If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in Data in Brief. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this video describing the benefits of publishing your data in Data in Brief). You are encouraged to submit your data article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where

it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on

the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author's discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.