

Substrato difusor de nutrientes (SDN): avaliação do método em laboratório para experimentos *in situ* com perifíton

Fabiana Schumacher Fermino¹, Denise de Campos Bicudo^{1*} e Cacilda Thais Janson Mercante²

¹Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Ecologia, Caixa Postal 4005, 01061-970, São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Instituto de Pesca, Av. Francisco Matarazzo, 445, 05001-300, São Paulo, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: dbicudo@terra.com.br

RESUMO. O estudo avaliou a metodologia do substrato difusor de nutrientes em condições controladas de laboratório (20°C), visando posterior aplicação em ensaios de enriquecimento *in situ*. A unidade experimental constou de recipiente (copo de poliestireno) preenchido com solução agar 2% e com adição isolada ou combinada de nitrogênio (0,75 M NaNO₃) e fósforo (0,05 M KH₂PO₄). A abertura do recipiente foi revestida com malha de plâncton (20 µm) como substrato para o perifíton. As concentrações diárias de difusão dos sais foram determinadas durante 33 dias. Os coeficientes gerados mediante regressão linear foram iguais nos diferentes tratamentos (0,05dia⁻¹). Conclui-se que as difusões dos sais não foram influenciadas pela adição combinada ou isolada de nutrientes permitindo a comparação entre os tratamentos. A partir do 4º dia, as razões N:P de difusão foram mantidas próximas da pré-estabelecida. A metodologia proposta tem uso potencial na avaliação da limitação por nutrientes em sistemas aquáticos tropicais.

Palavras-chave: enriquecimento, difusão, nitrogênio, fósforo, metodologia, perifíton.

ABSTRACT. Nutrient-diffusing substrate (NDS): methodological evaluation in laboratory for *in situ* experiments with periphyton. This study evaluated the nutrient-diffusing substrate method in laboratory under controlled temperature (20°C), for further application in *in situ* bioassay enrichment experiments. The experimental unit comprised a 300mL polystyrene pot filled up with 2% agar solution with isolated or combined addition of nitrogen (0.75 M NaNO₃) and phosphorus (0.05 M KH₂PO₄). The topside opening of the pot was covered with plankton net cloth used for periphyton growth. Nutrients daily release rates were determined during 33 days. Diffusion coefficients obtained by regression analysis were similar in all treatments (0.05day⁻¹). Results indicated that nutrient diffusion was not influenced by isolated or combined addition, thus allowing comparison between the treatments. In addition, after 4 days N:P diffusing ratio was kept close to the previously established condition. The proposed method has a potential use for nutrient limitation assessments in tropical aquatic ecosystems.

Key words: enrichment, diffusion, nitrogen, phosphorus, methodology, periphyton.

Introdução

Os problemas ambientais relacionados aos recursos hídricos adquiriram especial importância a partir do final do século XX. Desta forma, torna-se crescente a necessidade do conhecimento das propriedades funcionais das águas doces, visando avaliar a influência antrópica sobre as mesmas para maximizar a gestão desses recursos naturais (Wetzel, 2001). Um dos problemas mais bem documentados em nível mundial sobre o impacto do homem nos ecossistemas aquáticos consiste na eutrofização artificial. Neste sentido, trabalhos experimentais de

enriquecimento de nutrientes vêm contribuindo para avaliar o fator limitante ao crescimento das algas e, portanto, subsidiar as medidas de prevenção da proliferação desses organismos nos sistemas aquáticos.

Experimentos em mesocosmos têm sido amplamente empregados desde a sua introdução, há mais de 30 anos, para diferentes finalidades, tais como predição dos efeitos da eutrofização sobre a produtividade e qualidade da água (Manny *et al.*, 1994), avaliação do papel do perifíton na remoção do

fósforo (Havens *et al.*, 2001; McCormick *et al.*, 2001), entre outros.

Considerando a capacidade do perifíton em fornecer respostas rápidas às alterações ambientais, de não migrar em condições adversas por estar associado a substratos submersos, entre outros aspectos, essa comunidade vem sendo utilizada como importante ferramenta em estudos de monitoramento e de qualidade de água (e.g. Lowe e Pan, 1996; McCormick e Stevenson, 1998; Rodrigues *et al.*, 2003).

O hábito do perifíton (associado a superfícies submersas) permitiu a introdução dos substratos difusores de nutrientes (SDN), os quais consistem de recipientes preenchidos com solução nutritiva, a qual é continuamente liberada para o meio. Os SDN apresentam a grande vantagem de não confinar a comunidade como nos mesocosmos, simulando condições mais próximas das do meio. Tal método também permite a liberação contínua de nutrientes, não necessitando de monitoramento diário para manutenção de condições nutricionais pré-estabelecidas. Os SDN têm sido amplamente empregados com sucesso em várias partes do globo (e.g. Fairchild *et al.*, 1985; Carrick *et al.*, 1988; Francoeur *et al.*, 1999). O único trabalho existente no Brasil foi realizado por Mendes e Barbosa (2002) para um sistema lótico situado na Serra do Cipó (MG), a partir do qual os autores avaliaram os efeitos da adição isolada e combinada de nitrato, nitrogênio amoniacal e ortofosfato sobre a acumulação de clorofila-a do perifíton.

Informação metodológica sobre taxas de difusão e de liberação de nutrientes a partir de SDN foi testada em condições controladas de laboratório à temperatura de 10°C por Pringle e Bowers (1984), ou em temperatura não-controlada, entre 17,8 e 25,3°C por Fairchild *et al.* (1985). Inexistem ensaios conduzidos em condições controladas com temperaturas mais próximas de ambientes tropicais e subtropicais e que avaliem simultaneamente o efeito da liberação isolada e combinada de nitrogênio e fósforo.

O presente artigo teve como objetivos testar: (a) a adequação da unidade experimental (SDN) proposta; (b) a cinética de difusão de nutrientes a partir da adição isolada e combinada de nitrogênio e fósforo em condições controladas de laboratório; (c) a manutenção de taxas de difusão em razões N:P pré-estabelecidas pelo período mínimo de 30 dias. Pretende-se, assim, contribuir com a ampliação dos estudos experimentais no país e, mais especificamente, com o uso de mais uma ferramenta

para a avaliação da limitação por nutrientes em sistemas aquáticos tropicais e subtropicais.

Material e métodos

Descrição e preparação da unidade experimental (SDN)

Para a confecção dos SDN, foram utilizados copos plásticos atóxicos e inertes, de poliestireno, com volume de 330cm³, altura de 110mm e 80mm de diâmetro de abertura (Figura 1). Esses recipientes são produtos nacionais, de fácil aquisição, baixo custo e apresentam resistência térmica de até 120°C.

Com base na revisão de literatura, os SDN foram preenchidos com solução agar a 2% (Fairchild e Lowe, 1984; Fairchild *et al.*, 1985; Carrick *et al.*, 1988, entre outros). Os sais utilizados para enriquecimento foram nitrato de sódio (NaNO₃ pa.), fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄ pa.), além de agar-agar, marca Merck (≥ 99,8% de pureza). Para preparação da solução, utilizou-se água ultrapura (Easypure RF, Barnstead).

O correspondente em gramas a 0,75 M de NaNO₃ e 0,05 M de KH₂PO₄ foram 21,03g de NaNO₃ (= 3,46g do elemento nitrogênio); e 2,24g de KH₂PO₄ (= 0,5106g do elemento fósforo) para cada SDN. Deste modo, a adição conjunta, a partir dessas massas, resultou na razão atômica N:P = 15.

Para se evitar a contaminação aérea por fungos, toda vidraria e a solução agar contendo os nutrientes foram autoclavadas. Logo em seguida, essa solução esterilizada foi adicionada aos recipientes dos SDN, os quais foram imediatamente revestidos com filme PVC. Estes permaneceram à temperatura ambiente sobre bancada previamente limpa com hipoclorito de sódio (água sanitária) para sua gelificação. Decorridas duas horas, cada SDN foi imerso isoladamente em béquer de 1L, contendo 500mL de água deionizada, e levado à câmara de germinação. Nesse momento, removeu-se o filme de PVC da abertura do SDN para dar início à difusão de sais, o qual foi substituído por uma malha de monofilamento (malha de rede de plâncton, 20 µm de diâmetro de poro), presa com elásticos e fita micropore resistente à água (Figura 1). Essa malha é inerte do ponto de vista químico, permite difusão dos nutrientes, bem como adesão de organismos diminutos pela baixa porosidade da rede, podendo ser usada como substrato para o desenvolvimento do perifíton quando levada a campo.

Procedimento para determinação da difusão dos sais

O delineamento experimental constou de três tratamentos, cada um com três repetições (n = 3), a

saber: (a) adição isolada de fósforo (P^+), ou seja, condição N-limitante (razão atômica N:P < 10); (b) adição isolada de nitrogênio (N^+), condição P-limitante (razão atômica N:P > 20) e (c) adição combinada desses nutrientes (NP^+), condição de disponibilidade de ambos nutrientes (razão atômica N:P = 15). As razões de limitação de nutrientes foram definidas segundo Biggs (1990, 1995) e Borchardt (1996).

Os nove SDN foram mergulhados separadamente em béquer com capacidade de 1L preenchido com 500 ml de água deionizada. Os mesmos permaneceram incubados em câmara de germinação (tipo B.O.D., modelo MA 403, marca Marconi) e mantidos no escuro, em condições controladas de temperatura a 20°C, que corresponde à média anual da temperatura dos reservatórios do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, onde está sendo desenvolvida uma série de experimentos com perifíton. A cada dia (24 horas) uma alíquota da solução aquosa foi retirada de cada béquer para determinação das concentrações dos elementos nitrogênio e fósforo ($N-NO_3^-$ e $P-PO_4^{3-}$), sendo, em seguida, totalmente descartada e substituída por 500mL de água deionizada. Tal procedimento foi repetido ao longo de 33 dias consecutivos.

As análises das concentrações de nitrato e fósforo solúvel reativo seguiram, respectivamente, Mackereth *et al.* (1978) e Strickland e Parsons (1960). Para monitorar possíveis contaminações, foram feitas medidas esporádicas e aleatórias de nitrogênio amoniacal (Solorzano, 1969) na água contida nos béqueres, bem como de ortofosfato e nitrato na água deionizada.

A montagem do experimento foi feita no dia zero, estabelecendo as concentrações nominais de 0,75 M de nitrato e 0,05 M de fósforo solúvel reativo. Após 24 horas (primeiro dia), iniciaram-se as medidas das concentrações de nitrogênio e fósforo, sendo finalizadas no dia 33. As concentrações de difusão de sais foram calculadas em $\mu g.L^{-1}$ e transformadas para $\mu mol.L^{-1}$.

A partir de ajustes cinéticos em função das concentrações obtidas a cada dia, foi determinado o coeficiente de difusão (k_D) em cada tratamento. Admitiu-se que o processo de difusão seguiu cinética de primeira ordem, conforme Mercante e Bianchini-Jr. (2000). A equação 1 representa o modelo cinético de difusão.

$$\ln(\text{difusão}) = a - k_D \cdot t \quad (\text{Equação 1})$$

em que: k_D = coeficiente de difusão em dia^{-1} e t = tempo em dias.

Procedimento para instalação do experimento *in situ*

Para instalação do experimento em campo, foram confeccionados tabladados em madeira naval (60cm x 60cm x 60mm), com 25 orifícios para encaixe dos SDN (Figura 1). Estes apresentaram diâmetro semelhante à base dos copos e profundidade de 40 mm, de forma a assegurar a permanência dos SDN quando submersos no sistema aquático. Para os tratamentos e controle, foram utilizados tabladados idênticos. O tamanho, número de orifícios e o número de tabladados devem variar em função do delineamento experimental e amostral de cada trabalho específico. Os orifícios foram numerados com pirógrafo, a fim de facilitar a coleta randômica, por sorteio, dos SDN. O uso de tinta foi evitado para descartar qualquer possibilidade de contaminação das unidades experimentais. Os tabladados foram fixados na represa com o auxílio de cavaletes em madeira naval, de forma a manter a superfície dos SDN à profundidade de aproximadamente 20cm do nível da água.

A malha sobre os recipientes (SDN) para desenvolvimento do perifíton mostrou-se facilmente removível em campo com auxílio de tesoura e pinça. Em laboratório, depois do material ser removido com escova e jatos de água destilada e levado a volume constante, alíquotas da unidade amostral podem ser destinadas a diferentes procedimentos analíticos. Para os cálculos necessários, deve-se mensurar a área da malha correspondente.

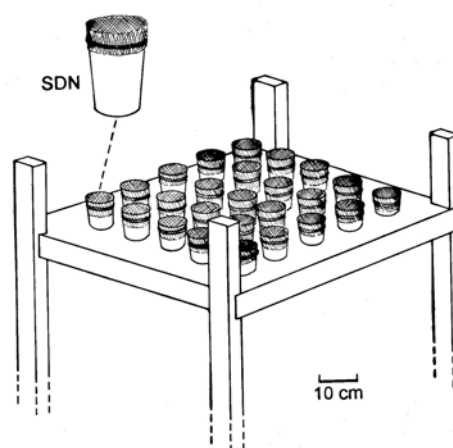


Figura 1. Aspecto geral de um tratamento com os substratos difusores de nutrientes (SDN).

Resultados e discussão

A Figura 2 apresenta os valores diários calculados de razão atômica N:P no tratamento com adição combinada de nitrogênio e fósforo até o 33º dia. Nos três primeiros dias, particularmente no 1º, as razões ficaram acima (339, 36 e 26) do valor pré-estabelecido de 15. As razões foram inicialmente elevadas basicamente por conta da elevada difusão de nitrato nos três primeiros dias (Tabela 1), bem como pela baixa difusão do fósforo no primeiro dia (Tabela 2). A partir do 4º, as razões tenderam a se estabilizar, oscilando entre 14 e 21 até o final do experimento. Assim sendo, os valores de difusão foram determinados a partir do 4º dia de experimento.

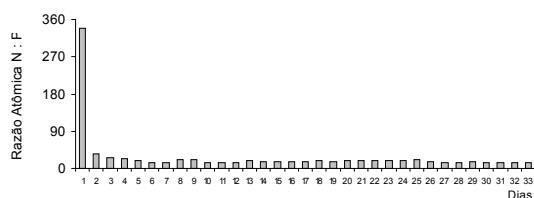


Figura 2. Evolução diária da razão atômica N:P durante 33 dias no tratamento NP⁺.

Os valores médios diários difundidos de nutrientes, determinados em laboratório e esperados com base na constante k_D de difusão, encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

A partir dos ajustes efetuados, verificou-se que os coeficientes de difusão foram iguais nos diferentes tratamentos, sendo $k_D = 0,05 \text{ dia}^{-1}$ (Figuras 3 e 4). Fairchild *et al.* (1985) obtiveram coeficientes de difusão k calculados para o nitrato (concentrações de 0,5 M e 0,05 M) de $0,07 \text{ dia}^{-1}$ e $0,08 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. E para o ortofosfato, nas mesmas concentrações, valores de k calculados de $0,05 \text{ dia}^{-1}$ e $0,04 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, atribuindo a menor taxa de difusão do ortofosfato à possível complexação deste ao agar. Muito provavelmente, esse processo também ocorreu no presente e de forma acentuada no primeiro dia de experimento (Tabela 2). Interações químicas (adsorção e agentes de complexação) também foram reportadas por Mercante e Bianchini-Jr. (2000) em experimento de enriquecimento para amônio (retenção de 28%) e nitrato (retenção de 42%).

Os valores de r^2 encontrados (Figuras 3 e 4) para o nitrato (0,75 M) foram de 0,79 (N⁺) e 0,77 (NP⁺) e para o ortofosfato (0,05M) de 0,91 (P⁺) e 0,90 (NP⁺ = 0,90), demonstrando forte associação entre a difusão e o tempo, com uma explicação entre a variação das concentrações de sais por dia de 77% a 91%, respectivamente. De modo geral, Fairchild *et*

al. (1985) encontraram valores de correlação bem inferiores, principalmente para o ortofosfato ($r^2 = 0,59$ e $0,86$ para nitrato e $r^2 = 0,87$ e $0,62$ para ortofosfato, respectivamente a concentrações de 0,5 M e 0,05 M).

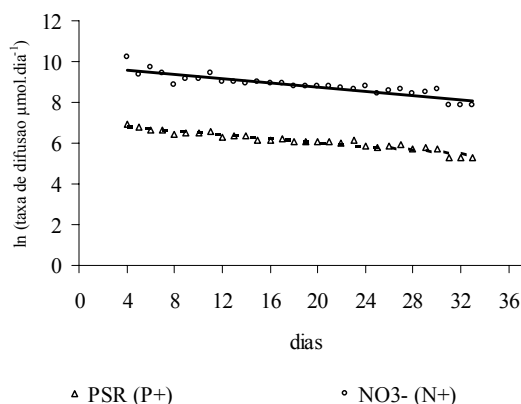


Figura 3. Taxa média de difusão ($n = 3$) do fósforo solúvel reativo - PSR (0,05 M) e nitrato (0,75 M) para os tratamentos com adição isolada de sais pelo período de 33 dias.

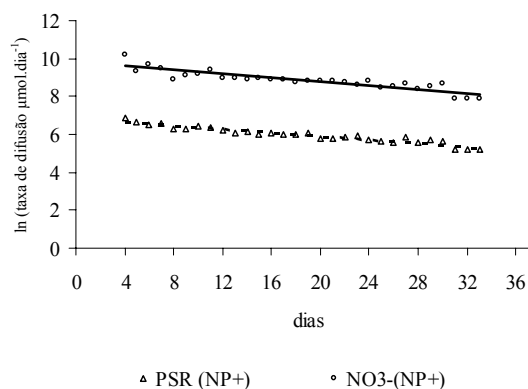


Figura 4. Taxa média de difusão ($n = 3$) do fósforo solúvel reativo - PSR (0,05 M) e nitrato (0,75 M) para os tratamentos com adição combinada de sais pelo período de 33 dias.

As difusões diárias médias do nitrogênio, determinadas em laboratório ao longo de 30 dias (4–33º dia), foram de $7.863,32$ e $7.317,94 \mu\text{mol-N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Considerando desde o 1º dia de difusão, o total de $344.594,51$ e $329.222,71 \mu\text{mol-N.L}^{-1}$ foi difundido em 33 dias nos tratamentos N⁺ e NP⁺, respectivamente (Tabela 1). Transformando em massa (500mL), obtêm-se os valores de $2,41\text{g}$ (N⁺) e $2,30\text{g}$ (NP⁺) de N difundidos em 33 dias. Como inicialmente foram adicionados $3,46\text{g}$ de N em cada SDN (0,75M), esse total correspondeu a 69,6% e 66,5%, respectivamente, para os tratamentos com adição isolada e combinada de nitrogênio. Desse balanço, estimou-se que 30,4% a 33,5% de

nitrogênio ficaram retidos no SDN (Figura 5). Com base na mesma taxa de difusão de nitrato, assume-se que o experimento poderia ser conduzido por mais 15 dias.

Com relação ao fósforo solúvel reativo, as difusões diárias médias (Tabela 2), determinadas em laboratório ao longo de 30 dias (4-33º dia) foram 470,766 e 412,954 $\mu\text{mol-P.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Desde o 1º dia de difusão, o total de 17.353,87 e 15.086,24 $\mu\text{mol-P.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ foi difundido em 33 dias nos tratamentos P^+ e NP^+ , respectivamente (Tabela 2). Transformando para massa (500ml), foram obtidos os valores de 0,271g (P^+) e 0,23g (NP^+) de P difundidos em 33 dias. Considerando que inicialmente foram adicionados 0,5106g de fósforo em cada SDN (0,05M), esse total correspondeu a 52,9% e 45,8%, respectivamente, para os tratamentos com adição isolada e combinada de fósforo. Desse balanço, estimou-se que 47,1% a 54,2% de fósforo ficaram retidos no SDN (Figura 5). Assumindo a mesma taxa de difusão do fósforo, o experimento poderia ser conduzido por pelo menos mais 29 dias.

Os valores difundidos, experimentais e simulados, com base na constante de difusão, foram

muito próximos nos três tratamentos (Tabelas 1 e 2, Figura 5), o que denota a elevada sensibilidade do modelo cinético de difusão, conferindo consistência à metodologia proposta.

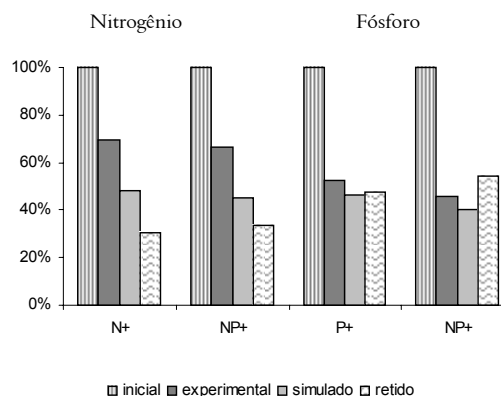


Figura 5. Porcentagens de nitrogênio (%N/SDN) e fósforo (%P/SDN) inicial, difundida, estimada e retida nos SDN (n = 3) para os tratamentos com adição isolada de nitrogênio (N^+), de fósforo (P^+) e combinada com ambos nutrientes (NP^+), após 33 dias de experimento.

Tabela 1. Valor médio (n = 3) diário difundido (experimental e simulado) de nitrato ($\mu\text{mol NO}_3.\text{L}^{-1}$) e total difundido em 30 (4-33º) e 33 dias (1-33º) de experimento, nos tratamentos com adição isolada (N^+) e combinada de nitrogênio (NP^+).

Dia do experimento	Tratamento N^+		Tratamento NP^+	
	Nitrato experimental	Nitrato simulado	Nitrato experimental	Nitrato simulado
1	37.475,93	14.529,65	40.166,10	13.248,77
2	43.109,97	13.801,69	46.890,03	12.625,32
3	28.108,97	13.110,21	22.628,21	12.031,22
4	27.500,00	12.453,37	22.628,21	11.465,07
5	11.447,33	11.829,44	14.165,07	10.925,56
6	16.215,03	11.236,77	9.738,74	10.411,43
7	12.674,79	10.673,79	10.863,45	9.921,50
8	7.271,32	10.139,02	11.519,36	9.454,63
9	9.205,88	9.631,04	8.640,84	9.009,72
10	9.681,34	9.148,51	8.655,87	8.585,75
11	12.226,99	8.690,16	8.496,43	8.181,73
12	8.073,10	8.254,77	7.612,31	7.796,73
13	8.045,67	7.841,19	7.904,90	7.429,84
14	7.378,21	7.448,34	7.709,81	7.080,21
15	8.005,37	7.075,16	6.994,80	6.747,04
16	7.379,32	6.720,69	7.538,42	6.429,55
17	7.370,19	6.383,97	7.194,14	6.126,99
18	6.473,96	6.064,13	6.839,07	5.838,67
19	6.644,18	5.760,31	6.124,25	5.563,93
20	6.717,03	5.471,71	5.926,57	5.302,10
21	6.643,80	5.197,57	5.881,75	5.052,60
22	6.266,62	4.937,16	7.084,48	4.814,84
23	5.476,58	4.689,80	5.597,36	4.588,27
24	6.760,32	4.454,84	5.538,68	4.372,36
25	4.641,61	4.231,64	5.705,42	4.166,61
26	5.156,74	4.019,63	4.242,83	3.970,55
27	5.737,53	3.818,24	4.839,81	3.783,70
28	4.535,71	3.626,94	3.975,33	3.605,65
29	4.919,57	3.445,23	4.367,08	3.435,98
30	5.744,45	3.272,62	4.693,84	3.274,30
31	2.569,01	3.108,65	3.019,86	3.120,22
32	2.569,01	2.952,91	3.019,86	2.973,39
33	2.569,01	2.804,96	3.019,86	2.833,47
Total (4-33ºd)	235.899,67	195.383,00	219.538,40	186.263,00
Total (1-33ºd)	344.594,51	236.824,2	329.222,71	224.167,80

Tabela 2. Valor médio (n = 3) diário difundido (experimental e simulado) de fósforo solúvel reativo ($\mu\text{mol PSR.L}^{-1}$) e total difundido em 30 (4-33°) e 33 dias (1-33°) de experimento, nos tratamentos com adição isolada (P^+) e combinada de fósforo (NP^+).

Dia do experimento	Tratamento P^+		Tratamento NP^+	
	PSR experimental	PSR simulado	PSR experimental	PSR simulado
1	115,34	881,76	118,41	757,48
2	1.625,87	841,86	1.313,19	723,72
3	926,44	803,77	879,97	691,46
4	987,19	767,41	958,39	660,63
5	854,56	732,69	774,45	631,19
6	755,57	699,54	650,30	603,05
7	774,45	667,89	710,07	576,17
8	636,50	637,67	534,85	550,49
9	677,40	608,82	523,25	525,95
10	670,06	581,27	636,34	502,50
11	721,21	554,97	571,00	480,10
12	520,82	529,86	503,23	458,70
13	565,19	505,89	433,85	438,25
14	583,90	483,00	465,00	418,72
15	468,22	461,15	404,81	400,05
16	459,34	440,28	432,40	382,22
17	497,91	420,36	403,36	265,18
18	437,56	401,34	404,49	348,90
19	434,66	383,18	433,04	333,35
20	427,88	365,85	318,17	318,49
21	428,85	349,29	313,97	304,29
22	403,68	333,49	357,21	290,73
23	467,41	318,40	374,21	277,77
24	348,34	303,99	300,26	265,39
25	325,75	290,24	271,54	253,56
26	361,89	277,11	263,95	242,25
27	374,00	264,57	350,60	231,46
28	298,00	252,60	255,56	221,14
29	325,10	241,17	301,06	211,28
30	296,87	230,26	288,96	201,86
31	194,64	219,84	180,12	192,86
32	194,64	209,89	180,12	184,27
33	194,64	200,40	180,12	176,05
Total (4-33°d)	14.122,98	12.733,00	12.388,63	11.047,00
Total (1-33°d)	17.353,87	13.219,68	15.086,24	13.219,68

A seguir, são comparados os modelos de difusão obtidos por Fairchild *et al.* (1985), conduzidos a 17,8-25,3°C durante 23 dias, utilizando SDN com capacidade de 245cm³ (equações 2 e 3) e os deste estudo (Equações 4 a 7), obtidos a 20°C durante 33 dias de experimento e SDN com capacidade de 330cm³. Na Tabela 3, constam os coeficientes de difusão dos modelos acima, bem como as concentrações molares nominais dos experimentos.

Os coeficientes de difusão obtidos foram bem próximos dos de Fairchild *et al.* (1985), independentemente da concentração molar inicial do experimento (Tabela 3) e os calculados para o fósforo foram sempre menores em relação à difusão do nitrogênio. Os presentes resultados também demonstraram a manutenção do coeficiente de difusão em condições de adição isolada ou combinada de nutrientes.

Para a comparação com os modelos de Pringle e Bowers (1984), para experimentos conduzidos a 10°C durante 140 horas (equações 8 e 9, $k_D = 0,02\text{h}^{-1}$), o modelo deste estudo foi ajustado para escala horária, obtendo-se K_D igual a $0,002\text{h}^{-1}$, ou seja, valores 10 vezes menores, apesar da temperatura duas vezes maior neste ensaio. Ao que

tudo indica, os resultados marcadamente distintos foram influenciados pela estrutura dos SDN (capacidade e área de exposição de difusão), visto que a concentração molar nominal foi idêntica aos experimentos de Fairchild *et al.* (1985). Pringle e Bowers (1984) utilizaram placas de Petri com área de difusão de 21,2cm², altura de 1,2cm, capacidade de 26cm³ e razão área/altura igual a 17,7. No presente estudo, os SDN apresentaram capacidade 12,7 vezes maior (330cm³) e razão área de difusão/altura 4,1 vezes menor (razão = 4,3).

$$\text{P (0,5 M): } \ln \text{ TP} = -0,05 \cdot (\text{dias}) + 8,63 \quad (r^2 = 0,87) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{N (0,5 M): } \ln \text{ TN} = -0,07 \cdot (\text{dias}) + 9,31 \quad (r^2 = 0,59) \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{tratamento } \text{N}^+: \ln (\text{TN}) = -0,05 \cdot (\text{dias}) + 9,6571, \quad r^2 = 0,77 \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{tratamento } \text{NP}^+: \ln (\text{TN}) = -0,05 \cdot (\text{dias}) + 9,6127, \quad r^2 = 0,79 \quad (\text{Equação 5})$$

tratamento P⁺: $\ln (TP) = -0,05 \cdot (\text{dias}) + 6,8316$, $r^2 = 0,91$
(Equação 6)

tratamento NP⁺: $\ln (TP) = -0,05 \cdot (\text{dias}) + 6,6907$,
 $r^2 = 0,90$ (Equação 7)

PO4: $\ln (TP) = -0,02 \cdot (\text{horas}) + 2,09$ ($r^2 = 0,97$)
(Equação 8)

NO3: $\ln (TN) = -0,02 \cdot (\text{horas}) + 1,48$ ($r^2 = 0,58$)
(Equação 9)

Tabela 3. Concentração molar (M) nominal de nitrogênio e fósforo e seus respectivos coeficientes de difusão (k_D em dias⁻¹) em função do tipo de tratamento (adição isolada de N ou P e combinada) e da temperatura do experimento.

Temp. (°C)	Tratamento N ⁺		Tratamento P ⁺		Tratamento NP ⁺		Referência
	Molar	k_D	Molar	k_D	Molar	k_D	
20	0,75	-0,05	0,05	-0,05	N: -0,75 P: -0,05	-0,05	Neste estudo Neste estudo
17,8-25,3 ($\bar{x} = 20,9$)	0,50	-0,07	0,50	-0,05	----	----	Fairchild <i>et al.</i> (1985)
	0,05	-0,08	0,05	-0,04	----	----	

Em síntese, conclui-se que a proposta da unidade experimental difusora de nutrientes foi adequada ao propósito experimental deste trabalho. A difusão decresceu exponencialmente com o tempo, mantendo razões N:P pré-estabelecidas pelo período de pelo menos 30 dias. Os coeficientes de difusão não sofreram influência da adição isolada ou combinada de nutrientes (N e P) o que permite a comparação entre tratamentos. E, ao que tudo indica, o experimento poderia ser conduzido por períodos mais prolongados de até 45 dias e, no caso do efeito isolado do fósforo, por período de até 59 dias. Todavia, é importante ressaltar que temperaturas muito distintas da proposta neste estudo, bem como a estrutura física (dimensões e proporções) do SDN podem alterar a cinética de difusão dos nutrientes. Ainda, os experimentos devem ser levados a campo no 4º dia, a partir do qual a difusão segue razões pré-estabelecidas de nitrogênio e fósforo. Para tanto, os três primeiros dias de difusão devem ser processados em laboratório, mediante substituição diária da água deionizada na qual os SDN serão mergulhados.

Este experimento foi delineado e testado com a finalidade de ser posteriormente desenvolvido *in situ* para avaliar a limitação de nutrientes para a comunidade perifítica em reservatório tropical. Entretanto, a metodologia proposta pode ser adequada a outros propósitos que envolvam o efeito do enriquecimento contínuo sobre outras comunidades. Destaca-se, finalmente, o uso potencial desse método como importante ferramenta

avaliadora da limitação de nutrientes empregando o perifíton e, portanto, na avaliação de processos de eutrofização e recuperação de sistemas aquáticos. O método é principalmente apropriado em sistemas cuja hidrodinâmica (circulação, efeito de pulso de inundação, corrente, entre outros) tenha efeito direcionador ou controlador sobre a estrutura e o funcionamento do ecossistema considerado.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapesp pela bolsa de doutorado concedida à FSF (processo nº 00/05581-1) e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa outorgada a DCB (processo 520745/96-5), à Maria Cecília Tomasi pela ilustração e a Flávia Pinheiro, Luciane Crossetti, Tatiana Jesus, Vivian Terrel e Wendy Cusato, pelo auxílio nas análises de laboratório.

Referências

- BIGGS, B.J.F. Periphyton communities and their environments in New Zealand rivers. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.*, Wellington, v. 24, p.367-386, 1990.
- BIGGS, B.J.F. The contribution of flood disturbance, catchment geology and land use to the habitat template of periphyton in stream ecosystems. *Fresh. Biol.*, Oxford, v. 33, p.419-448, 1995.
- BORCHARDT, M.A. Nutrients. In: STEVENSON, R. J. *et al. Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems*. London: Academic Press, 1996. cap. 7, p. 184-227.
- CARRICK, H.J. *et al.* Guilds of benthic algae along nutrient: relationship to algal community diversity. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, Winnipeg, v. 7, n. 2, p.117-128, 1988.
- FAIRCHILD, G.W.; LOWE, R.L. Artificial substrates which release nutrients: effects on periphyton and invertebrate succession. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v.114, p.29-37, 1984.
- FAIRCHILD, G.W. *et al.* Algal periphyton growth on nutrient-diffusing substrates: an *in situ* bioassay. *Ecology*, New York, v.66, n. 2, p.465-472, 1985.
- FRANCOEUR, S.N. *et al.* Nutrient limitation of algal biomass accrual in streams: seasonal patterns and a comparison of methods. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, Winnipeg, v. 18, n. 2, p.242-260, 1999.
- HAVENS, K.E. *et al.* Phosphorous uptake by plankton and periphyton in relation to irradiance and phosphate availability in a subtropical lake (Lake Okechobee, Florida, USA). *Arch. Hydrobiol.*, Stuttgart, v. 151, n. 2, p.177-201, 2001.
- LOWE, R. L.; PAN, Y. Benthic algal communities as biological monitors. In: STEVENSON, R. J. *et al. Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. London: Academic Press, 1996. cap. 22, p. 705-739.
- MACKERETH, F.J.H. *et al. Water analysis: some revised methods for limnologists*. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd,

- 1978 (Freshwater Biological Association Scientific Publication n°36).
- MANNY, B.A. et al. Nutrient additions by waterfowl to lakes and reservoirs: predicting their effects on productivity and water quality. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 279/280, p.121-132, 1994.
- MCCORMICK, P.V. et al. Periphyton responses to experimental phosphorus enrichment in a subtropical wetland. *Aquat. Bot.*, Amsterdam, v. 71, p.119-139, 2001.
- MCCORMICK, P.V.; STEVENSON, R.J. 1998. Periphyton as a tool for ecological assessment and management in the Florida Everglades. *J. Phycol.*, Baltimore, v. 34, p.726-733, 1998.
- MENDES, R.S.; BARBOSA, F.A.R. Efeito do enriquecimento *in situ* sobre a biomassa da comunidade perifítica de um córrego de altitude da Serra do Cipó (MG). *Acta Limnológica Brasiliensia*, São Paulo, v. 14, n. 2, p.77-86, 2002.
- MERCANTE, C.T.J.; BIANCHINI JR., I. A method for investigating the heterotrophic assimilation of ammonium and nitrate through planktonic organisms. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 22, n. 2, p.337-341, 2000.
- PRINGLE, C.M.; BOWERS, J.A. An *in situ* substratum fertilization technique: diatom colonization on nutrient-enriched, sand substrata. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 41, p.1247-1251, 1984.
- RODRIGUES, L. et al. O papel do perifíton em áreas alagáveis e nos diagnósticos ambientais. In: THOMAZ, S.M.; BINI, L.M. (Org.). *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: EDUEM, 2003. cap. 10, p. 211-229.
- SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, Waco, Grafton, v. 14, p.799-801, 1969.
- STRICKLAND, J.D.; PARSONS, T.R. 1960. A manual of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bel. Can.*, Ottawa, v. 125, p.1-185, 1960.
- WETZEL, R.G. *Limnology*. New York: Academic Press, 2001.
- Received on June 02, 2004.
Accepted on August 27, 2004.