

The background of the cover is a collage of various botanical illustrations, including cross-sections of plant stems, leaves, and microscopic views of cells and tissues. The illustrations are rendered in a detailed, scientific style with a color palette of greens, pinks, and purples. A large, semi-transparent green rectangle is overlaid on the center of the page, containing the text.

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica - Laboratório de Ficologia

PLASTICIDADE MORFOLÓGICA EM
MICROALGAS INDUZIDA POR PREDACÃO POR
CHIRONOMUS CF. *XANTHUS* Hempel, 1939
(*Insecta: Chironomidae*)

Suzana Luísa Alves Fernandes

São Carlos
2021

SUZANA LUISA ALVES FERNANDES

**PLASTICIDADE MORFOLÓGICA EM MICROALGAS INDUZIDA POR
PREDAÇÃO POR *Chironomus cf. xanthus* Rempel, 1939 (Insecta:
Chironomidae)**



Monografia apresentada no Departamento de Botânica, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Inessa Lacativa Bagatini

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lívia Maria Fusari

São Carlos – SP

2022

AGRADECIMENTOS

A graduação foi transformadora, mudando minha visão de mundo, meus sonhos e meus caminhos, e não só me ensinou sobre biologia, mas me ensinou a viver e olhar ao redor com outros olhos, a respeitar e valorizar a trajetória. Ao longo de 6 anos, de muito aprendizado, tive o prazer de esbarrar em pessoas sensacionais, que somaram na vida. Esse trabalho não é uma conquista só minha, vocês fizeram parte disso.

De início, agradeço às pessoas que mais amo no mundo, minha irmã, painho e mainha, por se esforçarem tanto e me criarem, tão bem, para ser uma mulher livre, sempre me incentivando e sendo meu lugar seguro. Não posso esquecer do meu Vô Zé, que me incentivou desde cedo a ser independente. Eu sinto saudades e te amo muito, espero que esteja orgulhoso de mim.

Tive o privilégio de encontrar, no caminho da vida adulta, um time nada tradicional brasileiro, minha família são carlense. Formada pelas pessoas que me acolheram, em meio ao caos e na calma, Caio, Mariane, Luca, Nathalia, Victor Hugo, Marina, Jéssica, Priscila e Paloma. Amigos, muito obrigada, com vocês a vida é bem mais doce!

Dedico meus agradecimentos aos amigos e amigas do Laboratório de Ficologia, que ensinaram e continuam me ensinando muito. Também agradeço à Inessa, que se tornou mais do que uma orientadora e sempre acreditou em mim, à Lívia do Laboratório de Entomologia Aquática e à Aline do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos, pelo fornecimento das larvas. Foi bom demais trabalhar com vocês.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus, ou o que está mais próximo do divino existente, por me permitir chegar até aqui e me cercar de pessoas boas.

Obrigada.

RESUMO

As microalgas e cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes que possuem diferentes morfologias e podem apresentar plasticidade fenotípica quando sob efeito de predadores. São produtores primários em ambientes aquáticos, sendo predados por inúmeros grupos heterotróficos, incluindo invertebrados bentônicos. Entre importantes invertebrados bentônicos que se alimentam de microalgas, especialmente microalgas verdes, diatomáceas e cianobactérias, podemos citar o gênero de insetos *Chironomus* (Chironomidae, Diptera). Embora a variação morfológica em microalgas para evitar predação por invertebrados planctônicos seja bem documentada, pouco se sabe sobre a plasticidade fenotípica em microalgas predadas por essas larvas. Neste projeto, avaliamos a plasticidade morfológica em microalgas como forma de defesa à predação por larvas de *Chironomus* cf. *xanthus*. Avaliamos as alterações morfológicas em três cepas de microalgas das espécies: *Desmodesmus spinosus*, uma vez que este gênero usualmente apresenta plasticidade fenotípica sob predação por outros invertebrados; e duas microalgas de gêneros que podem ser encontrados no bentos, habitat das larvas: *Micrasterias* cf. *pinnatifida*, uma alga verde (desmídia) e *Cyclotella* sp., uma diatomácea cêntrica. *D. spinosus* foi avaliado diretamente sobre predação, no entanto, devido a problemas metodológicos, as outras algas foram avaliadas sob efeito do filtrado excretado da larva. Os experimentos foram realizados em triplicatas. *D. spinosus* apresentou aumento significativo nas dimensões dos cenóbios no segundo dia e dos espinhos (dimensões máximas) após o quarto dia de cultivo na presença do predador; no mesmo período, também foi observada a maior produção de indivíduos unicelulares no tratamento com as larvas. *Micrasterias* aumentou significativamente sua biomassa e a concentração de clorofila *a* (determinadas por contagem celular e absorbância), no segundo dia em contato indireto com os quironomídeos. Em *Cyclotella*, no tratamento com o excretado filtrado (contato indireto), houve aumento significativo nas dimensões lineares máximas após 2 e 4 dias, maior produção de indivíduos filamentosos no quarto dia, e aumento na concentração de clorofila *a* do primeiro ao terceiro dia. Este é o primeiro trabalho que demonstra plasticidade morfológica em microalgas predadas por quironomídeos. O conhecimento sobre a plasticidade morfológica das espécies de microalgas sob predação pode auxiliar na elucidação da complexa taxonomia desses microrganismos. Além disso, pode auxiliar em futuros estudos sobre as interações entre a larva e suas presas e seus efeitos na biota e na produtividade local.

PALAVRAS-CHAVE: Defesa induzida; Microalgas; Chironomidae; Plasticidade morfológica.

ABSTRACT

Microalgae and cyanobacteria are photosynthetic microorganisms with different morphologies and may present phenotypic plasticity under predation risk. They are primary producers in aquatic environments and can be predated by innumerable heterotrophic groups, including benthic invertebrates. Among important benthic invertebrates which feed on microalgae, especially green microalgae, diatoms and cyanobacteria, there is the genus of insects *Chironomus* (Chironomidae, Diptera). Although the morphological variation of microalgae to avoid predation by planktonic invertebrates has been well documented, little is known about the phenotypic plasticity in microalgae predated by those larvae. In this project, we evaluated the morphological plasticity in microalgae as a defense to predation by *Chironomus cf. xanthus* larvae. We evaluated the morphological alterations in three microalgae strains of the species: *Desmodesmus spinosus*, since this genus usually presents phenotypic plasticity under predation by other invertebrates; and two microalgae belonging to genera found in benthos, habitat of the larvae: *Micrasterias cf. pinnatifida*, a green alga (desmid) and *Cyclotella* sp. a centric diatom. *D. spinosus* was evaluated directly over predation, however, due to methodological issues, the other algae were evaluated under the extracellular substances released by the larvae. The experiments were performed in triplicates. Under predation, *D. spinosus* presented significant increase in the coenobium dimensions on the second day, and in the maximum linear dimension (between spines) at the fourth day of growth; in this same period, a higher number of unicellular individuals was observed. *Micrasterias* biomass and chlorophyll *a* concentration (determined by cell count and absorbance) increased significantly on the second day in indirect contact with chironomids. In *Cyclotella*, extracellular substances released by the chironomid larvae (indirect contact), significantly increased the maximum linear dimensions of the individuals after 2 days, the number of filamentous individuals on the fourth day; and the chlorophyll *a* concentration from the first to the third days of growth. This is the first work showing morphological plasticity in algae predated by chironomids. The knowledge on the morphological plasticity of microalgae under predation can help elucidate the complex taxonomy of these microorganisms. Furthermore, it can help future studies about the interaction between the larva and its prey and its effects on the biota and local productivity.

KEYWORDS: Induced defense; Microalgae; Chironomidae; Morphological plasticity.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Geral	3
2.2. Específicos	3
3. Material e Métodos	4
3.1. Microalgas utilizadas	4
3.2. Curvas de crescimento das microalgas	5
3.3. Obtenção da biomassa algal para os experimentos	5
3.4. Cultivo dos Quironomídeos	5
3.5. Desenho experimental	6
3.5.1. <i>Experimento 1 – predação direta</i>	7
3.5.2. <i>Experimento 2 – efeito indireto do predador</i>	9
3.6. Densidade celular e Análises morfológicas	11
3.7. Análise estatística	12
4. Resultados	13
4.1. Curvas de crescimento	13
4.2. Efeito da predação no crescimento das microalgas	15
4.3. Formação de aglomerados ou alterações no número de colônias e/ou células por colônia	21
4.4. Verificação de alterações nas medidas lineares nas microalgas em presença do predador	24
5. Discussão	27
6. Conclusão	31
7. Referências bibliográficas	31
8. Material Suplementar	35

1. Introdução

Em ambientes aquáticos, as microalgas e cianobactérias, assim como os invertebrados bentônicos, são importantes componentes do ecossistema, que interagem entre si e atuam na ciclagem de biomassa e matéria orgânica (COVICH *et al.*, 1999; STERNER, 1994). As microalgas e cianobactérias compõem o fitoplâncton, o perifíton e, em ambientes mais rasos, o fitobentos. São microrganismos fotossintetizantes – que em conjunto com as macrófitas formam a base da cadeia trófica - distribuídos em diferentes grupos e com diversos arranjos: unicelulares, coloniais, filamentosos, entre outros (ODUM, 1971; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; REVIERS, 2006; TARKOWSKA-KUKURYK, 2013). Dessa forma, estão frequentemente expostos à predação por inúmeros grupos heterotróficos, como diversos invertebrados planctônicos e bentônicos (VAN DONK *et al.*, 2011).

No cenário de predação é importante destacar que por um processo evolutivo, que envolve a pressão da predação sobre a população predada e o custo-benefício de sua resposta ao predador, diferentes grupos de microalgas podem desenvolver mecanismos distintos de defesa que atenuem a herbivoria, por exemplo, por meio de plasticidade fenotípica (YOSHIDA *et al.*, 2004). Essa defesa induzida geralmente acarreta modificações químicas ou morfológicas (MAYELI *et al.*, 2004). Por exemplo, na presença de cladóceros do gênero *Daphnia* Müller, 1785, indivíduos da espécie *Desmodesmus subspicatus* (Syn. *Scenedesmus subspicatus* Chodat) Hegewald & Schmidt aumentam o número de células no cenóbio (de 4 a 8 células), em conjunto com o tamanho e a rigidez de seus espinhos (VAN DONK *et al.*, 1999; HEGWALD, 2000).

Outros estudos também apontam mecanismos de defesa induzida em *Skeletonema marinoi* Sarno & Zingone (Mediophyceae, Skeletonemataceae), uma diatomácea, submetida à predação por copépodes, demonstrando a redução no número de células no filamento, adaptação evolutivamente vantajosa que mitigue a redução do fitness por predação (BERGKVIST *et al.*, 2012). Também é relatada a capacidade de outras diatomáceas formarem filamentos na presença do predador e de alguns dinoflagelados, como a espécie *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, poderem desenvolver mecanismos contra a predação (BERG, 1995; LUCINDA, 2007; BERGKVIST *et al.*, 2012).

De modo geral, experimentos sobre as modificações nas microalgas induzidas por predação, podem ou não demandar o contato direto do predador com a presa. Em muitos

trabalhos faz-se o uso da cultura filtrada de cladóceros, que contém substâncias químicas excretadas por esses organismos (HA *et al.*, 2004), os cairomônios. Para tanto, os cladóceros são cultivados em meio apropriado, aclimatados durante um certo período nas condições laboratoriais, e retirados do cultivo para que este seja filtrado, obtendo o material excretado (VAN DONK *et al.*, 1999; LAMPERT *et al.*, 1994; HESSEN & VAN DONK, 1993; HA *et al.*, 2004).

Embora os estudos se concentrem em predadores no zooplâncton, as algas também são fundamentais na dieta de animais bentônicos, que constituem parte do zoobentos, e incluem diferentes ínstares larvais de alguns insetos sensíveis a mudanças e a impactos ambientais, tal como os quironomídeos, que podem apresentar prontamente uma resposta a condições adversas (COVICH *et al.*, 1999). A dieta dessas e de outras larvas bentônicas, baseada em matéria orgânica, microalgas e cianobactérias, é documentada a partir da análise do conteúdo presente no tubo gastrointestinal desses animais, e destaca a importância dos microrganismos produtores nos ecossistemas aquáticos (JOHANSSON & BEAVER, 1983; BERG, 1995; HENRIQUES-OLIVEIRA *et al.*, 2003; TARKOWSKA-KUKURYK, 2013).

Os insetos do gênero *Chironomus*, (Chironomidae, Diptera) abundantes e amplamente distribuídos em diferentes nichos devido à sua plasticidade fisiológica, apresentam larvas predominantemente bentônicas que se alimentam de microalgas, especialmente diatomáceas e clorófitas (JOHANSSON & BEAVER, 1983; BERG, 1995; RICHARDI *et al.*, 2013). Algumas espécies de quironomídeos que se alimentam de microalgas podem formar grandes biomassas em alguns ambientes (FROUZ *et al.*, 2004a). Esses mosquitos possuem quatro ínstares larvais, diferenciados pelo comprimento das cápsulas da cabeça em vista ventral e outras medidas de estruturas como antenas e mandíbulas, por exemplo (BERG, 1995). Por serem organismos com fisiologia plástica, resistentes a determinadas alterações nas condições do meio, e não apresentarem resultados com grandes interferências em condições laboratoriais, os quironomídeos tornam-se adequados para serem utilizados em experimentos (FONSECA & ROCHA, 2004; RICHARDI *et al.*, 2013).

Ainda que a plasticidade fenotípica das microalgas sob predação de cladóceros, protozoários e rotíferos tenha sido documentada (VAN DONK *et al.*, 2011), não encontramos trabalhos sobre a variação morfológica em algas submetidas à predação por quironomídeos. Estudos sobre a dieta de dípteros *Glyptotendipes paripes* Edwards,

1929 demonstraram uma redução da preferência alimentar por *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson em larvas de quarto instar, e os autores sugeriram que as alterações morfológicas e fisiológicas nas algas podem tê-las inviabilizado como alimento para esses invertebrados (FROUZ *et al.*, 2004a).

Desta forma, há trabalhos que demonstram preferência alimentar de larvas de quironomídeos e sugerem mudança fenotípica nas microalgas, grupo de microrganismos com muitos exemplares de morfologia diversa (WANG, 2005; COESEL & KRIENITZ, 2008), mas nenhum que avalie sua plasticidade morfológica diante da predação. Desse modo, o presente trabalho pretendeu fornecer informações sobre a plasticidade morfológica das microalgas sob exposição direta e indireta às larvas de quironomídeos.

Essa pesquisa enriquece os estudos sobre as interações microalgas-insetos e pode auxiliar no entendimento de interações tróficas em ambientes aquáticos. É de suma importância compreender a dinâmica dentro de um ambiente, para que seja possível o desenvolvimento de melhores técnicas e protocolos para o manejo e a conservação da biota local (LUCINDA, 2007). Além de tornar exequível planejamentos sobre as mudanças nas condições e na produtividade do ambiente, a detecção de alterações morfológicas nas microalgas induzidas por predação contribui para a melhor resolução da complexa taxonomia desses produtores.

Sendo assim, procuramos detectar mudanças morfológicas em três diferentes microalgas sob predação ou sob influência do excretado de larvas de *Chironomus cf. xanthus*. Avaliamos as alterações nas dimensões lineares dos indivíduos (célula, cenóbio e/ou filamento de acordo com a cepa), assim como a ocorrência de agrupamento de células e/ou variações no número de colônias.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a plasticidade fenotípica em microalgas como forma de defesa à predação por larvas *Chironomus cf. Xanthus*.

2.2. Específicos

1) Verificar a ocorrência do aumento no comprimento e largura das células de microalgas submetidas à predação direta ou indireta (em contato com excretado do predador).

2) Avaliar se ocorre a agregação de células e/ou aumento das colônias na presença do predador ou do seu excretado.

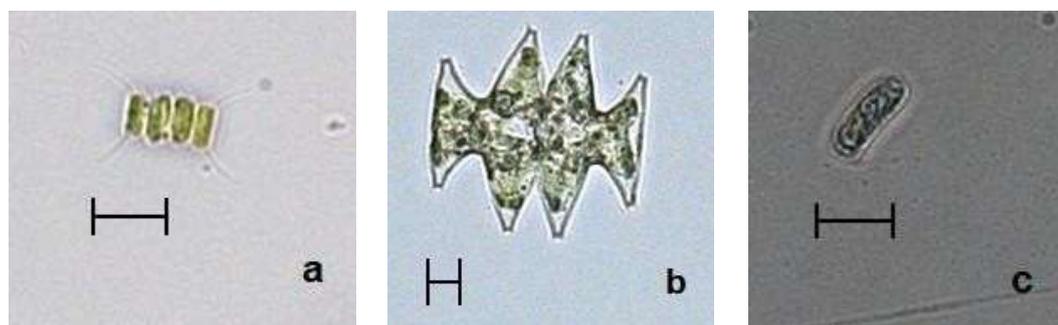
3. Material e Métodos

3.1. Microalgas utilizadas

As três cepas utilizadas foram mantidas em condições unialgais na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), sendo estas: *Desmodesmus spinosus* (Chodat) Hegewald - CCMA-UFSCar 62 (Figura 1a); *Micrasterias* cf. *pinnatifida* Kütz. ex Ralfs, CCMA-UFSCar 89 (Figura 1b); *Cyclotella* sp. (Kützing) Brébisson CCMA-UFSCar BB041 (Figura 1c).

A espécie *Desmodesmus spinosus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae) pertence a um gênero bastante utilizado em estudos de defesa induzida em microalgas, que apresenta notória plasticidade fenotípica e, geralmente, possui cenóbios de 2-8 células com espinhos nas extremidades (VAN DONK *et al.*, 1999; EBERHARD & ANKE, 2017).

O gênero *Micrasterias* pode ser bentônico, pertencente ao diverso grupo Desmidiales (Zygnematophyceae ou Conjugatophyceae) de algas verdes com ampla distribuição (COESEL, 1982; COESEL & KRIENITZ, 2008), restrito a ambientes mais ácidos e oligotróficos, e que, quando cultivado *in vitro*, possui gerações com maiores durações (COESEL, 1982). De modo geral, é unicelular com uma morfologia padrão que consiste em duas hemicélulas (ou semicélulas) espelhadas e de mesmo formato, separadas por uma constrição mediana e conectadas pelo istmo. Entretanto, diferentes espécies apresentam projeções distintas em formatos e tamanhos, do simples ao exuberante (MEINDL, 1993). A terceira cepa utilizada nos experimentos foi de *Cyclotella* sp., uma diatomácea cêntrica (simetria radial).



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Figura 1. Capturas feitas em microscópio óptico de *Desmodesmus spinosus* (a), *Micrasterias* cf. *pinnatifida* (b) e *Cyclotella* sp. (c). Barras de escala = 10µm.

3.2. Curvas de crescimento das microalgas

Os cultivos das microalgas para acompanhamento da curva de crescimento foram feitos em trélicas em frascos Boeco de 1L com 600 mL de meio de cultura WCpH 7,0 (GUILLARD & LORENZEN, 1972) feito com o dobro de sílica. Os cultivos foram mantidos em temperatura de 23 ± 1 °C, intensidade luminosa de ~ 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12h.

O crescimento das culturas foi acompanhado por meio da absorbância e contagem celular, com análises a cada 2 dias, por um período que variou de 18 a 25 dias, de acordo com as espécies das algas. A absorbância foi medida em 680 e 750nm de acordo com Bagatini et al. (2014) e a contagem celular realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal 3.2 (catalog N°. 3720, Hausser Scientific, Horsham, PA).

3.3. Obtenção da biomassa algal para os experimentos

Os cultivos para obtenção da biomassa algal para os experimentos foram realizados nas mesmas condições das curvas de crescimento. O cultivo da cepa CCMA-UFSCar 62 utilizado nos experimentos cresceu durante 13 dias, sob luminosidade de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperíodo 12:12h), em um frasco com 600mL de meio WC pH 7,0 com dobro de sílica e foi concentrada por centrifugação a $7.500xg$ para fornecer a quantidade de células necessárias para o experimento. As culturas de *M. cf. pinnatifida* (CCMA-UFSCar 89) e *Cyclotella* sp. (CCMA-UFSCar BB041) cresceram nas mesmas condições por 4 e 7 dias, respectivamente. Na primeira e na segunda etapa dos experimentos (descrito na sessão **Desenho Experimental**), a cepa de *Micrasterias* foi centrifugada a $7.000 xg$ e a de *Cyclotella* sp. a $3.000xg$.

3.4. Cultivo dos Quironomídeos

Inicialmente as larvas de *Chironomus* cf. *xanthus* foram disponibilizadas pelo Laboratório de Entomologia Aquática (LEA) no Departamento de Hidrobiologia da Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos. Entretanto, a chegada da pandemia interrompeu a manutenção da criação, acarretando na morte das larvas. Logo, iniciamos uma nova criação a partir de desovas fornecidas pelo Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), do Departamento de Hidráulica e

Saneamento, na Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Campus 2.

Duas desovas foram realocadas para o LEA e acondicionadas em bandeja com 2L de água filtrada, matéria orgânica vegetal triturada e areia (granulometria <0,5mm), e oxigenação por borbulhamento, coberta por uma gaiola telada com nylon. As larvas foram alimentadas com Ração Alcon Basic: alimento completo em flocos para peixes ornamentais, a cada dois dias. Os cuidados incluíram fazer anotações do número de desovas, limpeza do substrato e troca de água.

No dia anterior a cada experimento, cerca de 20 a 30 larvas (de terceiro e quarto instar) foram colocadas em uma placa de Petri grande e levadas ao Laboratório de Ficologia (UFSCar), onde foram novamente realocadas para uma outra placa, em 60mL de meio WC com o dobro de sílica e 4g de areia fina calcinada (400 °C por 6h e 45min), para evitar possível canibalismo (FROUZ *et al.*, 2004b). Esse processo de aclimação das larvas ocorreu por 24h e sem alimentação (FROUZ *et al.*, 2004b), com fotoperíodo de 12h sob luminosidade de 43-53 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para o primeiro experimento (*D. spinosus*) (Incubadora B.O.D 411D - Nova Ética, Brasil) e de 53,5-63 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para os experimentos posteriores (*Micrasterias* e *Cyclotella*) (Incubadora Infors HT Multitron, Suíça).

Para o experimento, foram usadas larvas de terceiro e quarto instares, porque estariam mais desenvolvidas e com menos seletividade na dieta do que larvas menores (BERG, 1995). Nesses instares as larvas se alimentam muito para que tenham estoque energético nos últimos estágios de desenvolvimento, uma vez que, na curta fase adulta, os quironomídeos não se alimentam (FONSECA & ROCHA, 2004).

3.5. Desenho experimental

O primeiro experimento foi realizado com *D. spinosus* (CCMA-UFSCar 62) e ocorreu em apenas uma etapa, com o contato direto do predador com as microalgas (Figura 2). Esse primeiro desenho foi alterado e adaptado (Figura 3), resolvendo algumas dificuldades que surgiram ao longo do experimento, como a agregação das microalgas nos tubos construídos pelas larvas. Os experimentos posteriores foram realizados com *Micrasterias* cf. *pinnatifida* (CCMA-UFSCar 89) e *Cyclotella* sp. (CCMA-UFSCar BB041) em duas etapas, a primeira de obtenção dos excretados e a

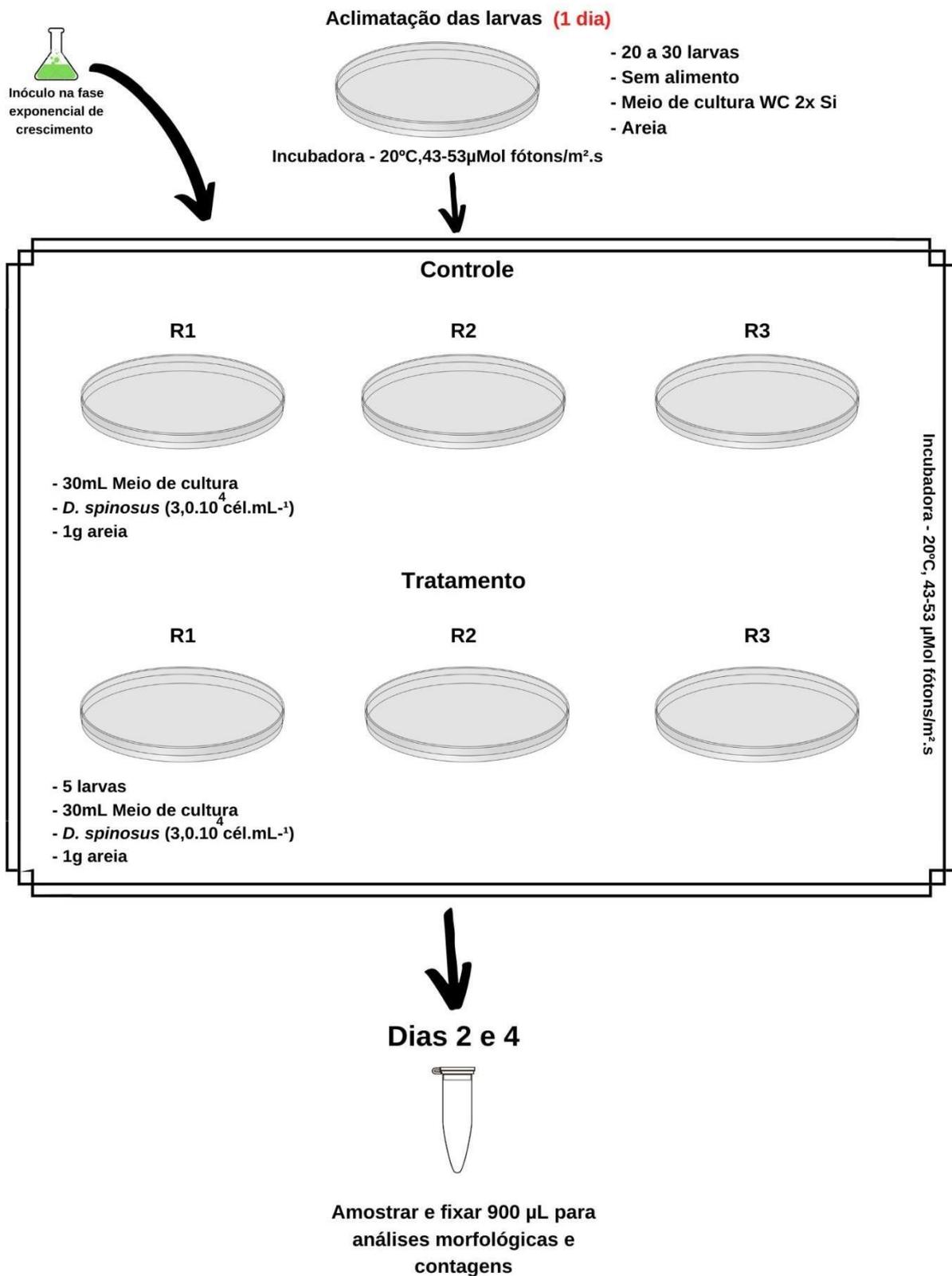
segunda de amostragens para a avaliação da morfologia das algas na presença indireta das larvas.

3.5.1. *Experimento 1 – predação direta*

No experimento com *D. spinosus* (Figura 2), 5 larvas de terceiro e quarto ínstares foram colocadas em placas de Petri (em triplicata) com 30mL de meio WC (com o dobro de sílica); 1g de areia previamente calcinada; e $3,0 \times 10^4$ células da microalga.mL⁻¹. No controle, as placas foram montadas com as mesmas condições dos tratamentos, mas sem os quironomídeos.

O experimento teve duração de 4 dias, sendo que nos dias 2 e 4 ocorreram as amostragens de uma alíquota de 900 µL do meio de cada uma das placas. Essa alíquota foi fixada em formalina (formol 4%) e armazenada até as análises microscópicas de morfologia celular e contagens. Após o quarto dia no experimento com *D. spinosus*, as larvas foram fixadas e tiveram seus tubos gastrointestinais abertos para montagem de lâminas com solução de Hoyer (TRIVINO-STRIXINO, 2011). Dessa forma foi possível afirmar se as algas foram predadas.

Desenho experimental - *Desmodesmus spinosus* (CCMA-UFSCar 062)



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Figura 2. Desenho do experimento realizado com *Desmodesmus spinosus* (CCMA-UFSCar 62) sob predação direta de *Chironomus cf. xanthus*.

3.5.2. Experimento 2 – efeito indireto do predador

Este experimento foi realizado com as cepas de *M. cf. pinnatifida* e com *Cyclotella* sp. (Figura 3). Na primeira etapa, foram montadas 2 culturas para cada cepa em frascos de cultura de tecido, um tratamento e outra controle. O tratamento tinha o volume total de 30mL de meio WC com dobro de sílica, e $3,0 \times 10^4$ células de microalgas.mL⁻¹, 2g de areia calcinada e 8 a 9 larvas (1 larva a cada 4mL) (FROUZ *et al.*, 2004b). O frasco controle foi montado nas mesmas condições, apenas não continha as larvas, mas foi adicionado 1mL do meio da placa de aclimação (BERGKEVIST *et al.*, 2012), que serviu como controle das bactérias e fungos vindos com os quironomídeos.

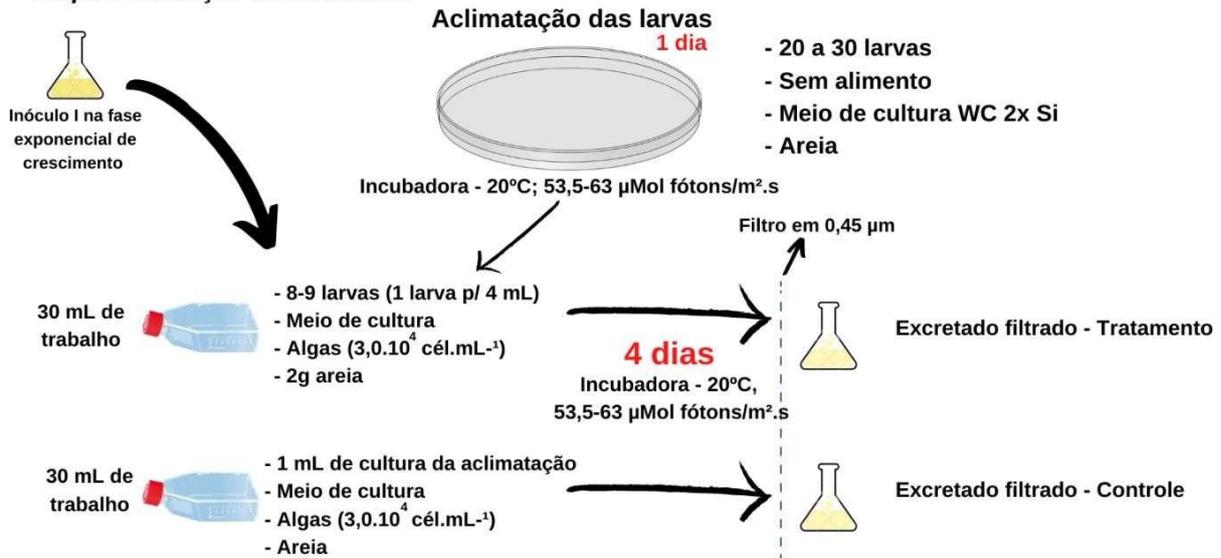
Os frascos foram incubados por 4 dias, a 20°C e luminosidade de 53,5-63 μmol de fótons m⁻² s⁻¹. Após os 4 dias o conteúdo de cada frasco foi filtrado em filtro de fibra de vidro com poro de 0,45 μm para obtenção dos excretados (controle e tratamento) (BERGKEVIST *et al.*, 2012; LAFORSCH *et al.*, 2006; HA *et al.*, 2004), que foram utilizados na segunda etapa dos experimentos (Figura 3). Antes da filtração, ao final da primeira etapa, as larvas da garrafa tratamento foram retiradas e fixadas em formalina.

A segunda etapa ocorreu em tubos de ensaio, em tréplicas. Nos tubos do tratamento (predação indireta) foram colocados 2mL de inóculo de microalgas e 4mL do excretado filtrado da garrafa do tratamento. Para obtenção dos inóculos utilizados nessa etapa, as culturas de *Micrasterias* e *Cyclotella* foram concentradas por centrifugação, de forma que nos tubos experimentais, a concentração final de células era de $5,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ (CCMA-UFSCar 89) e $3,0 \times 10^4$ células.mL⁻¹ (CCMA-UFSCar BB041) (Figura 3). O mesmo procedimento foi realizado com os tubos do controle, utilizando o excretado filtrado da garrafa controle obtido no final da etapa I.

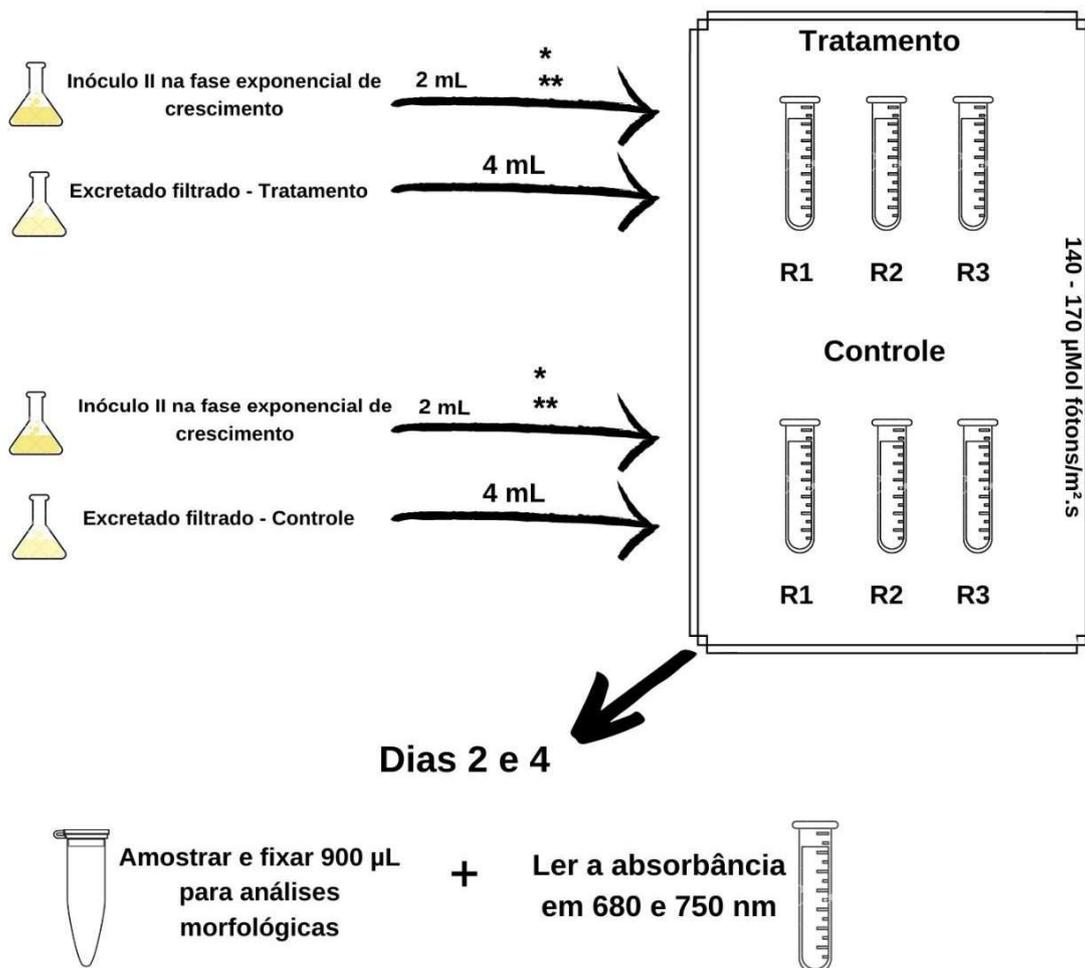
Depois de montados, os tubos foram incubados por 4 dias sobre uma caixa de luz com 140-170 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo 12:12h. Alíquotas de 900 μL foram retiradas e fixadas após 2 e 4 dias para as análises morfológicas e contagens. Diariamente, foram realizadas análises de absorvância nos comprimentos de onda 680 e 750 nm, para acompanhamento do crescimento das culturas. (BAGATINI *et al.*, 2014).

Desenho experimental - *Micrasterias* (CCMA-UFSCar 89) e *Cyclotella* (CCMA-UFSCar BB041)

Etapa I: obtenção do excretado



Etapa II: avaliação da morfologia das algas na presença da larva



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

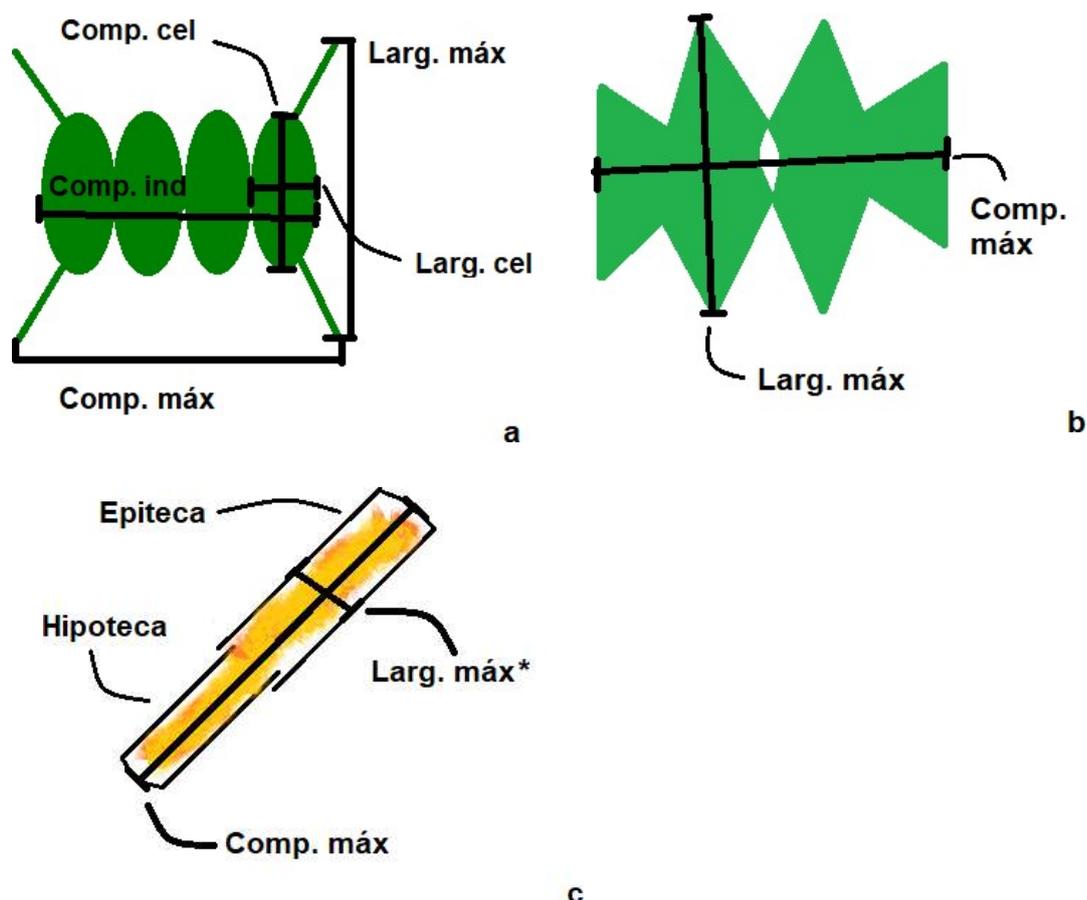
Figura 3. Desenho experimental aplicado para *Micrasterias* cf. *pinnatifida* (CCMA-UFSCar 89) e *Cyclotella* sp. (CCMA-UFSCar BB041) sob efeito indireto (excretado) de *Chironomus* cf. *xanthus*. (*) $5,0 \times 10^3$ células. mL^{-1} de *Micrasterias* (**) $3,0 \times 10^4$ células. mL^{-1} de *Cyclotella* sp.

3.6. Densidade celular e Análises morfológicas

As contagens (número de células e colônias), além da quantificação de formação de possíveis agregados celulares, foram realizadas em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio ótico Axioplan 2 (Zeiss).

As medidas de largura e comprimento das células e cenóbios foram realizadas em fotografias capturadas com microscópio ótico Axioplan 2 (Zeiss) e com auxílio do software de análise de imagens Axiovision 4.5 (Zeiss).

As medidas da *D. spinosus* foram: largura celular, comprimento celular, comprimento do indivíduo (cenóbio sem considerar os espinhos), largura máxima e comprimento máximo (considerando os espinhos) (Figura 4a). A largura do indivíduo (cenóbio) coincidia com o comprimento celular, por isso foi desconsiderada. As dimensões utilizadas em *Micrasterias* e *Cyclotella* para fazer inferências foram o comprimento e largura máximos do indivíduo (célula) (Figuras 4b e 4c).



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Figura 4. Medidas feitas em *D. spinosus* (a), em *M. pinnatifida* (b) e em *Cyclotella* sp. (c). Larg. máx (largura máxima), Comp. máx (comprimento máximo), Comp. ind (comprimento do indivíduo, neste caso, do cenóbio sem os espinhos), Larg. cel (largura celular) e Comp. cel (comprimento celular). (*) A cepa de *Cyclotella* tem sido mantida há anos em cultivo sem reprodução sexuada observada e, possivelmente por isso, sua largura era menor do que o comprimento.

Foram analisados, de cada réplica, pelo menos 30 indivíduos distribuídos em 5 ou mais campos aleatórios. Os cenóbios em *Desmodesmus spinosus* foram quantificados e a quantidade de células por cenóbio registrada. Em *Cyclotella* sp. foi quantificado o número de indivíduos com mais de uma célula, entretanto não foi possível determinar o número de células nesses indivíduos.

3.7. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para amostras com dados de distribuição normal ($p > 0,05$), o teste F de variância foi aplicado - verificando a homoscedasticidade dos dados ($p > 0,05$) - seguido do teste T de Student. Os dados com distribuição não normal (Shapiro-Wilk com $p < 0,05$), foram submetidos a um método estatístico não paramétrico, com a aplicação do teste de Levene (análise de variância), seguido do teste U de Mann-Whitney – robusto para variâncias homo e heterocedásticas.

Esse tratamento estatístico permitiu, para cada dia e cada variável, a comparação dos dados das réplicas do controle com as réplicas do tratamento, considerando $\alpha = 0,05$. Os testes, gráficos de barra e Boxplots foram feitos no Rstudio (RStudio Team, 2019; R Core Team, 2021), enquanto os gráficos de linha foram plotados no Excel.

4. Resultados

4.1. Curvas de crescimento

As curvas foram realizadas para determinar a duração das diferentes fases de crescimento. Para a realização dos experimentos, apenas a curva de absorvância a 680-750 nm foi utilizada como referência. A biomassa algal para os experimentos foi obtida na fase de crescimento exponencial, que variou conforme a cepa.

Desmodesmus spinosus

A partir dos dados coletados foi possível constatar que o fim da fase exponencial de crescimento em *D. spinosus* foi alcançado por volta do dia 15 do cultivo (Figura 5).

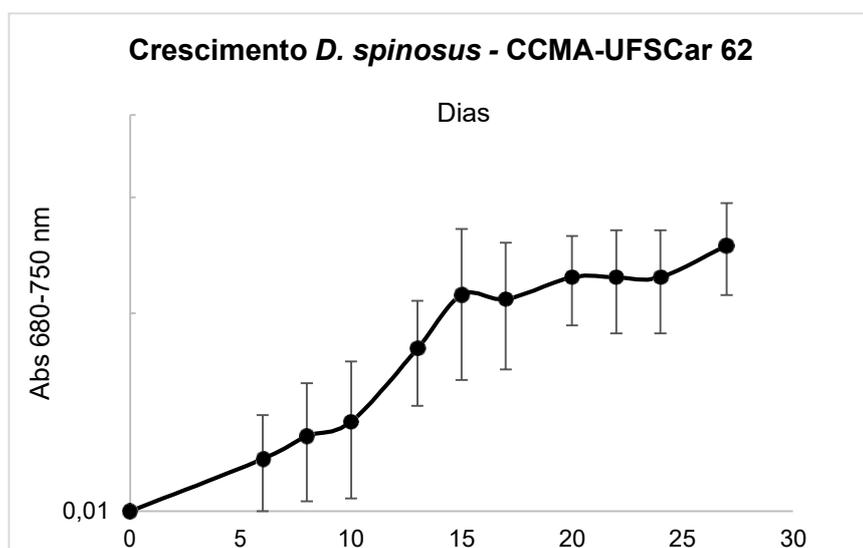


Figura 5. Curva de crescimento de *D. spinosus* ao longo de 21 dias (Log10 da absorvância em 680-750 nm). A curva foi utilizada para determinação da fase de crescimento exponencial para a obtenção da biomassa algal do experimento. As barras de erros representam o desvio-padrão (n=3).

Micrasterias cf. pinnatifida

Em *Micrasterias* a fase exponencial findou-se aproximadamente no quarto dia de cultivo (Figura 6).

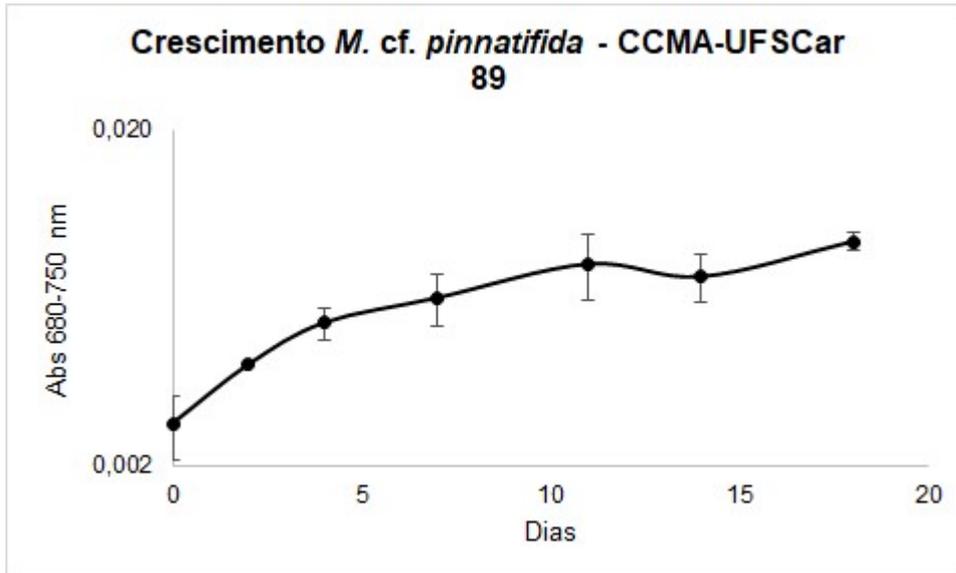


Figura 6. Curva de crescimento de *Micrasterias cf. pinnatifida* ao longo de 18 dias (Log10 da absorbância em 680-750 nm). A curva foi utilizada para determinação da fase de crescimento exponencial para a obtenção da biomassa algal do experimento. As barras de erros representam o desvio-padrão (n=3).

Cyclotella sp.

A fase exponencial de crescimento em *Cyclotella* sp. terminou em torno do sétimo dia do cultivo (Figura 7).

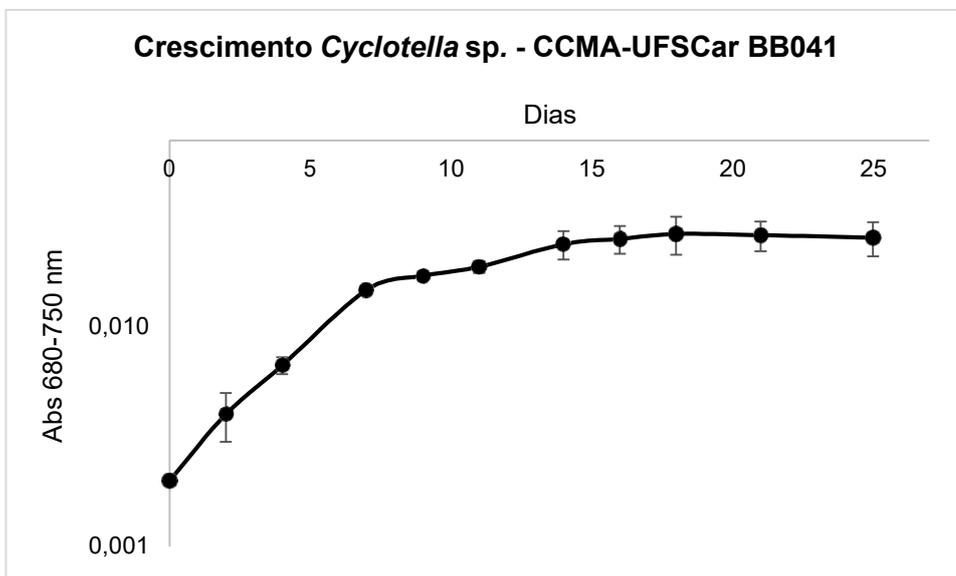


Figura 7. Curva de crescimento de *Cyclotella* sp. ao longo de 25 dias (Log10 da absorbância em 680-750 nm). A curva foi utilizada para determinação da fase de crescimento exponencial para a obtenção da biomassa algal do experimento. As barras de erros representam o desvio-padrão (n=3).

4.2. Efeito da predação no crescimento das microalgas

Desmodesmus spinosus

Em *D. spinosus* não houve diferença significativa no crescimento, avaliado por contagem celular (Figura 8, Tabela 1), quando em contato direto com o predador em relação ao controle ($p > 0,05$) (Tabela S1).

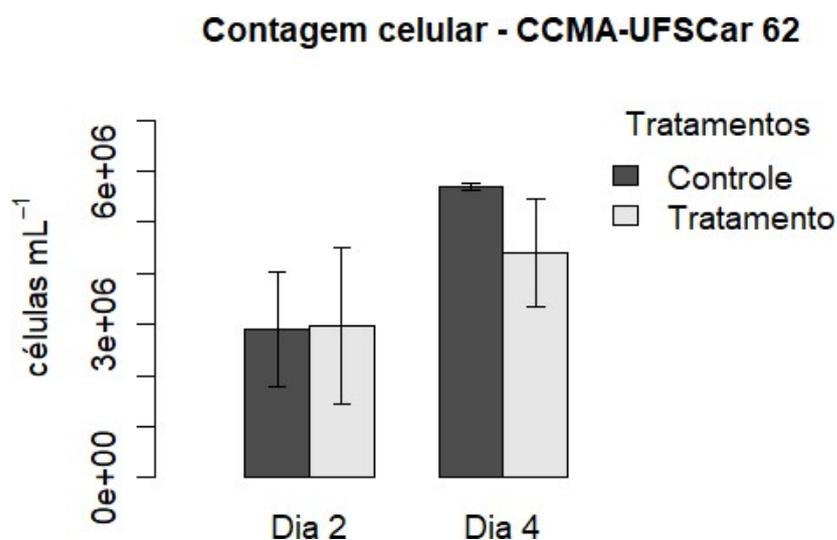


Figura 8. Densidade celular (células.mL⁻¹) do controle (sem quironomídeos) e do tratamento (com quironomídeos) nos dias 2 e 4 do experimento com a CCMA-UFSCar 62. As barras de erros representam o desvio-padrão (n=3).

Tabela 1. Densidade celular (células.mL⁻¹) do controle e tratamento nos dias 2 e 4 do experimento com a *Desmodesmus spinosus* CCMA-UFSCar 62. DP, desvio-padrão (n=3)

CCMA-UFSCar 62	Controle (sem quironomídeos)		Tratamento (com quironomídeos)	
	q Média	DP	Média	DP
Dia 2	2,9.10 ⁶	1,1.10 ₆	3,0.10 ⁶	1,5.10 ⁶
Dia 4	5,7.10 ⁶	3,8.10 ₄	4,4.10 ⁶	1,1.10 ⁶

Micrasterias cf. pinnatifida

Os dados obtidos com *M. cf. pinnatifida* revelam que a densidade celular (células.mL⁻¹), aumentou significativamente no quarto dia em contato indireto com o predador, quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 9, Tabela 2, Tabela S2). No segundo dia do experimento, o contato das microalgas com o excretado das larvas acarretou no aumento expressivo da produção de clorofila *a* na cultura, avaliada por meio da absorvância 680-750nm (Figura 10, Tabela S3), e no aumento da concentração de clorofila por célula (Figura 11, Tabela S5). A absorvância em 750 nm, que possui maior correspondência com a biomassa (GRIFFITHS *et al.*, 2011), foi significativamente maior no tratamento nos dias 2 e 4, sendo congruente com os dados de contagem celular para o último dia (Figura 12, Tabela S4).

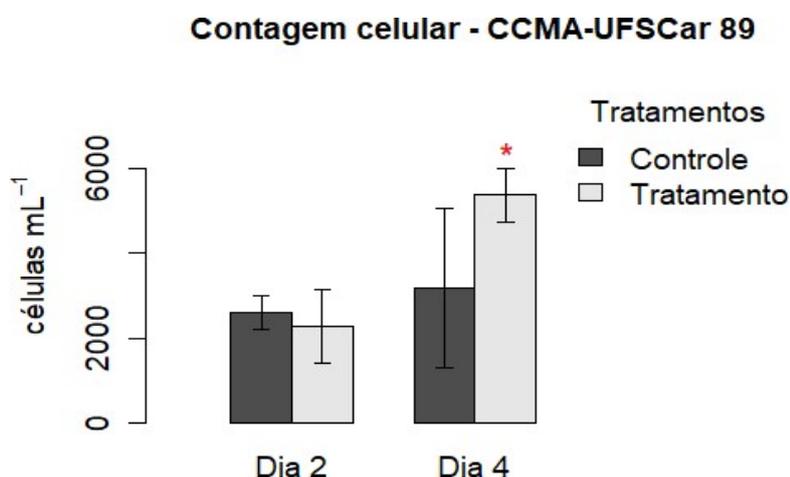


Figura 9. Densidade celular (células.mL⁻¹) de *Micrasterias cf. pinnatifida* (CCMA-UFSCar 89) nas culturas do controle (sem quironomídeos) e do tratamento (com excretado de quironomídeos) nos dias 2 e 4 do experimento. Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão (n=3).

Tabela 2. Densidade celular (células.mL⁻¹) do controle e tratamento nos dias 2 e 4 do experimento com a *Micrasterias cf. pinnatifida* CCMA-UFSCar 89. DP, desvio-padrão (n=3)

CCMA-UFSCar 89	Controle (sem quironomídeos)		Tratamento (com quironomídeos)	
	Média	DP	Média	DP
Dia 2	2,6.10 ³	0,4.10 ³	2,3.10 ³	0,9.10 ³
Dia 4	3,2.10 ³	1,9.10 ³	5,4.10 ³	0,6.10 ³

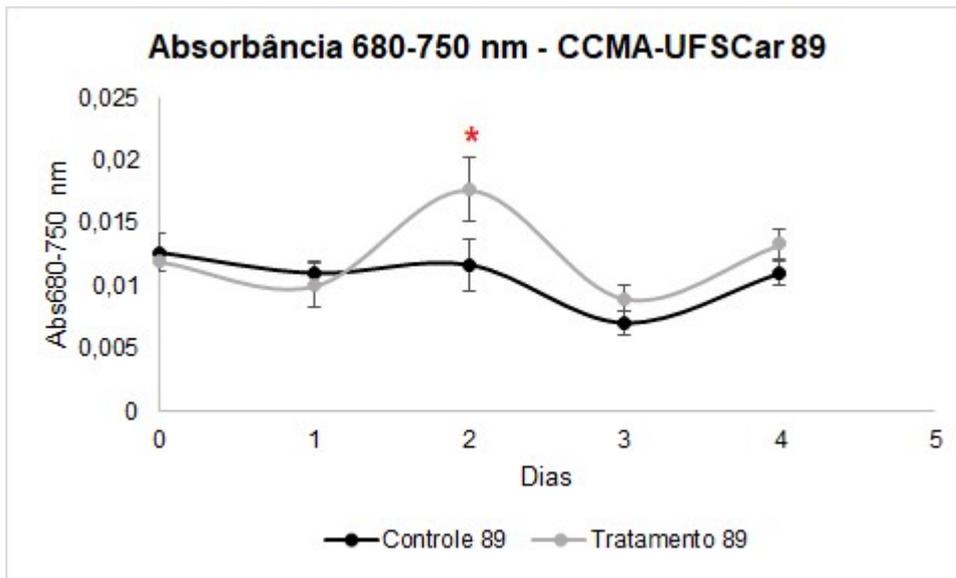


Figura 10. Absorbância em 680-750 nm ao longo dos 4 dias de experimento com *Micrasterias* cf. *pinnatifida* no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos). Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

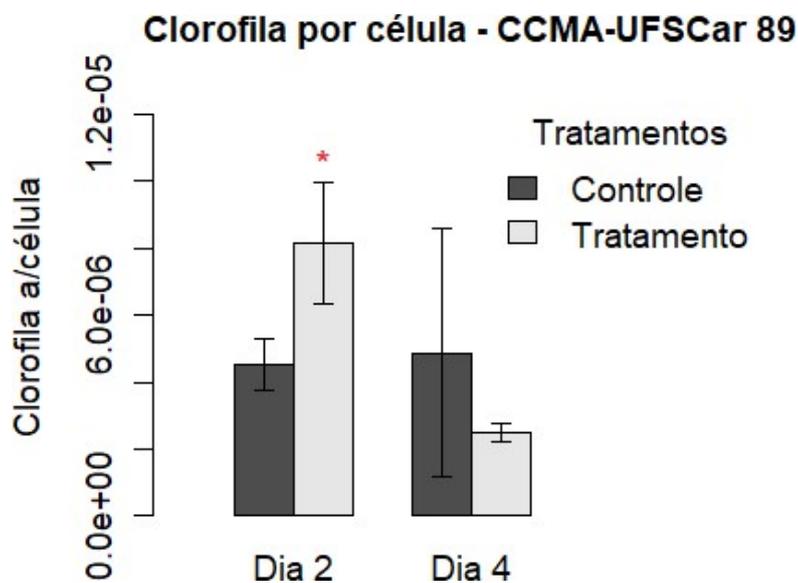


Figura 11. Estimativa da concentração de clorofila *a* por célula em *Micrasterias* nos dias 2 e 4 do experimento no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos). Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

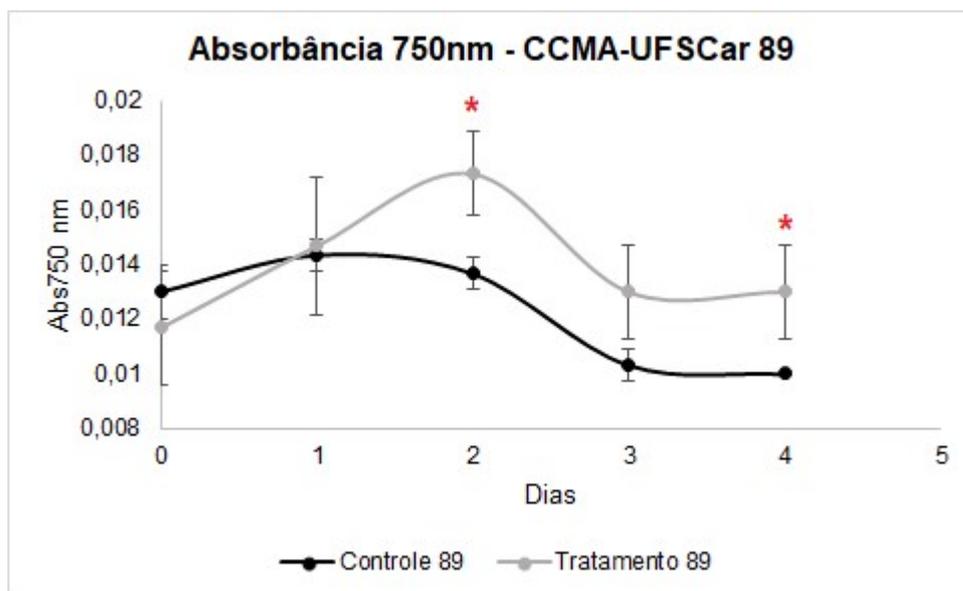


Figura 12. Absorbância em 750 nm ao longo dos 4 dias de experimento com *Micrasterias cf. pinnatifida* no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos). Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

Cyclotella sp.

Em *Cyclotella* sp. não houve mudança significativa entre controle e tratamento no número total de células ao longo dos 4 dias de experimento ($p > 0,05$) (Figura 13, Tabela 3). A absorbância 680-750 nm, usada como estimativa da concentração de clorofila *a*, foi significativamente maior nos dias 2, 3 e 4 na cultura em contato indireto com os quironomídeos ($p < 0,05$) (Figura 14, Tabela S7). Entretanto, durante o experimento, a estimativa da concentração de clorofila *a* por célula não apresentou alteração estatisticamente relevante entre os tratamentos (Figura 15, Tabela S9). Do primeiro ao terceiro dia, a biomassa - expressa pela absorbância em 750 nm (GRIFFITHS *et al.*, 2011) - aumentou significativamente quando em contato com os predadores (Figura 16, Tabela S8).

Contagem celular - CCMA-UFSCar BB041

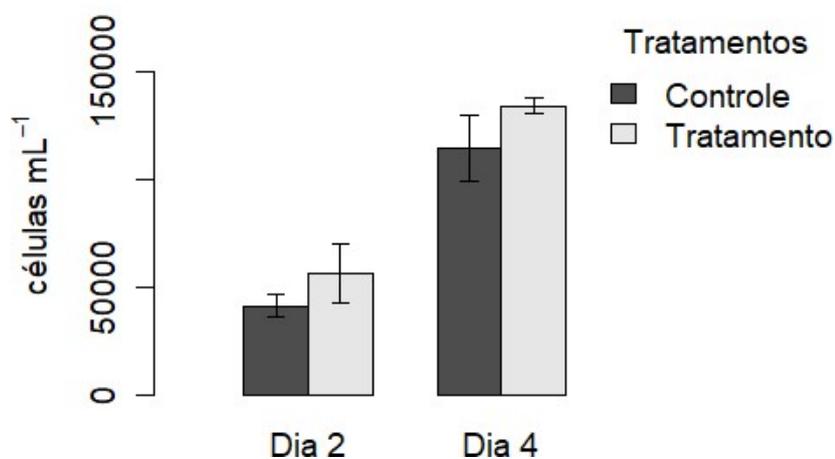


Figura 13. Densidade celular (células.mL⁻¹) de *Cyclotella* sp. no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos) nos dias 2 e 4 do experimento (n=3). A barra de erros representa o desvio-padrão (n=3).

Tabela 3. Densidade celular (células.mL⁻¹) do controle e tratamento nos dias 2 e 4 do experimento com a *Cyclotella* sp. CCMA-UFSCar BB041. DP, desvio-padrão (n=3)

CCMA-UFSCar BB041	Controle (sem quironomídeos)		Tratamento (com quironomídeos)	
	Média	DP	Média	DP
Dia 2	4,2.10 ⁴	5,5.10 ³	5,7.10 ⁴	1,4.10 ₄
Dia 4	1,1.10 ⁵	1,6.10 ⁴	1,3.10 ⁵	3,3.10 ₃

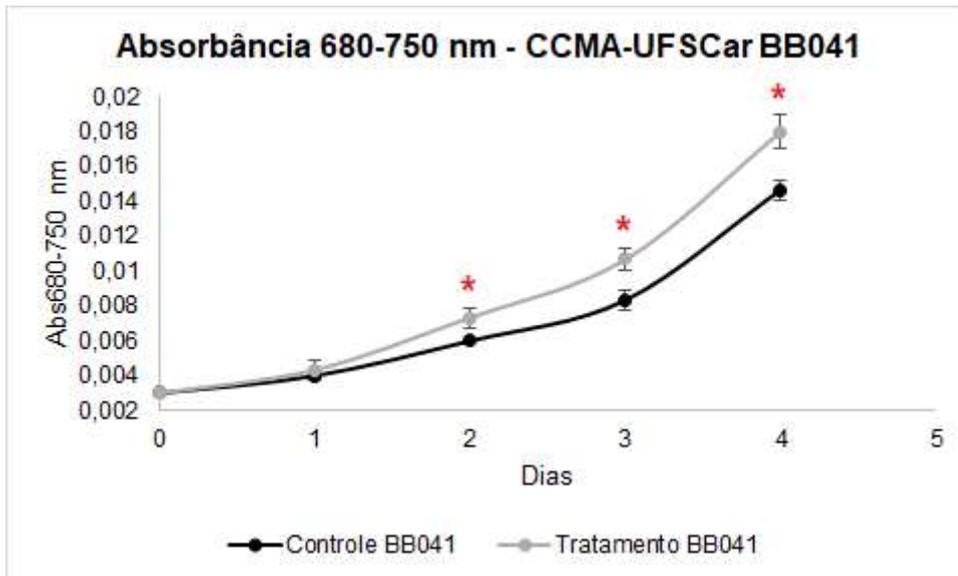


Figura 14. Absorbância em 680-750nm ao longo dos 4 dias de experimento com *Cyclotella* sp. no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos). Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

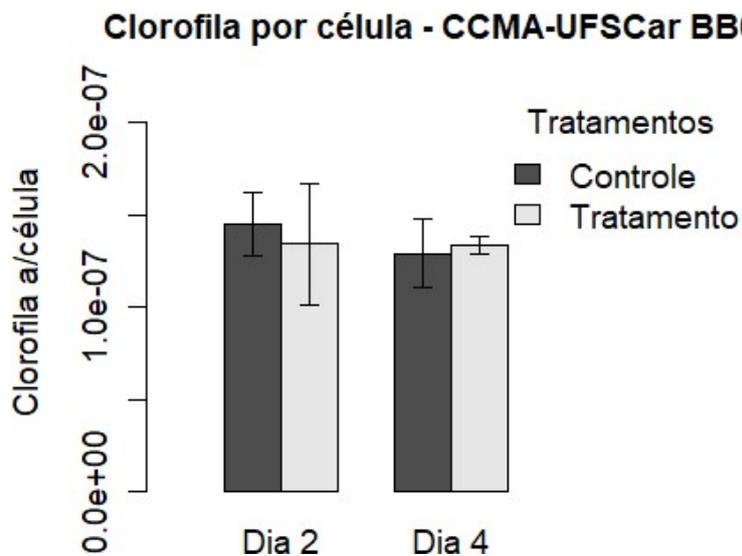


Figura 15. Concentração de Clorofila a por célula em *Cyclotella* sp. no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos) nos dias 2 e 4 do experimento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

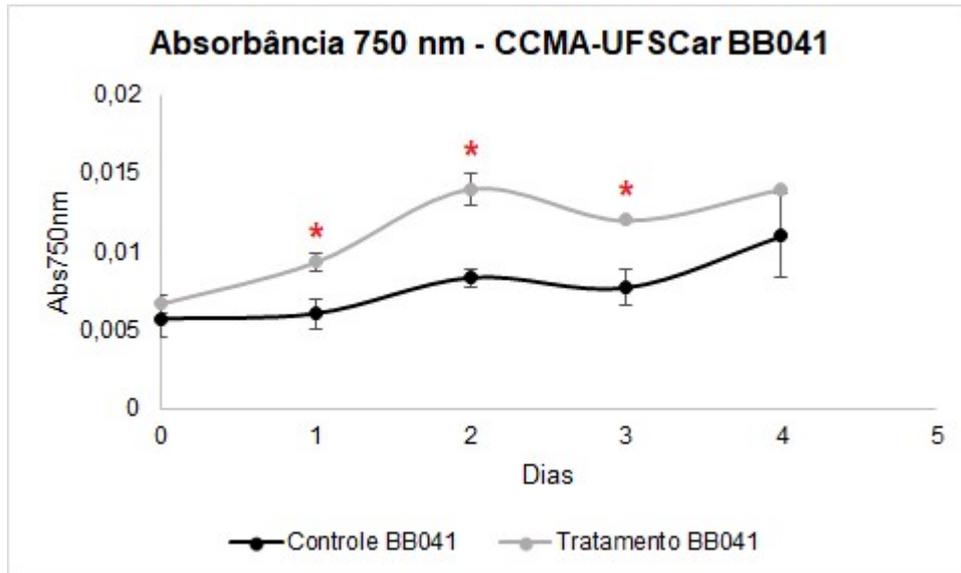


Figura 16. Absorbância em 750nm ao longo dos 4 dias de experimento com *Cyclotella* no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com excretado de quironomídeos). Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. A barra de erros representa o desvio-padrão ($n=3$).

4.3. Formação de aglomerados ou alterações no número de colônias e/ou células por colônia

Desmodesmus spinosus

Após os quatro dias de experimento com *D. spinosus* não foram detectadas quaisquer mudanças no número médio total de indivíduos ($p > 0,05$) (Figura 17) – cada cenóbio foi considerado como um indivíduo. Analisando as proporções médias de indivíduos unicelulares, de 2 e de 4 células, em relação ao total de indivíduos, observou-se no tratamento com as larvas o aumento significativo dos indivíduos unicelulares - nos dias 2 e 4 - e a redução significativa dos cenóbios com 4 células ($p < 0,05$) no quarto dia (Figura 18) (Tabela S1). Não houve aglomeração de células nos indivíduos, tanto na presença quanto na ausência dos dípteros.

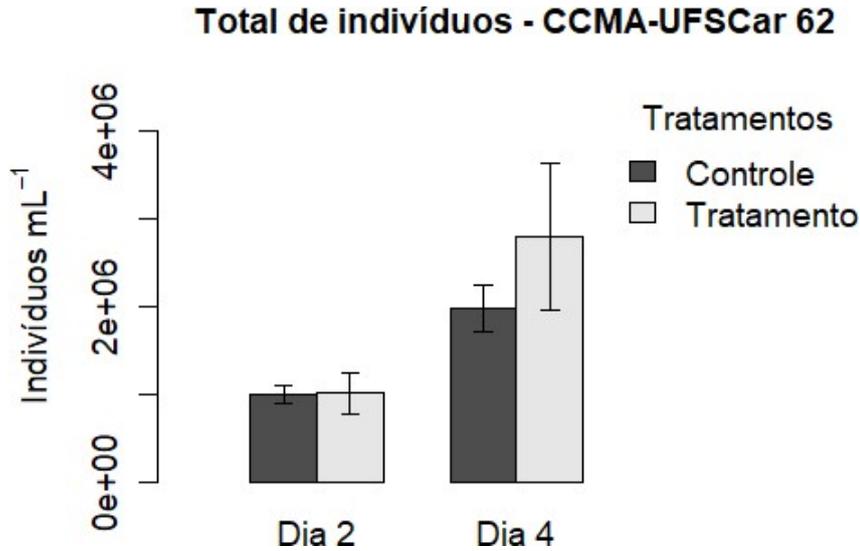


Figura 17. Total de indivíduos (indivíduos.mL⁻¹) na cultura de *D. spinosus* no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com quironomídeos) nos dias 2 e 4. A barra de erros representa o desvio-padrão (n=3).

Micrasterias cf. *pinnatifida*

Em *Micrasterias*, ao longo dos 4 dias de experimento, as células não formaram agregados ou colônias, tanto quando em contato indireto com os quironomídeos, quanto no controle.

Cyclotella sp.

Apesar de não formar aglomerados celulares, essa diatomácea demonstrou uma elevação significativa no número de indivíduos com mais de uma célula ($p < 0,05$) (Tabela S6), após o quarto dia na presença indireta do predador (Figura 19, Tabela 4). Isso indica que a célula sofreu divisão celular, no entanto não houve a separação das valvas das células filhas, formando um indivíduo filamentosos (Figura S1).

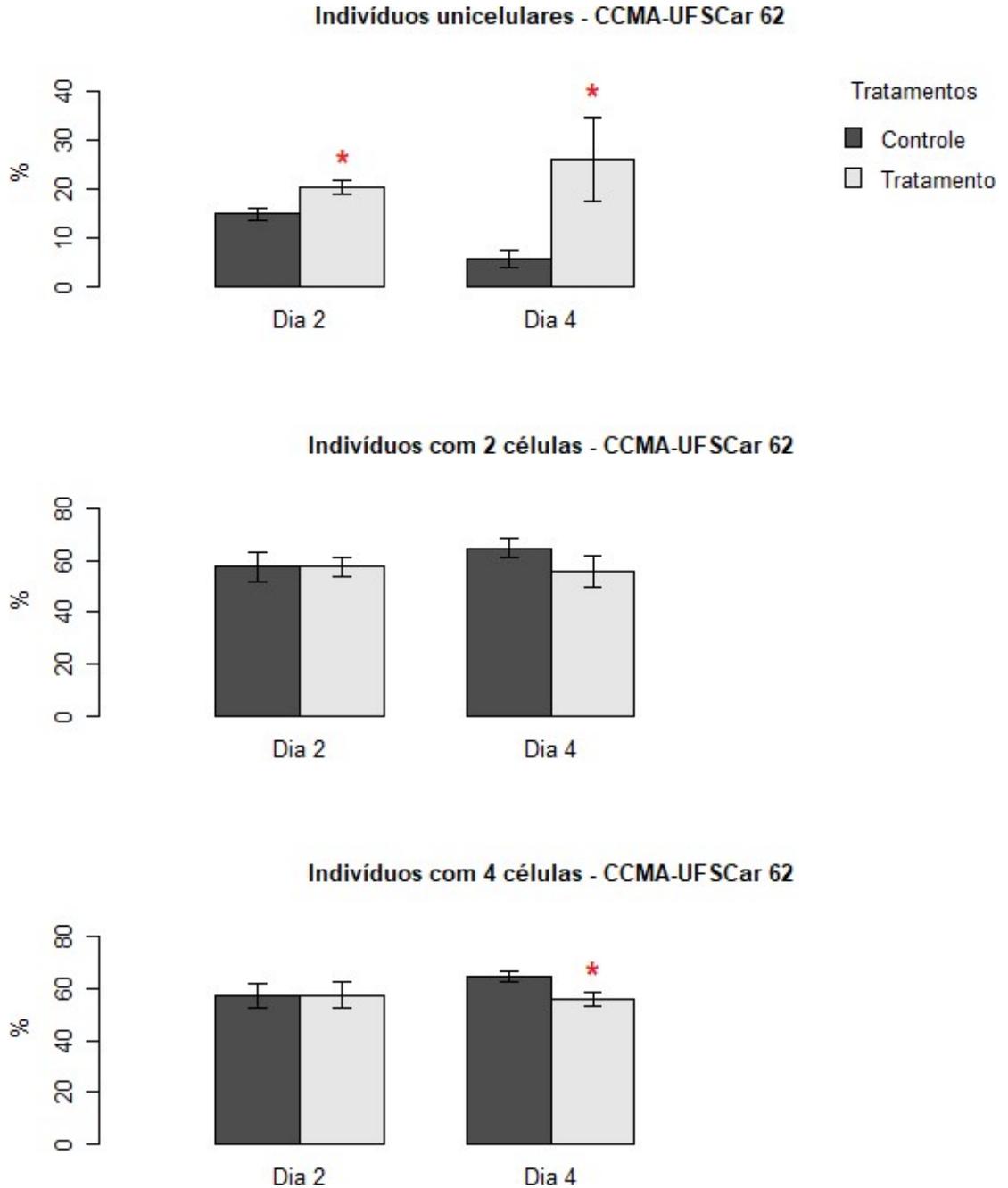


Figura 18. Proporções (%) de indivíduos unicelulares e de cenóbios de 2 e de 4 células de *D. spinosus* nos dias 2 e 4. Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle (sem quironomídeos) e tratamento (com quironomídeos). As barras de erros representam o desvio-padrão ($n=3$).

Indivíduos com mais células - CCMA-UFSCar BB041

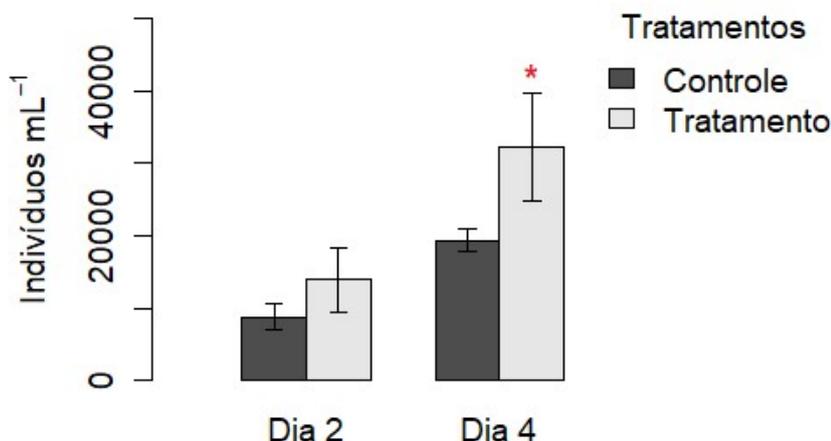


Figura 19. Média de indivíduos com mais de uma célula (indivíduos.mL⁻¹) do controle (sem quironomídeos) e tratamento (com excretado de quironomídeos) nos dias 2 e 4 do experimento com *Cyclotella* sp. Asterisco em vermelho indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. As barras de erros representam o desvio-padrão ($n=3$).

Tabela 4. Médias (indivíduos.mL⁻¹) e desvios-padrão (DP, $n=3$) de indivíduos com mais de uma célula do controle e tratamento nos dias 2 e 4 (*Cyclotella* sp.)

CCMA-UFSCar BB041	Controle (sem quironomídeos)		Tratamento (com quironomídeos)	
	Média	DP	Média	DP
Dia 2	$8,9 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^3$
Dia 4	$1,9 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^3$

4.4. Verificação de alterações nas medidas lineares nas microalgas na presença do predador

Desmodesmus spinosus

Em *Desmodesmus*, observamos que no segundo dia em contato direto com as larvas houve um aumento expressivo da largura máxima ($p < 0,0001$) e uma redução significativa no comprimento dos cenóbios, isto é, sem considerar a extensão dos espinhos ($p < 0,05$) (Figura 20a e 20b, Tabela S1). No quarto dia, os cenóbios do tratamento com os predadores, apresentaram a largura máxima e o comprimento máximo significativamente maiores que no controle ($p < 0,0001$; $p = 0,001$, respectivamente) (Figura 20a, Tabela S1). Desse modo, é possível inferir que as alterações ocorreram no tamanho dos quatro espinhos (Figura S2), uma vez que houve o crescimento das dimensões máximas, mas não do comprimento dos indivíduos (ver detalhes de medidas na Figura 4).

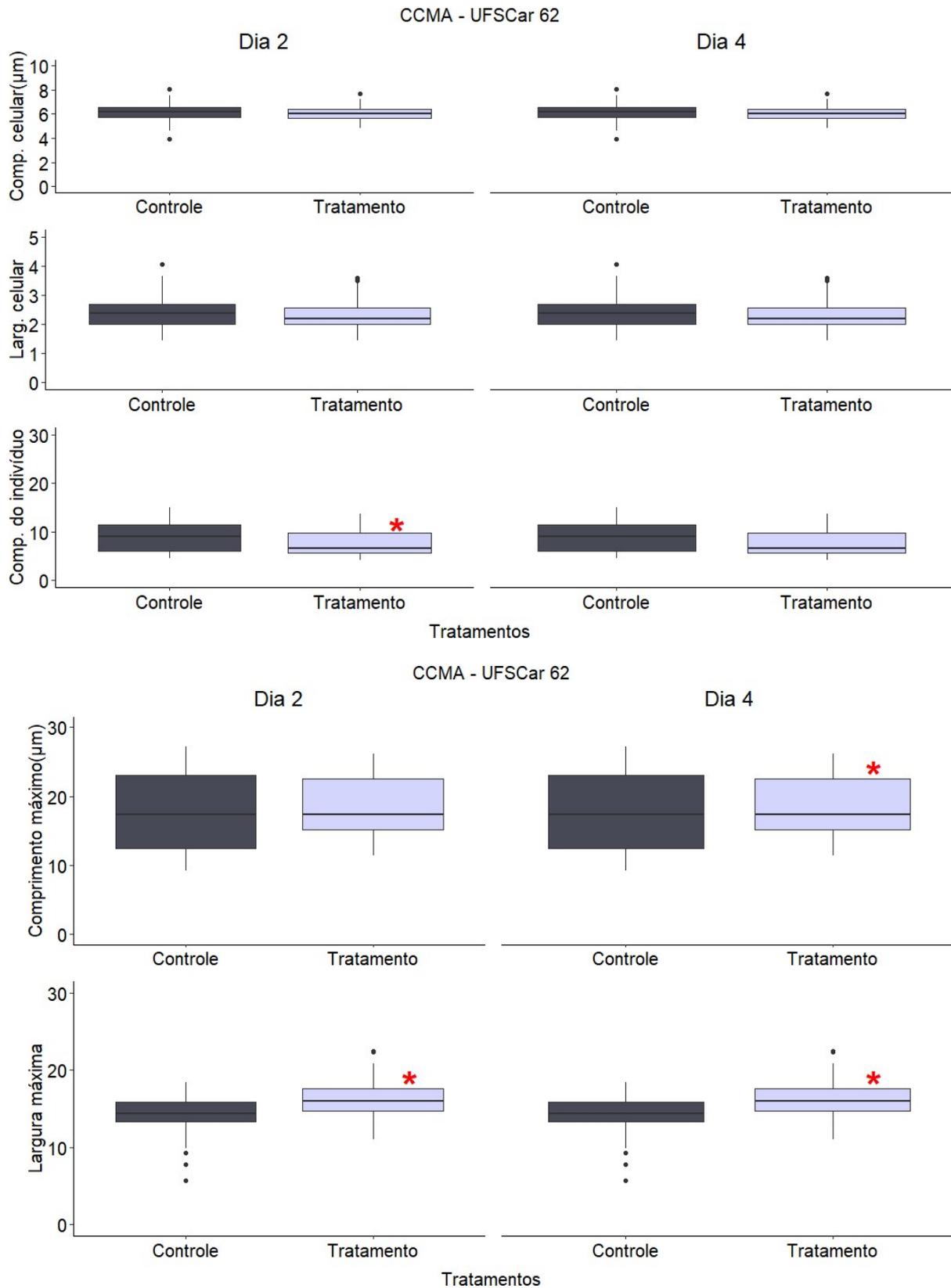


Figura 20. Boxplots de comprimento celular (Comp. celular), largura celular (Larg. celular) e comprimento dos cenóbios (Comp. do indivíduo) (a); de comprimento e largura máximos dos indivíduos (b), em micrômetros, dos cultivos de *D. spinosus* no controle (sem quironomídeos) e no tratamento (com quironomídeos) nos dias 2 e 4. Asterisco em vermelho indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre controle e tratamento ($n=30$).

Micrasterias cf. pinnatifida

Durante os 4 dias de experimento com *Micrasterias*, não foi observada qualquer alteração significativa nas dimensões lineares das células ($p > 0,05$) (Figura 4, Tabela S2) - comprimento e largura máximos - ao comparar o controle com o tratamento (presença indireta do predador) (Figura 21).

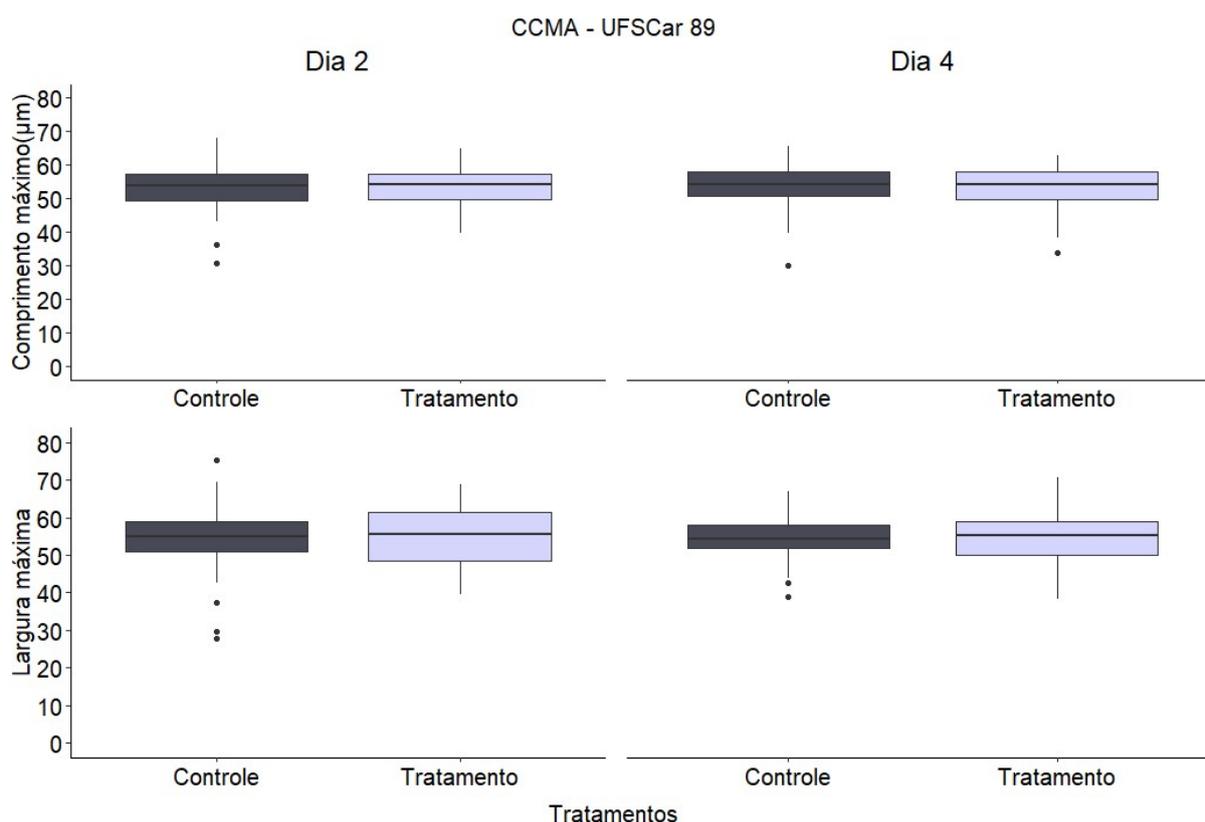


Figura 21. Boxplots de comprimento e largura máximos dos indivíduos (em micrômetros) das culturas controle (sem quironomídeo) e tratamento (com excretado de quironomídeo) de *Micrasterias* nos dias 2 e 4. N=30.

Cyclotella sp.

No segundo dia de experimento, a cultura de *Cyclotella sp.* submetida ao efeito da presença indireta dos quironomídeos, demonstrou um considerável aumento na largura máxima dos indivíduos ($p < 0,05$) (Tabela S6). Após o quarto dia, ambas dimensões lineares dos indivíduos - a largura e o comprimento máximos (Figura 4) - foram significativamente maiores no tratamento, em comparação com o controle (Figura 22).

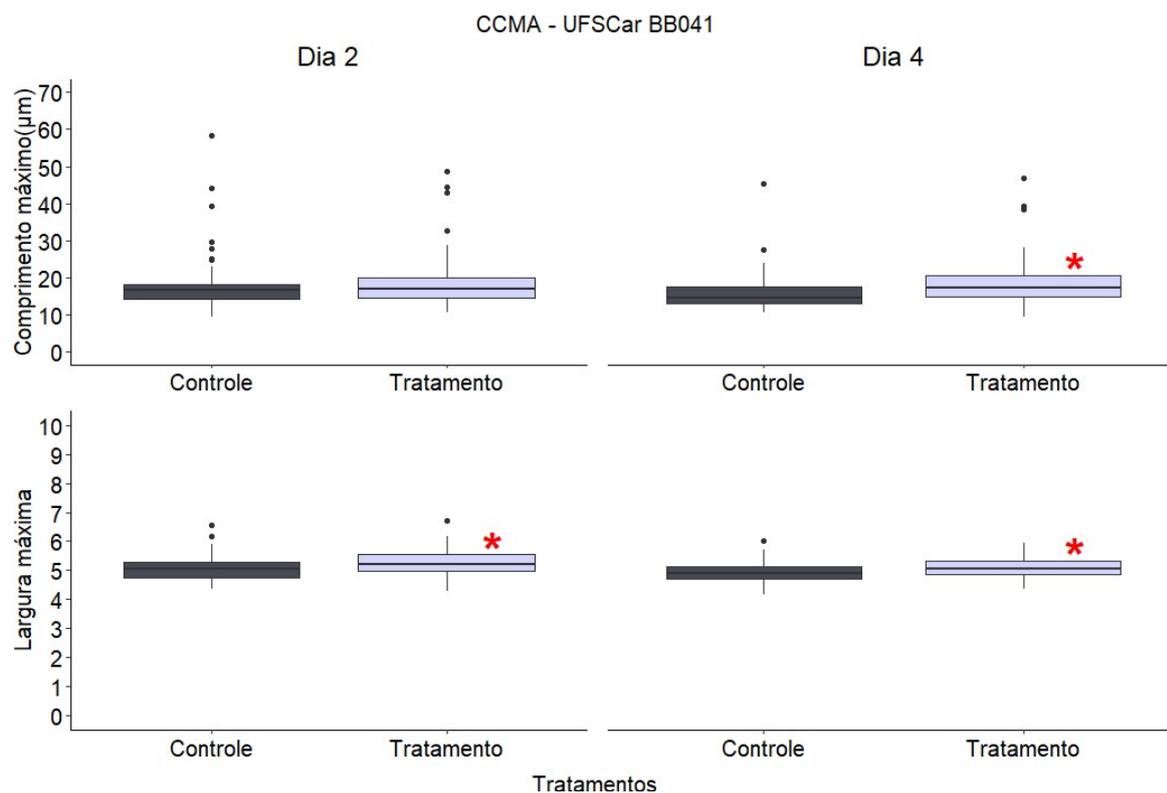


Figura 22. Boxplots de comprimento e largura máximos dos indivíduos (em micrômetros) dos cultivos controle (sem quironomídeos) e tratamento (com excretado de quironomídeos) de *Cyclotella* sp. nos dias 2 e 4. Asterisco em vermelho indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. N=30.

5. Discussão

O estágio larval dos quironomídeos é predominantemente bentônico e é a fase da vida na qual mais se alimentam, obtendo a energia necessária para seu desenvolvimento, uma vez que os estágios de pupa e adulto duram menos tempo e, na fase adulta, eles não se alimentam (FONSECA & ROCHA, 2004). As microalgas são parte importante da dieta desses invertebrados, que escolhem a comida de acordo com o tamanho, valor nutricional e tipo de alimento, podendo preferir grupos diferentes de algas para incluir na alimentação (BERG, 1995; FROUZ *et al.*, 2004a). Mas além de serem valorosas na dieta de quironomídeos, essas produtoras são base da cadeia trófica de ambientes aquáticos, que interagem com os indivíduos e o meio, e são constantemente predadas por uma ampla gama de organismos (AMATO *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2016).

Em algumas microalgas, a intensificação da predação por outros organismos pode induzir, como estratégia de defesa, alterações de natureza morfológica, como mudanças no tamanho, forma, formação de colônias, etc.; bioquímica, na qual

recrutam vias metabólicas secundárias e produzem metabólitos com o potencial de toxicidade (VAN DONK *et al.*, 1999; YOSHIDA *et al.*, 2004; SELANDER *et al.*, 2015); ou fisiológica, como o feedback positivo no crescimento de algumas algas, causado pela intensificação da predação, feita inclusive por quironomídeos (FROUZ *et al.*, 2004a; HERREN *et al.*, 2017).

Desmodesmus spinosus

Os resultados obtidos de *D. spinosus* indicam que na presença direta do predador, a principal mudança foi morfológica: o aumento do tamanho dos espinhos, pois houve aumento das dimensões lineares máximas, mesmo com uma redução no comprimento dos cenóbios logo no segundo dia (Figura 20a e 20b). O aumento expressivo dos espinhos se manteve no dia 4, enquanto as outras dimensões não apresentaram mais alterações (Figura 20b). Houve ainda, a elevação na proporção de indivíduos unicelulares, no segundo e quarto dias, e a redução na proporção de cenóbios com 4 células no quarto dia (Figura 18).

Esse gênero de algas verdes possui uma flexibilidade fenotípica que varia de acordo com as condições do meio e com o potencial predador (LAMPERT *et al.*, 1994; VAN DONK *et al.*, 1999, LASS & SPAAK, 2002). O aumento dos espinhos na presença dos quironomídeos pode inviabilizar essas microalgas como alimento, uma vez que dificulta tanto a ingestão quanto a passagem da alga no tubo gastrointestinal do predador, que muitas vezes consegue ingerir o alimento, mas não é capaz digerir, o que pode afetar negativamente a sua taxa de crescimento (VAN DONK *et al.*, 1999; YOSHIDA *et al.*, 2004).

Outra mudança que ocorreu em *Desmodesmus* foi o crescimento da proporção de indivíduos menores unicelulares e a diminuição na proporção de cenóbios maiores. Estudos indicam que os indivíduos menores e com espinhos maiores (menor relação superfície-volume) são suspensos no meio mais facilmente (CONWAY & TRAINOR, 1972). Os quironomídeos hiperventilam serpenteando dentro dos tubos construídos, assim geram um fluxo e causam uma constante perturbação no meio (BRACKENBURY, 2000). Esse movimento respiratório do quironomídeo pode dificultar a captura das algas que são mais facilmente ressuspendidas na coluna d'água.

Foi possível observar na contagem de células, por exemplo na Figura 8, um maior desvio padrão no tratamento, indicando maior variação entre as réplicas. Essa

maior variação fez com que os resultados não fossem significativamente diferentes entre tratamento e controle, embora as médias tenham sido maiores no tratamento. Parte dessa variação ocorreu, particularmente, porque o desenho experimental da *D. spinosus* propõe contato direto das larvas com as microalgas e com areia para a construção dos tubos. As larvas montam tubos com uma secreção similar a fios de seda, que sai pelas glândulas salivares (FONSECA & ROCHA, 2004), e acaba agrupando as algas no tubo.

Dessa forma, foi importante definir outro desenho experimental, solucionando as dificuldades do desenho anterior: agregação ativa pelos predadores, além da interferência da areia, dificultando as contagens.

Micrasterias cf. *pinnatifida*

Os resultados obtidos com *Micrasterias* não indicaram mudanças em sua morfologia (Figura 21) induzidas pela presença indireta do predador. No entanto, houve um aumento significativo (no segundo dia) da produção de clorofila *a* nas células sob efeito do excretado das larvas (Figuras 10 e 11). Nos dias 2 e 4, a biomassa do tratamento, medida pela absorbância, foi expressivamente maior (Figura 12) e, no quarto dia, a quantidade de células também foi mais elevada, quando comparada ao controle (Figura 9).

Alguns consumidores primários, especialmente quironomídeos, podem elevar a produtividade algal (medido por aumento da clorofila *a*) como feedback positivo (HERREN *et al.*, 2017). Mas mudanças no meio, ou alterações fisiológicas também podem alterar a concentração de clorofila *a* por célula (CHIA *et al.*, 2013; LÜRLING & VERSCHOOR, 2003). Diferenças nas respostas obtidas por concentração de clorofila *a* ou contagem celular em cianobactérias e microalgas sob predação já foram documentadas (AKBAR *et al.*, 2017).

Em relação às alterações morfológicas, é documentado que algumas desmídias podem formar aglomerados por produção de mucilagem, além de serem mais resistentes à predação em ambientes naturais (WILTSHIRE *et al.*, 2003). Entretanto, isso pode não acontecer em condições laboratoriais, principalmente se não houve o contato direto do predador (WILTSHIRE *et al.*, 2003). Em alguns casos, não é possível induzir defesa apenas com substâncias excretadas pelo predador, tendo a necessidade do estímulo mecânico para a formação dos agregados (WILTSHIRE *et al.*, 2003). Em outros casos não é preciso que ocorram alterações nos

indivíduos, uma vez que a predação de uma microalga está fortemente relacionada com o seu tamanho e o tamanho do predador (WILTSHIRE *et al.*,2003; BERGKVIST *et al.*,2012). Algas maiores, como *Micrasterias*, tendem a ser menos susceptíveis à predação (MEINDL,1993; WILTSHIRE *et al.*,2003).

Cyclotella sp.

Essa diatomácea apresentou alterações morfológicas e fisiológicas, sendo a primeira um crescimento das dimensões lineares máximas das células nos dias 2 e 4, dos cultivos submetidos ao efeito indireto das larvas (Figura 22). Esse resultado condiz com o considerável aumento na produção de indivíduos filamentosos no quarto dia - as células se dividiram, mas permaneciam conectadas pela valva – (Figura 19). Foi observado o aumento da biomassa medida por meio da absorbância do primeiro ao terceiro dia no tratamento, em conjunto com a elevação na produção de clorofila *a* (absorbância em 680-750 nm) das amostras, a partir do segundo dia em contato com os dípteros (Figuras 14 e 16).

Várias espécies de microalgas podem ter respostas distintas à predação. Algumas algas podem ajustar o tamanho dos filamentos/colônias, aumentando ou reduzindo o número de células, por exemplo (AMATO *et al.*,2018). *Skeletonema marinoi*, uma diatomácea, reduz o tamanho das células e a quantidade de células por filamento, para diminuir a perda de indivíduos por predação (BERGKVIST *et al.*,2012). Em contrapartida, outras microalgas formam colônias/filamentos, pois células suspensas na coluna d'água acabam se tornando mais susceptíveis à predação por copépodes, por exemplo, quando comparadas a colônias e filamentos maiores (BERGKVIST *et al.*,2012).

Em *Cyclotella* sp., ainda que não tenham sido formadas colônias/filamentos, as medidas lineares e o número de indivíduos maiores cresceu quando em contato indireto com as larvas. Essa expansão das dimensões pode interferir tanto na ingestão e digestão pelos quironomídeos, quanto na deposição dessas células no substrato (BERG,1995; BERGKVIST *et al.*,2012). O aumento da replicação, da biomassa e da clorofila na cultura em contato com o filtrado excretado, sugere a ocorrência de elevação na produtividade por feedback positivo do predador sobre as microalgas, estimulando o crescimento populacional desses microrganismos (FROUZ *et al.*, 2004a; HERREN *et al.*, 2017).

6. Conclusão

Por dificuldades metodológicas, apenas *D. spinosus* foi analisado sob efeito de predação direta, sendo que *Micrasterias* e *Cyclotella* sp. foram analisadas sob efeito indireto do predador (excretado).

A predação/presença do excretado de quironomídeos acarretou mudanças morfológicas nas microalgas *Desmodesmus spinosus* e *Cyclotella* sp., com ambas aumentando suas dimensões lineares máximas, possivelmente como forma de evitar a predação. Nas três cepas, a presença das larvas bentônicas induziu plasticidade fisiológica: *Desmodesmus* aumentou a produção de indivíduos unicelulares, *M. cf. pinnatifida* aumentou sua biomassa e a produtividade, e em *Cyclotella* o excretado de quironomídeos ocasionou o aumento expressivo da clorofila *a* e da produção de filamentos.

7. Referências bibliográficas

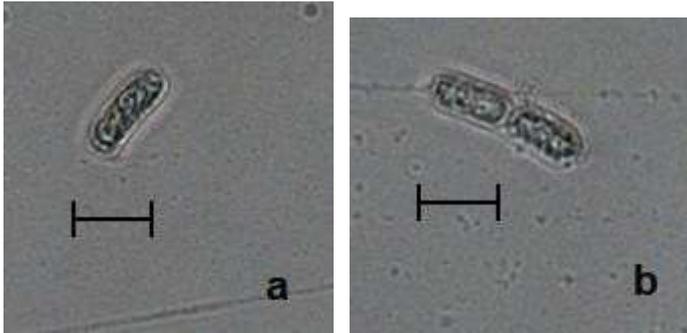
- AKBAR, S. et al. Understanding interactive inducible defenses of *Daphnia* and its phytoplankton prey. **Harmful Algae**, v. 66, p. 47–56, 2017.
- AMATO, A. et al. Grazer-induced transcriptomic and metabolomic response of the chain-forming diatom *Skeletonema marinoi*. **The ISME Journal**, v. 12, p. 1594-1604, 2018.
- BAGATINI, I. L. et al. Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- BERG, M. B. Larval food and feeding behaviour. **The Chironomidae**, p. 136–168, 1995.
- BERGKVIST, J. et al. Grazer-induced chain length plasticity reduces grazing risk in a marine diatom, **Limnology and Oceanography**, v. 57, p. 318-324, 2012.
- BRACKENBURY, J. Locomotory modes in the larva and pupa of *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae). **Journal of Insect Physiology**, 46(12), p. 1517–1527, 2000.
- CHIA, M. A. et al. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1427-1438, 2013.
- COESEL, P. F. M. Structural characteristics and adaptations of desmid communities. **The Journal of Ecology**, p. 163-177, 1982.
- COESEL, P. F. M.; KRIENITZ, L. Diversity and geographic distribution of desmids and other coccoid green algae. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 2, p. 381–392, 2008.
- CONWAY, K.; TRAINOR, F. R. Scenedesmus morphology and flotation. **Journal of Phycology**, 8(2), p. 138–143, 1972.

- COVICH, A. P.; PALMER, M. A.; CROWL, T. A. The Role of Benthic Invertebrate Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. **BioScience**, v. 49, February, p. 119–127, 1999.
- EBERHARD, H.; ANKE, B. A taxonomic revision of *Desmodesmus* serie *Desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). **Journal of the Czech Phycological Society**, v. 17, n.2, p. 191-208, 2017.
- FONSECA, A; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004.
- FROUZ, J.; ALI, A.; LOBINSKE, R. J. Laboratory Evaluation of Six Algal Species for Larval Nutritional Suitability of the Pestiferous Midge *Glyptotendipes paripes* (Diptera: Chironomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 6, p. 1884–1890, 2004a.
- FROUZ, J.; ALI, A.; LOBINSKE, R. Algal food selection and digestion by larvae of the pestiferous chironomid *Chironomus Crassicaudatus* under laboratory conditions. **Journal of the American Mosquito**, v. 20, n. January 2015, p. 458–461, 2004b.
- GUILLARD, R.R.L; LORENZEN C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1972.
- GRIFFITHS M.J., GARCIN C., VAN HILLE R.P., HARRISON S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119–123, 2011.
- HA, K.; JANG, M.; TAKAMURA, N. Colony formation in planktonic algae induced by zooplankton culture media filtrate. **Journal of freshwater ecology**, v. 19, n. 1, p. 9-16, 2004.
- HEGWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Algological studies**, v. 96, p. 1-18, 2000.
- HENRIQUES-OLIVEIRA, A. L.; NESSIMIAN, J. L.; DORVILLÉ, L. F. M. Feeding habits of Chironomid larvae (Insecta: Diptera) from a stream in the Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 2, p. 269–281, 2003.
- HERREN, C. M. et al. Positive feedback between chironomids and algae creates net mutualism between benthic primary consumers and producers. **Ecology**, v. 98, n. 2, p. 447–455, 2017.
- HESSEN, D. O.; VAN DONK, E. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 127, n. 2, p. 129-140, 1993.
- JOHANNSSON, O. E.; BEAVER, J. L. Role of algae in the diet of *Chironomus plumosus* F. semireductus from the Bay of Quinte, Lake Ontario. **Hydrobiologia**, v. 107, n. 3, p. 237–247, 1983.
- LAFORSCH, C; BECCARA, L; TOLLRIAN, R. Inducible defenses: The relevance of chemical alarm cues in *Daphnia*. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 3, p. 1466-1472, 2006.
- LAMPERT, W; ROTHHAUPT, K. O.; VON ELERT, E. Chemical induction of colony formation in a green alga (*Scenedesmus acutus*) by grazers (*Daphnia*). **Limnology and oceanography**, v. 39, n. 7, p. 1543-1550, 1994.
- LASS, S.; SPAAK, P. Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review.

- Hydrobiologia**, v. 491, p. 221–239, 2003.
- LUCINDA, I. Estudo de comunidades planctônicas (bacterioplâncton, nanoflagelados, fitoplâncton e zooplâncton) em um pequeno reservatório tropical – experimentos com mesocosmos. Tese (Doutorado no Programa de Pós- graduação em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 271, 2007.
- LÜRLING, M.; VERSCHOOR, A. M. F0-spectra of chlorophyll fluorescence for the determination of zooplankton grazing. **Hydrobiologia**, v. 491, n. 1-3, p. 145-157, 2003.
- MAYELI, S; NANDINI, S.; SARMA S. The efficacy of *Scenedesmus* morphology as a defense mechanism against grazing by selected species of rotifers and cladocerans. **Aquatic Ecology**, v. 38, p. 515-524, 2004.
- MEINDL, U. *Micrasterias* Cells as a Model System for Research on Morphogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p415-433, 1993.
- ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.p. 927, 1971.
- REVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. v. 2. Porto Alegre: Arthmed, 2006.
- RICHARDI, V. S. et al. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia (Curitiba)**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.
- RStudio Team. **RStudio: Integrated Development for R**.RStudio, Inc., Boston, 2019. Disponível em <<http://www.rstudio.com/>> Acesso em 26 de outubro de 2020.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. Disponível em <<https://www.R-project.org/>> Acesso em 15 de Outubro de 2021.
- SELANDER, E. et al. Predator lipids induce paralytic shellfish toxins in bloom-formingalgae. **PNAS**, v.112, n. 20, p. 6395-6400, 2015.
- STERNER, R. W.; HESSEN, D. O. Algal Nutrient Limitation and the nutrition of aquatic herbivores. **Review of Ecology and Systematics.**, v. 25, p.1–29, 1994.
- SUN, J. U. N.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal Of Plankton Research** v. 25, n.11, p. 1331-1346, 2003.
- TARKOWSKA-KUKURYK, M. Periphytic algae as food source for grazing chironomidsin a shallow phytoplankton-dominated lake. **Limnologica**, v. 43, n. 4, p. 254–264, 2013.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. **Larvas de Chironomidae: guia de identificação**. São Carlos: UFSCar, v. 1, n. 2, 2011.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. New York: Cambridge University Press, 1995.
- VAN DONK, E.; IANORA, A.; VOS, M. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: A review. **Hydrobiologia**, v. 668, n. 1, p. 3–19, 2011.
- VAN DONK, E.; LÜRLING, M.; LAMPERT, W. Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits and impact on grazers. **Consequences of inducible defences for population biology**, November, 1999.

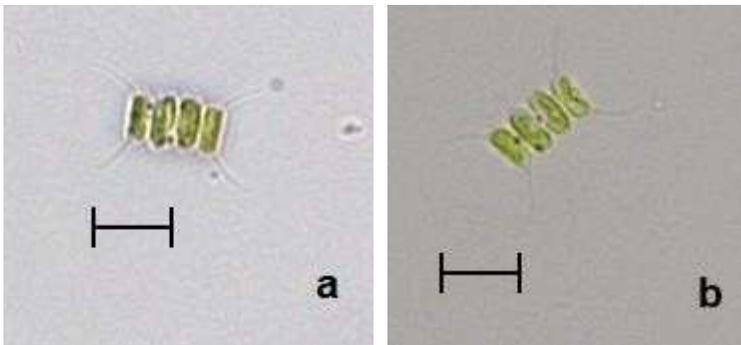
- WANG, W. Studies on the morphotype alternation in *Monoraphidium* sp. (Selenastraceae, Chlorophyta). **Cryptogamie Algologie**, n. August, 2005.
- WILTSHIRE, K.; BOERSMA, M.; MEYER, B. Grazer-induced changes in the desmid *Staurastrum*. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 255-260, 2003.
- YOSHIDA, T.; HAIRSTON, N. G.; ELLNER, S. P. Evolutionary trade-off between defence against grazing and competitive ability in a simple unicellular alga, *Chlorella vulgaris*. **The Royal Society**, v. 271, p. 1947-1953, 2004
- ZHU, X. et al. Costs and trade-offs of grazer-induced defenses in *Scenedesmus* under deficient resource. **Scientific Reports**, v. 6, p.1-10, 2016.

8. Material Suplementar



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Figura S1. *Cyclotella* sp. Individuos do Controle (a) e Tratamento (excretado das larvas) (b) no quarto dia do experimento. Barras de escala = 10 μ m.



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Figura S2. *Desmodemus spinosus*. Cenóbios do Controle (a) e Tratamento (presença das larvas) (b) no quarto dia do experimento. Barras de escala = 10 μ m.

Tabela S1. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados a todas as variáveis de *D. Spinosus*. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

CCMA-UFSCar 62	Dia 2						Dia 4					
	Shapiro-Wilk		Teste F	Levene	Teste T	Teste U	Shapiro-Wilk		Teste F	Levene	Teste T	Teste U
	Controle	Tratamento					Controle	Tratamento				
Largura celular	0,02	2,76E-05	-	0,54	-	0,38	0,001	0,01	-	0,43	-	0,10
Comp. Celular	0,70	0,32	0,005	-	0,11	-	0,93	0,20	0,41	-	0,61	-
Largura máxima	0,0002	0,75	-	0,18	-	2,16E-07	0,63	0,28	0,13	-	1,244E-10	-
Comp. Máximo	1,27E-06	1,53E-05	-	2,20E-16	-	0,12	0,01	0,001	-	2,20E-16	-	0,001
Comp. indivíduo	2,06E-05	3,97E-07	-	0,75	-	0,01	7,87E-06	1,69E-07	-	0,99	-	0,84
Contagem celular	0,05	0,09	0,69	-	0,95	-	0,96	0,31	0,01	-	0,17	-
Contagem de indiv.	0,62	0,66	0,33	-	0,91	-	0,78	0,40	0,17	-	0,18	-
Indiv. Unicelulares	0,06	0,99	0,91	-	0,01	-	0,27	0,07	0,09	-	0,02	-
Indiv. c/ 2 células	0,71	0,34	0,58	-	0,97	-	0,79	0,37	0,53	-	0,10	-
Indiv. c/ 4 células	0,93	0,52	0,89	-	0,28	-	0,72	0,99	0,57	-	0,01	-

Tabela S2. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados a todas as medidas e contagens de *Micrasterias pinnatifida*. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

CCMA-UFSCar 89	Dia 2						Dia 4					
	Shapiro-Wilk		Teste F	Levene	Teste T	Teste U	Shapiro-Wilk		Teste F	Levene	Teste T	Teste U
	Controle	Tratamento					Controle	Tratamento				
Largura Máxima	0,003	0,02	-	2,20E-16	-	0,51	0,65	0,50	0,01	-	0,94	-
Comprimento Máximo	0,06	0,14	0,24	-	0,99	-	0,001	0,0001	-	< 2,2E-16	-	0,63
Contagem Celular	0,78	0,17	0,35	-	0,60	-	0,49	< 2,2E-16	-	0,39	-	< 0,05

Tabela S3. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados para a absorbância em 680-750nm de *Micrasterias*. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Abs680-750nm - CCMA-UFSCar 89						
<i>Shapiro-Wilk</i>						
Dia	Controle	Tratamento	Teste F	Levene	Teste T	Teste U
0	0,64	-	-	0,16	-	0,49
1	1	< 2,2E-16	-	0,77	-	0,49
2	0,46	0,78	0,81	-	0,03	-
3	1	1	1	-	0,07	-
4	1	< 2,2E-16	-	1	-	0,07

Tabela S4. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados para a absorbância a 750nm em *M. pinnatifida*. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Abs750nm - CCMA-UFSCar 89						
<i>Shapiro-Wilk</i>						
Dia	Controle	Tratamento	Teste F	Levene	Teste T	Teste U
0	1	0,47	0,38	-	0,37	-
1	< 2,2E-16	0,78	-	0,23	-	0,65
2	< 2,2E-16	0,64	-	0,37	-	< 0,05
3	< 2,2E-16	< 2,2E-16	-	0,56	-	0,07
4	-	< 2,2E-16	-	0,37	-	0,03

Tabela S5. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância e Teste T), aplicados para a concentração de clorofila por célula de *Micrasterias*. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Clorofila por célula - CCMA-UFSCar 89				
<i>Shapiro-Wilk</i>				
Dia	Controle	Tratamento	Teste F	Teste T
2	0,89	0,46	0,31	0,03
4	0,1	0,36	0,01	0,38

Tabela S6. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados a todas as medidas e contagens de *Cyclotella* sp. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

CCMA-UFSCar BB041	Dia 2						Dia 4					
	<i>Shapiro-Wilk</i>						<i>Shapiro-Wilk</i>					
	Controle	Tratamento	Teste F	Levene	Teste T	Teste U	Controle	Tratamento	Teste F	Levene	Teste T	Teste U
Largura Máxima	0,001	0,51	-	0,01	-	0,001	0,29	0,24	0,78	-	0,001	-
Comprimento Máximo	4,53E-13	1,41E-11	-	< 2,2E-16	-	0,17	1,19E-10	2,33E-09	-	< 2,2E-16	-	0,003
Contagem Celular	0,02	0,73	-	0,37	-	0,2	0,84	< 2,2E-16	-	0,21	-	0,12
Indivíduos + de 1 cél	0,90	0,84	0,27	-	0,13	-	< 2,2E-16	0,28	-	0,38	-	0,05

Tabela S7. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste de Levene e Teste U de Mann-Whitney), aplicados para a absorbância em 680-750nm de *Cyclotella* sp. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Abs680-750nm - CCMA-UFSCar BB041				
<i>Shapiro-Wilk</i>				
Dia	Controle	Tratamento	Levene	Teste U
0	-	-	-	-
1	-	< 2,2E-16	0,37	0,32
2	-	< 2,2E-16	0,37	0,03
3	< 2,2E-16	< 2,2E-16	1	0,04
4	< 2,2E-16	1	0,52	< 0,05

Tabela S8. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste de Levene e Teste U de Mann-Whitney), aplicados para a absorbância a 750nm em *Cyclotella* sp. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Abs750nm - CCMA-UFSCar BB041				
<i>Shapiro-Wilk</i>				
Dia	Controle	Tratamento	Levene	Teste U
0	< 2,2E-16	< 2,2E-16	0,68	0,24
1	1	< 2,2E-16	0,52	< 0,05
2	< 2,2E-16	1	0,52	< 0,05
3	< 2,2E-16	-	0,37	0,03
4	0,36	-	0,24	0,12

Tabela S9. Valores de p dos testes estatísticos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste F de variância, Teste de Levene, Teste T e Teste U de Mann-Whitney), aplicados para a concentração de clorofila por célula de *Cyclotella* sp. Os valores em vermelho indicam $p < 0,05$.

Clorofila por célula - CCMA-UFSCar BB041						
<i>Shapiro-Wilk</i>						
Dia	Controle	Tratamento	Teste F	Levene	Teste T	Teste U
2	< 2,2E-16	0,95	-	0,47	-	0,82
4	0,46	0,41	0,12	-	0,7	-