

**Estudo da resposta da produção primária a múltiplos agentes de stress nos rios das bacias hidrográficas do Cávado, Ave e Lima**

Anne Sophie Fernandes da Silva

UMininho | 2021

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Anne Sophie Fernandes da Silva

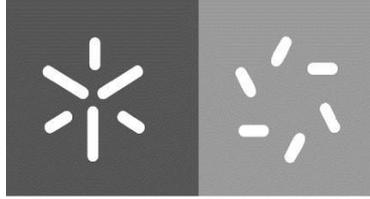
**Resposta da produção primária a múltiplos agentes de stress nos rios das bacias hidrográficas do Cávado, Ave e Lima**

dezembro de 2021

Co-financiado por:







**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Anne Sophie Fernandes da Silva

**Resposta da produção primária a  
múltiplos agentes de stress nos rios  
das bacias hidrográficas do Cávado, Ave e Lima**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação do

**Doutor Cayetano Gutiérrez-Cánovas**

e da

**Professora Doutora Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal**

dezembro de 2021

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição  
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## **AGRADECIMENTOS**

Com o fim de mais uma etapa académica, não posso deixar de agradecer às pessoas que tornaram isto possível:

Aos meus orientadores, ao doutor Cayetano Gutiérrez-Cánovas e a professora doutora Cláudia Pascoal, por me terem dado a oportunidade de realizar este projeto e fazer parte desta equipa, por todo o apoio e incentivo, pela disponibilidade em ajudar sempre que fosse preciso e por todas as reuniões que foram essenciais para conseguir concluir a dissertação.

À aluna de doutoramento Ilisa, que me ajudou na preparação da parte laboratorial, e a toda a equipa do piso 2 do IB-S que se mostrou disponível em tirar as dúvidas que tivesse no laboratório; Ao doutor Giorgio, pela sua disponibilidade em ajudar nas saídas de campo sempre que precisava;

À minha família, pelo apoio incondicional que me deram durante todo o meu percurso académico.

Aos meus amigos que acabaram por tornar este caminho mais fácil graças a sua companhia.

Ao Rafael, por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim e não me deixar desistir.

Este trabalho foi financiado pelo programa operacional de competitividade e internacionalização (COMPETE 2020) do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) IP no âmbito do projeto STREAMECO: Biodiversidade e Funcionamento dos Ecossistemas sob alterações climáticas: do gene até ao rio (PTDC / CTA-AMB / 31245/2017)

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# **RESPOSTA DA PRODUÇÃO PRIMÁRIA A MÚLTIPLOS AGENTES DE STRESS NOS RIOS DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO CÁVADO, AVE E LIMA**

## **Resumo**

Neste estudo foi avaliada a resposta da produção primária dos rios a diferentes fatores de stress que têm vindo a aumentar nos ecossistemas ribeirinhos: aumento da concentração de nutrientes na coluna de água e perda de vegetação ribeirinha devido à intensificação do uso do solo; e alterações hidrológicas causadas pelo uso da água para as atividades humanas ou pelas alterações climáticas. Foram testadas as hipóteses de que a taxa de produção primária seria favorecida pelo aumento da disponibilidade de luz, nutrientes e temperatura e reduzida por alterações significativas do caudal. Além disso, esperávamos que a produção primária fosse melhor explicada por uma combinação de fatores do que pelo efeito dos fatores individuais. Para testar estas hipóteses, foram recolhidas amostras de perifiton em 50 locais de amostragem nas bacias hidrográficas do Cávado, Ave e Lima (noroeste de Portugal) no inverno de 2019 e no verão de 2020. Os resultados demonstraram que o perifiton era influenciado pela sazonalidade, sendo que no verão a taxa de produção primária era mais elevada. Em relação aos agentes de stress: o aumento de caudal, de nutrientes, de luz e de temperatura favoreceram a produção primária, mas o aumento dos nutrientes e do caudal foram as variáveis que mais contribuíram para o processo ecológico em estudo. Para análise dos efeitos da combinação de múltiplos agentes de stress foi usado um *multimodel inference* e criados modelos preditivos do conjunto de agentes de stress. Concluiu-se que os modelos de interação entre os agentes de stress explicavam melhor as respostas da produção primária dos rios do que a análise dos efeitos individuais dos agentes de stress. A análise da interação da luz com os nutrientes não foi significativa neste estudo. No entanto, verificou-se uma forte interação dos nutrientes com o caudal. Esta resultou numa resposta aditiva no verão, mas interativa, sobretudo sinérgica, no inverno. Em ambas as campanhas, o aumento do caudal favoreceu a produção primária em conjunto com o aumento de nutrientes na água. Este estudo demonstrou que apesar de ser importante a compreensão dos impactos individuais dos agentes de stress, a resposta da produção primária é melhor explicada pela ação de múltiplos agentes de stress, e que estas interações devem ser consideradas na gestão e conservação dos ecossistemas ribeirinhos.

PALAVRAS-CHAVE: Produção primária, Perifiton, Sazonalidade, Múltiplos agentes de stress, *Multimodel inference*.

# **RESPONSES OF PRIMARY PRODUCTION TO MULTIPLE STRESSORS IN THE CÁVADO, AVE AND LIMA RIVER BASINS**

## **Abstract**

We assessed the response of primary production to different stressors that have been increasing in the river ecosystems, namely the increase in the concentration of nutrients and the loss of riparian vegetation due to land use intensification; and hydrological changes caused by water demand for human activities or climate change. We tested the hypotheses that the primary production would be favored by increased availability of light, nutrients, and temperature, but would be reduced by significant changes in the flow. Moreover, we expected primary production to be better explained by the combined effects of multiple factors than by the effect of individual factors. To test these hypotheses, periphyton samples were collected in 50 sampling sites across the hydrographic basins of Cávado, Ave and Lima (northwest Portugal) in the winter of 2019 and in the summer of 2020. Results showed that the periphyton was influenced by seasonality, with a higher rate of primary production in the summer. Regarding stressors: the increase in flow, nutrients, light, and temperature favored primary production, but the increase in nutrients and flow were the variables that most contributed to the ecological process under study. To analyze the effects of combining multiple stressors, a multimodel inference was used and predictive models were applied to a combination of selected stressors. We concluded that the models with multiple stressors explained the responses of primary production better than the assessment based on individual stressors. The analysis of the interaction of light with nutrients was not significant in this study. However, there was a strong interaction of nutrients with the flow. This resulted in an additive response in the summer, but interactive effect, mainly synergistic, in the winter. In both campaigns, the increase in flow favored primary production together with the increase in dissolved nutrients. This study demonstrated that although it is important to assess the individual impacts of stressors, the response of primary production is better explained by the interactive effects of multiple stressors, and that they should be considered in the management and conservation of river ecosystems.

KEY WORDS: Primary production, Periphyton, Seasonal changes, Multiple stressors, *Multimodel inference*.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Importância da produção primária nos ecossistemas fluviais .....	1
1.2. Fatores abióticos que influenciam a produção primária nos ecossistemas fluviais .....	3
1.3. Interação de múltiplos fatores de stress .....	6
1.4. Objetivo da tese.....	7
2. Materiais e métodos .....	8
2.1. Área de estudo .....	8
2.2. Caracterização ambiental .....	10
2.3. Desenho experimental e recolha de perifíton .....	11
2.4. Quantificação da biomassa produzida e da taxa de produção primária.....	12
2.5. Análise dos dados .....	15
3. Resultados .....	17
3.1. Variáveis ambientais.....	17
3.2. Taxa de produção primária .....	18
3.3. Importância das variáveis ambientais para explicar os padrões de produção primária .....	19
3.4. Efeitos combinados dos fatores de stress na produção primária .....	22
3.4.1. Campanha de inverno (2019) .....	22
3.4.2. Campanha de verão (2020) .....	25
4. Discussão .....	27
5. Considerações finais.....	30
6. Referências .....	32

## Lista de figuras

- Figura 1.** Mapa de Portugal onde se encontram representadas as bacias hidrográficas analisadas neste estudo: Ave, Cávado e Lima..... 9
- Figura 2.** Fotografias da unidade experimental colocada em campo onde se consegue visualizar o tijolo com os dois azulejos, um deles rodeado de vaselina industrial (para evitar o acesso dos macroinvertebrados heterotróficos) do qual foram recolhidas as amostras para este estudo. .... 12
- Figura 3.** Material usado na preparação das amostras para extração da clorofila: A) Sistema de filtração usado para separação do perifiton e da água; B) Perifiton recuperado de uma das amostras após a filtração; C) Sonicador preparado para sonicar uma das amostra após a filtração; ..... 13
- Figura 4.** Fase final de análise dos teores de clorofila a: A) Espectrofotómetro usado para medições dos valores de absorbância de cada amostra à 664 e 750nm; B) Cuvettes com amostras diferentes e diferentes tonalidades de verde, indicando distintas concentrações de clorofila..... 14
- Figura 5.** Boxplot dos valores médios, máximos e outliers da taxa de produção primária (mg Chl *a* m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>) do perifiton em cada campanha (inverno 2019, n=50 e verão 2020, n=50)..... 19
- Figura 6.** Modelos de regressão linear entre a taxa de produção primária do perifiton (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) e cada variável ambiental selecionada na campanha do inverno de 2019: A) Uso do solo antropogénico (%); B) Caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); C) Temperatura (°C); D) Luz (lux m<sup>-2</sup>). ..... 21
- Figura 7.** Modelos de regressão linear entre a taxa de produção primária do perifiton (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) e cada variável ambiental selecionada na campanha do verão de 2020: A) Azoto inorgânico total (mg L<sup>-1</sup>); B) Caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); C) Temperatura (°C); D) Sombra (%). ..... 22
- Figura 8.** A) Resposta da produção primária (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) contra as combinações da percentagem do uso do solo antropogénico e diferentes caudais (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); B) Variância média explicada pelos fatores de stress dos melhores modelos ( $\Delta AICc \leq 4$ ): temperatura (°C), uso do solo antropogénico (%), luz (lux m<sup>-2</sup>), caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), e a interação do caudal x uso do solo antropogénico. .... 24
- Figura 9.** A) Resposta da produção primária (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) contra as combinações das duas melhores variáveis do modelo: azoto inorgânico dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e diferentes caudais (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); B) Variância média explicada pelos fatores de stress dos melhores modelos ( $\Delta AICc \leq 4$ ): azoto inorgânico dissolvido (mg L<sup>-1</sup>), caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), sombra (%) e temperatura (°C)..... 26

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Variáveis ambientais selecionadas, respectivas unidades, e a sua organização por categoria de stress considerada neste estudo, nomeadamente intensificação do uso do solo, alteração da hidrologia, alteração da vegetação ribeirinha e clima.....	11
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos modelos de estudos criados para a campanha de inverno e de verão, na análise das interações das variáveis e o seu efeito na resposta da produção primária.....	16
<b>Tabela 3.</b> Valores médios (mínimo-máximo) obtidos para as variáveis ambientais em cada campanha: inverno de 2019 e verão de 2020.....	18
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes das correlações de Pearson entre as variáveis ambientais e a taxa de produção primária do perifiton em cada campanha (inverno de 2019 e verão de 2020). A <i>negrito</i> assinalam-se as correlações significativas ( $p < 0,05$ ).....	20
<b>Tabela 5.</b> Variáveis finais preditoras selecionadas para cada categoria de stress: intensificação do uso do solo, hidrologia, vegetação ribeirinha e clima, nas campanhas de inverno e de verão. ....	20
<b>Tabela 6.</b> Valor do critério de informação (AICc) dos modelos com e sem interações para prever os padrões da produção primária para a campanha de inverno. A <i>negrito</i> encontra-se o melhor modelo (menor AICc).....	23
<b>Tabela 7.</b> Modelos relacionando a produção primária com o caudal, luz, uso do solo antropogénico, temperatura (Temp) e a interação uso do solo antropogénico x caudal, e os coeficientes de regressão, <i>goodness-of-fit</i> ( $R^2$ ), graus de liberdade (df), valores de AICc, $\Delta$ AICc e o Akaike weight ( <i>weight</i> ). ....	24
<b>Tabela 8.</b> Valor do critério de informação (AICc) dos modelos com e sem interações para prever os padrões da produção primária para a campanha de verão. A <i>negrito</i> encontra-se o melhor modelo (menor AICc).....	25
<b>Tabela 9.</b> Modelos relacionando a produção primária com o azoto inorgânico dissolvido, caudal, sombra e temperatura (Temp), e os coeficientes de regressão, <i>goodness-of-fit</i> ( $R^2$ ), graus de liberdade (df), valores de AICc, $\Delta$ AICc e o peso dos modelos ( <i>weight</i> ).....	26

## **1. Introdução**

No último século tem havido um aumento das pressões antropogênicas sobre os ecossistemas naturais devido às atividades humanas e ao crescimento populacional (Sanderson *et al.*, 2002). Estas pressões podem ser de natureza biótica ou abiótica, e têm a particularidade de alterarem a variação natural que ocorre nos ecossistemas, constituindo assim um fator de stress sobre uma população ou comunidade (Jackson *et al.*, 2016; Nöges *et al.*, 2016). Estas podem resultar numa alteração da gama de condições habituais que os organismos experienciam como é o caso do aumento da temperatura em algumas zonas do planeta (Perkins *et al.*, 2014) e o aumento da concentração de nutrientes e de contaminantes nos ecossistemas aquáticos (Xiong *et al.*, 2019). Estas alterações globais também podem produzir uma diminuição na intensidade de outros fatores, como é o caso da redução da precipitação (Carmichael *et al.*, 1996) e do oxigénio dissolvido nos sistemas aquáticos (Cox & Whitehead, 2009; Wang *et al.*, 2018). O estudo dos efeitos das alterações globais é um tema de grande interesse e atualidade em ecologia uma vez que estas perturbações podem alterar os processos ecológicos e o funcionamento dos ecossistemas. Na natureza, várias destas alterações ambientais podem ocorrer em simultâneo, tornando difícil prever as consequências ecológicas do seu efeito simultâneo sendo necessário avaliar como o efeito combinado de agentes múltiplos de stress pode afetar o funcionamento dos ecossistemas (Ormerod *et al.*, 2010).

Os ecossistemas de água doce, principalmente os rios, são ecossistemas que ligam os ecossistemas terrestres aos oceânicos (Aufdenkampe *et al.*, 2011; Battin *et al.*, 2009). Estes ecossistemas são os mais fortemente afetados pelas alterações climáticas globais, pela intensificação do uso do solo e pela degradação de habitats aquáticos e ripários; por isso, têm sido alvo de interesse crescente nos estudos em ecologia (Kingsford, 2011; Reid *et al.*, 2018). Como mencionado, existem múltiplos agentes de stress a atuar simultaneamente sobre os ecossistemas de água doce, os quais estão em risco também pelo fato da água doce ser um recurso natural altamente explorado pelo ser humano (Heathwaite, 2010).

### **1.1. Importância da produção primária nos ecossistemas fluviais**

A produção primária, definida geralmente como a conversão de energia solar em matéria orgânica por organismos fotossintéticos durante um intervalo de tempo (Bott, 1996), tem uma grande

importância para a estrutura e manutenção de comunidades aquáticas. O funcionamento dos ecossistemas fluviais depende da atividade dos produtores primários, dado que a fotossíntese, a produção de biomassa e de oxigênio são realizados por produtores primários (Minshall, 1978). Os organismos autotróficos dos rios podem classificar-se como biofilme ou perifiton (compostos por algas, diatomáceas e cianobactérias, que crescem sobre os substratos bentônicos, como as rochas), macrófitas (que podem incluir briófitas, plantas vasculares e macroalgas) ou fitoplâncton (algas suspensas nas colunas de água) (Allan & Castillo, 2007; Battin *et al.*, 2016; Lowe & LaLiberte, 2017).

As algas bentônicas têm um papel relevante nos ecossistemas de rio pois fazem parte da base da cadeia alimentar e estão na interface do ambiente físico-químico e da comunidade biológica do rio (Lowe & LaLiberte, 2017). São excelentes bioindicadores da qualidade da água, uma vez que estas são sésseis - não podem mover-se do ambiente onde se encontram (Hering *et al.*, 2006; Whitton, 2013), e os seus ciclos de vida curtos resultam numa resposta rápida às mudanças das condições ambientais (Jones, 2013), por isso foram selecionados como variável biológica do estudo.

Vários estudos têm demonstrado o valor que a produção primária tem para os ecossistemas de rio: percebeu-se, por exemplo, que a biomassa produzida durante o verão é disponibilizada aos consumidores do rio ao longo do ano, permitindo assim a sobrevivência destes mesmo quando não há outra fonte de matéria orgânica (Minshall, 1978); ou, por exemplo, num estudo em rios de floresta, com muita matéria alóctone disponível, a principal fonte de alimento para alguns invertebrados foram as algas apesar da sua biomassa representar uma pequena percentagem da matéria orgânica disponível, mostrando a preferência de alguns invertebrados para a utilização das algas como fonte de carbono e energia (Hall *et al.*, 2001; Brett *et al.*, 2017).

Estudar a produção primária é fundamental para perceber os fatores responsáveis pela eutrofização, definida pelo crescimento descontrolado de algas após um aumento de concentrações de nutrientes fundamentais para os organismos fotossintéticos, como o azoto e o fósforo, e que se torna um problema ambiental para os rios e a sua biodiversidade (O'Hare *et al.*, 2018). Por isso, é importante ter em conta os processos de produção primária nos rios e a atividade das algas bentônicas quando analisamos as alterações causadas pelo homem nos ecossistemas aquáticos (Stevenson, 2014).

## **1.2. Fatores abióticos que influenciam a produção primária nos ecossistemas fluviais**

A produção primária é um processo ecológico chave influenciado pela hidrologia do local, pela disponibilidade de luz para a realização da fotossíntese, pela temperatura, e pela retenção e disponibilidade de nutrientes (Allan & Castillo, 2007). No caso das algas bentônicas os fatores são categorizados pela regulação da acumulação ou perda de biomassa. Os principais fatores que influenciam o metabolismo e o crescimento dos seres autotróficos são a luz, a temperatura e os nutrientes. A hidrologia também pode interferir no crescimento dos seres autotróficos pela velocidade elevada da água, que pode ter um efeito negativo por abrasão do perífiton (Biggs, 1996), ou pela diminuição do caudal que diminui o fluxo de nutrientes, e, conseqüentemente, diminui a produção de biomassa e afeta a composição do perífiton (Timoner *et al.*, 2019).

Para estudar qualquer ecossistema aquático é necessário perceber a sua dinâmica e funcionamento. A zona terrestre adjacente e que limita o curso de água tem uma grande influência no sistema aquático e é uma zona de troca de água, energia e nutrientes entre o ambiente terrestre e aquático com grande influência nos processos ecológicos do rio (Larsen *et al.*, 2016; Schindler & Smits, 2017; Subalusky *et al.*, 2018). Uma das principais causas do aumento de stress nos ecossistemas é a intensificação do uso do solo e da água pelas atividades humanas. São frequentes i) alterações da luz que o rio recebe, com concomitante aumento da temperatura da água do rio, devido à destruição da vegetação ribeirinha, ii) alterações da entrada de nutrientes e sedimentos provenientes da agricultura e da erosão do solo agravada pela destruição da vegetação ribeirinha, e iii) alterações na hidrologia como consequência de alterações do regime de precipitação, do uso da água pela agricultura e da existência de obstáculos como é o caso das barragens, com consequências diretas para a produção primária (Niyogi *et al.*, 2006).

A zona ribeirinha é uma das zonas com maior importância para os rios uma vez que se encontra localizada nas margens dos rios e funciona como um local de transição entre o rio e o ecossistema terrestre circundante (Gregory *et al.*, 1991; Sabater *et al.*, 2009). A zona ripária, dominada por árvores e arbustos, é chave para controlar a produção primária pois é responsável por regular a temperatura da água e a luz disponível para os organismos aquáticos (Hynes, 1975; Turunen *et al.*, 2019), uma vez que a radiação solar que passa através da folhagem depende do tipo e da densidade da vegetação ribeirinha (Gregory *et al.*, 1991). Percebemos que a entrada de luz é menor onde a folhagem é densa e fechada,

enquanto que uma vegetação relativamente aberta permite a entrada de maior quantidade de luz (Heaston *et al.*, 2017). A disponibilidade de luz, relacionada com a presença de vegetação ribeirinha densa, influencia a produtividade das algas que são imóveis, pelo que a sua função fica comprometida se não receberem luz (Bowes *et al.*, 2012; Halliday *et al.*, 2016; Parkyn *et al.*, 2003). A variação de temperatura da água é menor em rios com bastante vegetação ripária, sugerindo que os ecossistemas florestais conseguem estabilizar as condições térmicas dos rios e tornando evidentes os benefícios de manter a vegetação ribeirinha natural dos rios (Turunen *et al.*, 2021). A temperatura da água é importante em ecossistemas aquáticos uma vez que os organismos aquáticos encontram-se limitados a uma gama de valores ideais (Webb *et al.*, 2008). Como a temperatura vai variando ao longo do ano, forma demonstradas temperaturas ideais em alguns períodos do ano, como na primavera e no verão, comparativamente a estação do inverno (Rosemond, 1994).

O regime de luz natural em rios está cada vez mais perturbado, pela desflorestação e alteração do uso do solo nas zonas próximas das margens, provocando alterações na biomassa das algas, afetando a comunidade do biofilme e as funções que estas desempenham no ecossistema (Bruno *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2015). Para além dos fatores luz e temperatura, a zona ribeirinha funciona como zona *buffer*, ou seja, ponto de acumulação de alguns fatores perturbadores que provém do aumento da intensificação do uso do solo e que resultam em poluição que pode chegar aos rios, como nutrientes e sedimentos (Feld *et al.*, 2018; Segurado *et al.*, 2018). Já foi demonstrado que o potencial impacto de uma fonte de poluição pode ser amortecido pela presença de uma zona ribeirinha bem mantida, impedindo eutrofização das algas bentónicas (von Schiller *et al.*, 2007).

As principais fontes do aumento de concentração de nutrientes, como o azoto (N) e o fósforo (P) são as atividades agrícolas e pecuárias, e as descargas de efluentes domésticos ou industriais mesmo que provenientes de estações de tratamento de águas residuais (Segurado *et al.*, 2018). Estas entradas de nutrientes podem ser consideradas diretas provenientes de um ponto específico, como é o caso das descargas de efluentes; ou podem ser difusas, como as que ocorrem através de escoamento superficial a partir das atividades agrícola (Carpenter *et al.*, 1998). Na agricultura, a adição de azoto e de fósforo são aplicados aos solos como fertilizantes para crescimento das culturas de plantas em quantidades que geralmente excedem o que o solo necessita, acabando por ser arrastados pelas chuvas e chegar aos rios (Carpenter *et al.*, 1998; Weissteiner *et al.*, 2013).

O crescimento das algas bentónicas é frequentemente limitado pela disponibilidade de nutrientes no ecossistema (Beck *et al.*, 2017; Elser *et al.*, 2007). O enriquecimento da água dos rios com azoto e

fósforo pode atenuar ou eliminar esta limitação de nutrientes na comunidades de algas, por isso, a adição destes nutrientes pode resultar na sua rápida absorção e induzir um aumento da biomassa produzida, resultando na eutrofização do rio (Dodds & Smith, 2016; Smith *et al.*, 1999). No entanto, é importante notar que o pequeno aumento na concentração dos nutrientes leva a um aumento da biomassa nos sistemas mais oligotróficos (Dunck *et al.*, 2015), mas entradas de nutrientes que excedam a absorção biótica do perifiton levam a uma acumulação destes nutrientes no ecossistema (Price & Carrick, 2016) e a um crescimento descontrolado dos seres autotróficos.

As atividades urbanas e indústrias também são importantes fontes de perturbação visto que pode haver contaminação por descargas de efluentes domésticos ou industriais mesmo após sofrerem tratamento nas estações de tratamento de águas residuais (Calapez *et al.*, 2019; Huerta *et al.*, 2016). Apesar de contribuir com nutrientes, a componente de contaminantes químicos associados a estas descargas têm geralmente um efeito negativo no biofilme quer de forma direta quer por poderem interferir na capacidade do biofilme reter os nutrientes da coluna de água (Pereda *et al.*, 2021).

Para além destes fatores, o regime hidrológico é essencial para controlar a biologia e biogeoquímica dos rios (Skovsholt *et al.*, 2020). Existe uma variabilidade natural do fluxo do rio relacionados com o clima e topográfica do local que é importante para manter a sustentabilidade e produtividade normal dos ecossistemas ribeirinho, no entanto, o regime hidrológico tem vindo a ser modificado pelas alterações climáticas devido à intensificação da seca ou a momentos de precipitação intensa (Gudmundsson *et al.*, 2021), e devido ao crescimento exponencial da população humana, uma vez que a água dos rios tem sido usado para irrigação, produção de energia elétrica ou uso doméstico (Schneider *et al.*, 2013).

O caudal também tem influência na biomassa das algas e depende da velocidade do corrente. Assim, elevada velocidade do fluxo de água pode levar à diminuição da biomassa pela remoção de algumas algas devido a força de abrasão exercida pela água e pelos sedimentos que estão transportam (Francoeur & Biggs, 2006); também, uma diminuição do fluxo de água, ou fenómenos de seca dos rios, levam a uma clara diminuição da biomassa do perifiton por dificuldade no acesso aos nutrientes, ou pela impossibilidade do transporte destes pelo rio (Calapez *et al.*, 2019). De notar que uma ligeira velocidade da corrente leva a um aumento de biomassa devido ao efeito positivo da corrente na renovação e na absorção de nutrientes (Bækkelie *et al.*, 2017). Relacionada com o caudal, a profundidade do rio, também é um fator importante que está ligado à incidência de luz no substrato bentónico (Hofmann *et*

*al.*, 2020). Uma maior profundidade implica uma menor incidência de luz direta, podendo causar, assim, uma menor biomassa de algas bentônicas (Jäger & Borchardt, 2018).

### **1.3. Interação de múltiplos fatores de stress**

Os ecossistemas estão expostos a múltiplos fatores stress que atuam simultaneamente, o que torna difícil o seu estudo pois vários fatores de stress podem resultar numa variedade de efeitos conjuntos (Jackson *et al.*, 2016). Demonstrou-se que quando temos dois ou mais agentes de stress a atuar em simultâneo o efeito pode ser aditivo, em que os fatores ambientais não interagem entre si sendo o efeito global resultante a soma dos efeitos individuais; ou interativos se o resultado global for maior ou menor do que a soma dos efeitos individuais (Birk *et al.*, 2020). Os efeitos interativos podem ser sinérgicos, quando o efeito combinado é maior do que a soma dos efeitos individuais (Brook *et al.*, 2008), ou antagonísticos, se o efeito combinado resultante for menor do que a soma individual de cada fator (Folt *et al.*, 1999).

Em ecossistemas de água doce esperamos de um modo geral interações antagonísticas (Jackson *et al.*, 2016), e isto pode ser explicado pelo facto dos organismos de água doce viverem num ambiente afetado frequentemente por perturbações nos fatores abióticos, exibindo assim já algumas adaptações que podem fornecer resistência contra alguns dos agentes de stress (Soria *et al.*, 2020). Essas alterações podem favorecer genótipos ou fenótipos resistentes ao stress tornando algumas espécies mais resistentes à combinação de certos fatores de stress (Jackson *et al.*, 2016). A prevalência de interações antagonistas pode também ser explicada pelo facto de quando um organismo é exposto a um agente de stress, isto lhe poder conferir numa maior tolerância a outro agente de stress (Vinebrooke *et al.*, 2004).

Realmente, vários estudos têm mostrado que os efeitos de agentes múltiplos de stress nas comunidades de rios não são aditivos. Por exemplo, a adição de nutrientes e o aumento da velocidade da corrente do rio mostraram ter efeitos antagonísticos na biomassa do perifíton (Bækkelie *et al.*, 2017). Vários estudos mostraram que o aumento da concentração de nutrientes levam a um aumento de biomassa do perifíton (Dunck *et al.*, 2015) e que o aumento da velocidade da corrente tem o mesmo efeito (Francoeur & Biggs, 2006), mas quando estes dois fatores atuam em simultâneo o aumento da biomassa na realidade é menor do que a soma de cada efeito individual (Bækkelie *et al.*, 2017). Por outro lado, a redução do fluxo de água pode enfraquecer o efeito positivo dos nutrientes no crescimento da biomassa do perifíton (Calapez *et al.*, 2019; Segurado *et al.*, 2018). Também podemos encontrar

respostas sinérgicas: por exemplo, o aumento da concentração de nutrientes e da disponibilidade de luz solar, por diminuição da vegetação ribeirinha, leva a um aumento da biomassa de algas superior ao esperado a partir da análise dos seus efeitos individuais (Doyle *et al.*, 2005).

Na natureza há uma elevada variedade de interações entre os agentes de stress, pelo que se destaca a importância de selecionar uma métrica para quantificar o seu impacto final, uma vez que a combinação dos diferentes agentes de stress pode originar diferentes efeitos nas comunidades e nos ecossistemas, podendo, por exemplo, afetar mais a abundância ou a diversidade de plantas, ou a produção primária (Jackson *et al.*, 2016; Piggott, Townsend, *et al.*, 2015).

#### **1.4. Objetivo da tese**

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a resposta da produção primária, resultante da atividade do perífiton, quando exposto a múltiplos agentes de stress, e compreender a variação da resposta à sazonalidade. Para isso, foram analisados 50 rios das bacias hidrográficas do noroeste de Portugal: Ave, Cávado e Lima durante duas campanhas (inverno de 2019 e verão de 2020), e foram selecionados três gradientes cruzados de stress: i) um gradiente químico de eutrofização, definido pelo aumento da concentração de nutrientes nomeadamente azoto e fósforo, e outros contaminantes eventualmente associados, resultantes da intensificação do uso do solo; ii) diferenças na densidade da vegetação ribeirinha que podem influenciar a entrada de luz e de matéria orgânica alóctone no rio; e iii) diferenças hidrológicas ao nível do caudal e da velocidade da corrente do rio devidas a fatores climatéricos e às atividades humanas.

Esperávamos que i) o aumento da fonte de nutrientes, induzida pela intensificação do uso do solo, tivesse um efeito positivo na produção primária uma vez que o azoto e o fósforo são limitantes no ecossistema ribeirinho e são importantes para os organismos autotróficos; ii) a diminuição do caudal do rio tivesse um efeito negativo na produção primária por diminuição da renovação de nutrientes na água; e o aumento do caudal pudesse ter um efeito negativo por destruição e remoção do perífiton do substrato, sendo um caudal médio o ideal para permitir a constante renovação dos nutrientes da água; iii) a diminuição da vegetação ribeirinha tivesse um efeito positivo pela maior entrada de luz, um fator essencial para os organismos autotróficos, e pela destruição da zona adjacente ao rio responsável pela retenção dos nutrientes; iv) o aumento da temperatura induzisse uma resposta positiva no perífiton se a

temperatura se encontrasse na gama de valores ótimos, sendo que uma redução ou aumento drástico de temperatura pudessem causar uma resposta negativa no perifíton.

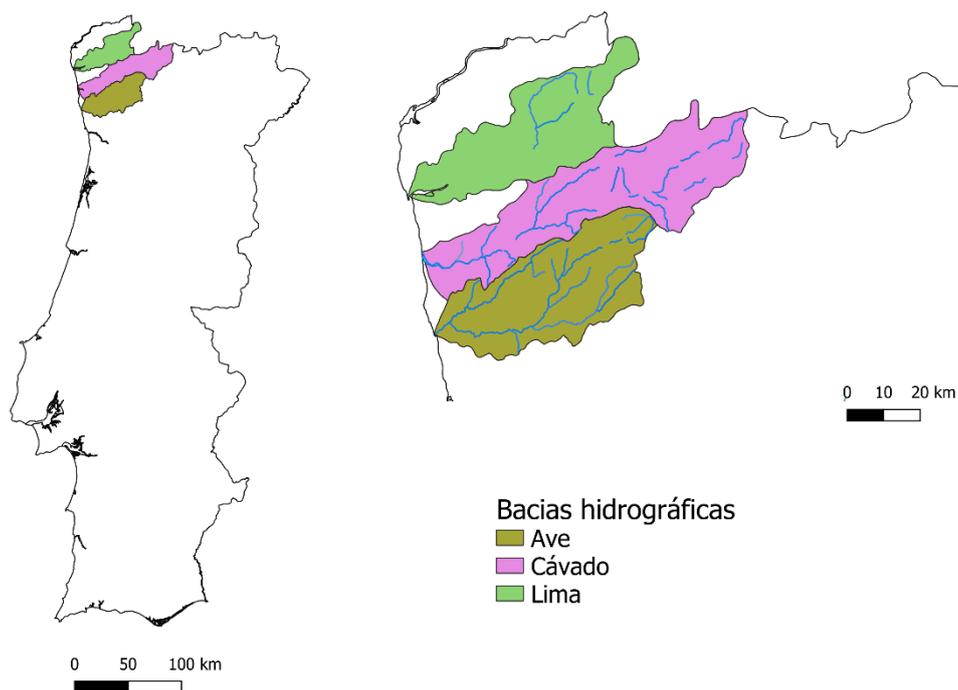
Neste estudo, esperávamos ainda diferenças na taxa de produção primária em cada uma das campanhas devido à sazonalidade, sendo expectável uma maior produção no verão uma vez que apresenta maior incidência de luz e temperaturas ótimas para o crescimento do perifíton.

Considerando o efeito de múltiplos fatores de stress que atuam sobre os rios, mostrado em estudos prévios, esperávamos que as diferenças na taxa de produção primária fossem melhor explicadas por um conjunto de fatores do que por um só fator dominante, podendo os efeitos ser aditivos ou interativos. Para estudar a presença de efeitos interativos, foram testadas duas hipóteses: a existência de efeitos de interação entre os nutrientes e a entrada de luz no rio, uma vez que a entrada de nutrientes pode potenciar o crescimento das algas mas só em situações de presença de luz; e a existência de efeitos de interação entre os nutrientes e o caudal, uma vez que o aumento da concentração de nutrientes nos rios está dependente do movimento da água para a renovação constante destes nutrientes.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Área de estudo**

Este estudo focou-se na análise das bacias hidrográficas do rio Cávado, Ave e Lima situadas na região noroeste de Portugal (Figura 1), onde foram selecionados 50 locais de amostragem. A seleção dos locais de amostragem teve em conta os três gradientes de stress que se pretendiam estudar, por isso, foram selecionados rios com diferentes abundâncias de vegetação ribeirinha, diferentes caudais, e rios em zonas com diferentes uso do solo (agrícola, urbanizado e natural), com implicações para a entrada de nutrientes e contaminantes no rio a partir das zonas adjacentes. A variabilidade espacial também fornece a oportunidade de capturar variações no clima.



**Figura 1.** Mapa de Portugal onde se encontram representadas as bacias hidrográficas analisadas neste estudo: Ave, Cávado e Lima.

A maior parte da região da bacia hidrográfica do rio Ave tem um elevada densidade populacional, principalmente a jusante, e uma elevada atividade agrícola (Gonçalves *et al.*, 1992). Vão-se verificando algumas situações de descargas de efluentes urbanos e industriais produzidos nesta região, diretamente no rio Ave e nos seus principais afluentes (Soares *et al.*, 1999). Têm sido implementados controlos para a diminuição dos contaminantes químicos (Alves *et al.*, 2009), no entanto este continua a sofrer de eutrofização devido ao excesso d matéria orgânica e de nutrientes inorgânicos que podem induzir o crescimento das algas.

A região da bacia hidrográfica do rio Lima apresenta eventos frequentes de chuvas intensas, por isso encontra-se sujeita a episódios de inundações. Aqui encontram-se duas centrais hidroelétricas, como as barragens Lindoso e Touvedo e seus reservatórios que vão ajudando no controlo de cheias na sequência de eventos pluviométricos (Pinho *et al.*, 2014).

Tal como a bacia do rio Lima, a bacia do rio Cávado é das zonas mais pluviosa de Portugal, com precipitação anual superior a 3500 mm, devido à sua posição geográfica próxima do Atlântico e disposição montanhosa (Jesus, 2012). A bacia do rio Cávado é uma área industrializada onde, por

consequência, também existem focos de poluição que são responsáveis pela deterioração da qualidade da água dos rios e ribeiros (Gonçalves *et al.*, 1994).

## **2.2. Caracterização ambiental**

Para cada um dos locais de amostragem foi necessária a caracterização das variáveis abióticas que podem influenciar a produção primária. Os agentes de stress testados neste estudo resultam i) da intensificação do uso do solo, traduzido por um gradiente de eutrofização caracterizado pelo aumento da concentração de nutrientes e de outros contaminantes associados, ii) da diminuição da vegetação ribeirinha e iii) de alteração do caudal.

Em todos os locais de amostragem colocou-se um *data loggers* para medir a temperatura e a luminosidade de forma continua durante o período em que a unidade experimental esteve no local (aproximadamente cinco semanas).

A vegetação ribeirinha que se encontrava nas margens do rio foi caracterizada através do índice de qualidade de vegetação ripária (QBR, Munné *et al.*, 1998), e a percentagem de sombra no canal do rio conseguida através de estimacão no local. Também se caracterizou os usos do solo num raio de 500 metros de cada local seleccionado para amostragem, onde se estimou a percentagem de solo que era natural sem influência humana, solo de uso pastorício, agrícola e artificial urbano com ajuda de imagens obtidas através do projeto COS (Cartografia de Uso e Ocupação do Solo, 2018), disponibilizadas pela Direção-Geral do Território, e imagens satélites analisadas no software de sistema de informação geográfica (QGIS). Para simplificar, foi gerada uma variável para o uso do solo antropogénico que resulta da soma das percentagens do uso do solo agrícola, pastorício e artificial/urbano.

Para a hidrologia local, a largura e a profundidade do rio foram medidas, e do seu produto foi calculada a área da secção transversal. A profundidade foi medida em intervalos iguais ao longo da largura do rio, para conseguir um valor médio da profundidade (Ahn *et al.*, 2019). Em cada um destes intervalos foi também medida a velocidade da corrente. Os valores do caudal do rio foram conseguidos através da multiplicação da área de secção transversal do rio pela velocidade média da corrente (Dobriyal *et al.*, 2016).

Foram também recolhidas amostras de água, as quais foram transportadas no mala térmica ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) até ao laboratório para quantificar se a concentração de amónio ( $\text{N-NH}_4^+$ , método de salicilato),

nitrito (N-NO<sub>2</sub>, método diazotação de Griess), nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, método de redução de cádmio) e ortofosfato (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, método do ácido ascórbico) por espectrofotometria (HACH, 2013). Para simplificar, os dados da concentração de azoto, estes foram expressos em azoto inorgânico dissolvido (DIN) a partir da soma das concentrações de azoto no ião amónio, nitrito e nitrato.

Na tabela 1 encontram-se as variáveis recolhidas e separadas pelas categorias de estudo que representam: intensificação do uso do solo, hidrologia, vegetação ribeirinha e clima.

**Tabela 1.** Variáveis ambientais selecionadas, respetivas unidades, e a sua organização por categoria de stress considerada neste estudo, nomeadamente intensificação do uso do solo, alteração da hidrologia, alteração da vegetação ribeirinha e clima.

Variáveis ambientais	Unidades
<i>Intensificação do uso do solo</i>	
Azoto inorgânico dissolvido (N.NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + N.NO <sub>2</sub> + N.NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	mg L <sup>-1</sup>
Ortofosfato (P.PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	mg L <sup>-1</sup>
Uso do solo antropogénico (agrícola + pastorício + artificial)	%
<i>Hidrologia</i>	
Profundidade	cm
Velocidade da corrente	m s <sup>-1</sup>
Caudal	m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>
<i>Vegetação ribeirinha</i>	
Luz	lux m <sup>2</sup>
Sombra	%
QBR	-
<i>Clima</i>	
Temperatura	°C

### 2.3. Desenho experimental e recolha de perifiton

Foram realizadas duas campanhas de recolha de amostras: inverno de 2019 e verão de 2020 para refletir os extremos de produção e as suas respostas aos fatores de stress ao longo do ano.

Para caracterizar a produção primária, foi criada uma unidade experimental com substratos artificiais constituídos por tijolos e azulejos (Figura 2). Em cada tijolo, colocaram-se dois azulejos (área de 100 cm<sup>2</sup> por azulejo): i) um deles foi rodeado por vaselina industrial para impedir o acesso aos macroinvertebrados herbívoros, ao mesmo tempo que permite o crescimento e colonização dos produtores primários, nomeadamente perifíton, ii) o outro azulejo foi colocado sem qualquer restrição. Para este estudo foi considerado apenas o tijolo rodeado por vaselina porque representa a produção primária do perifíton. Em cada um dos 50 locais selecionados, foram imersos 3 tijolos em 3 zonas representativas da variabilidade do local de estudo, juntamente com o *data logger* que permitiu uma monitorização contínua da temperatura e da luminosidade do local onde estava colocado o tijolo. Cada tijolo foi fixado ao substrato com ajuda de barras de ferro e cordas.



**Figura 2.** Fotografias da unidade experimental colocada em campo onde se consegue visualizar o tijolo com os dois azulejos, um deles rodeado de vaselina industrial (para evitar o acesso dos macroinvertebrados heterotróficos) do qual foram recolhidas as amostras para este estudo.

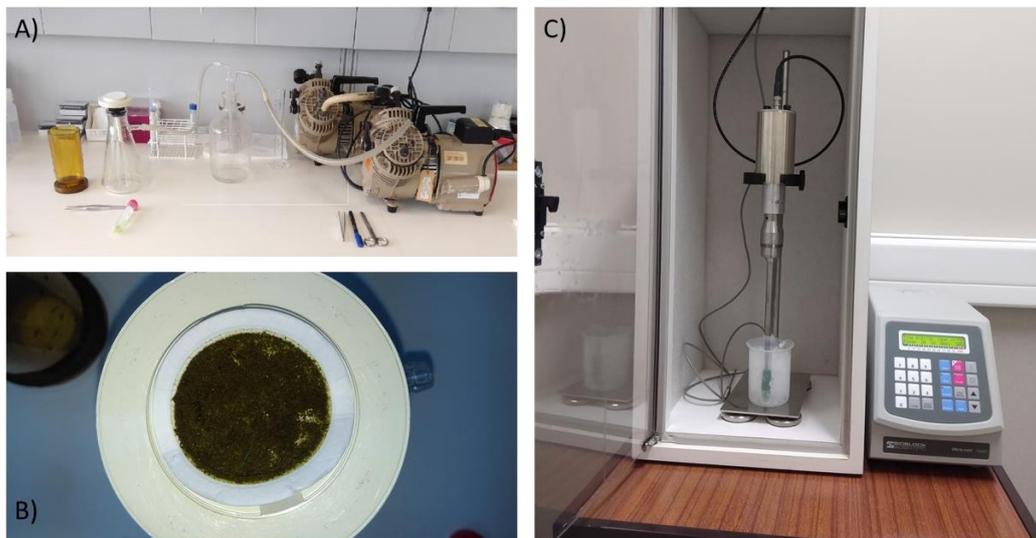
Após aproximadamente 35 dias (gama de 32-46 dias), regressou-se ao campo para a recolha das amostras. Depois de retirar a vaselina do tijolo, o perifíton que colonizou cada tijolo foi raspado para um tubo falcon de 50mL previamente marcado e embrulhado em papel de alumínio para impedir a degradação da clorofila pela luz. Os tubos falcon foram preservados a 4°C até a chegada ao laboratório, onde as amostras foram congeladas até à sua análise.

## **2.4. Quantificação da biomassa produzida e da taxa de produção primária**

A biomassa produzida pelo perifíton em cada local foi quantificada através da análise do teor em

clorofila *a* (Chl *a*) (Gómez *et al.*, 2009). No total eram esperadas 300 amostras (50 rios x 3 azulejos x 2 campanhas), no entanto acabaram por ser recolhidas 259 amostras totais depois da perda de algumas réplicas em distintos locais.

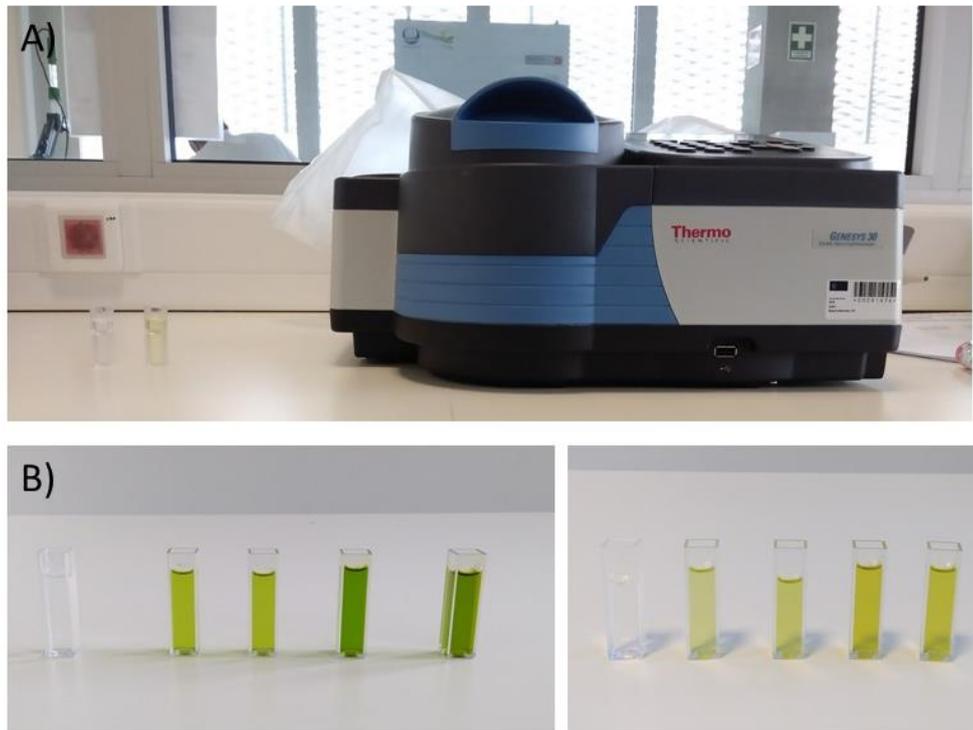
As amostras previamente recolhidas e congeladas foram descongeladas antes de se proceder à extração da clorofila. Para isso, a amostra de água e material que se encontrava no tubo falcon, foi filtrada através de filtros de fibra de vidro GF/C (diâmetro 47 mm) para recolha do perifiton (Figura 3A e 3B). O filtro com o perifiton foi dobrado e colocado num tubo falcon de 15mL embrulhado em papel de alumínio, onde depois foram adicionados 6mL de acetona (90% v/v) deixando o filtro com a amostra completamente coberto. Para finalizar a preparação das amostras para a extração da clorofila, cada amostra foi sujeita a ultrassons com o sonicador Vibracell 75115 (*Bioblock Scientific*), durante um total de 90 segundos sobre gelo, com pulsos de 30 segundos *on* e 30 segundos *off* (Figura 3C), e guardados a 4°C durante 24 horas para que a acetona proceda à extração da clorofila.



**Figura 3.** Material usado na preparação das amostras para extração da clorofila: A) Sistema de filtração usado para separação do perifiton e da água; B) Perifiton recuperado de uma das amostras após a filtração; C) Sonicador preparado para sonicar uma das amostra após a filtração;

Após 24 horas procedeu-se à quantificação da clorofila por espectrofotometria GENESYS 30 (*Thermo Scientific*). Para tal, as amostras voltaram a ser sonicadas, usando o procedimento descrito acima. A seguir realizou-se outra filtração para descartar o filtro e recuperar a solução de acetona com a clorofila. Esta solução foi recolhida numa proveta e o seu volume anotado, sendo transferido 2  $\mu$ L desse volume para uma *cuvette* (Gómez *et al.*, 2009) foram realizadas leituras para 2 comprimentos de onda:

664 e 750 nm sendo que o pico máximo de absorção da clorofila é a 664 nm e a leitura a 750 nm foi usada para descontar a turbidez da amostra (Steinman *et al.*, 2017) (Figura 4).



**Figura 4.** Fase final de análise dos teores de clorofila *a*: A) Espectrofotômetro usado para medições dos valores de absorvância de cada amostra à 664 e 750nm; B) Cuvettes com amostras diferentes e diferentes tonalidades de verde, indicando distintas concentrações de clorofila.

A concentração de clorofila ( $\text{mg m}^{-2}$ ) foi então conseguida através da seguinte equação (Gómez *et al.*, 2009):

$$\text{Chl } a = 11,4 (A_{664} - A_{750}) \cdot V / LS$$

onde 11,4 é a correção da absorvância derivada do coeficiente de absorvância da clorofila *a* a 664nm;  $A_{664}$  e  $A_{750}$  são os valores das absorvâncias registadas à 664nm e 750nm, respetivamente;  $V$  é o volume final do extrato usado (L);  $L$  é a espessura da cuvette usada (cm) e  $S$  a superfície do substrato que foi amostrado no azulejo ( $\text{m}^2$ ).

A taxa de produção de biomassa final foi obtida a partir da concentração de clorofila tendo em conta o número de dias em que esteve no campo através da equação abaixo, sendo que *Chl a* é a concentração de clorofila por unidade de superfície ( $\text{mg m}^{-2}$ ) obtida através da equação anterior, e o

tempo corresponde aos dias em que os tijolos estiveram imersos para permitir a colonização pelo perifiton:

$$\text{Produção primária (mg Chl a m}^{-2} \text{ dia}^{-1}) = \text{concentração Chl a (mg m}^{-2}) / \text{tempo(dias)}$$

## 2.5. Análise dos dados

Na análise dos dados foram testadas as hipóteses propostas inicialmente com o objetivo de analisar o efeito dos agentes de stress e das suas interações na taxa de produção primária. A análise foi realizada no software estatístico *R* versão 4.1.1. A análise dos resultados foi feita separadamente para inverno de 2019 e verão de 2020.

Para a análise final das variáveis ambientais, foram usadas as variáveis representadas na tabela 1. Após uma primeira inspeção da distribuição das variáveis, algumas foram transformadas para que tivessem uma distribuição simétrica, e para linearizar as relações com o resto das variáveis. Assim as variáveis QBR, sombra, luz, temperatura, ortofosfato, uso do solo antropogénico, caudal, profundidade e velocidade da corrente foram logaritmizadas, e o azoto inorgânico dissolvido foi transformado usando a raiz quadrada. As variáveis ambientais foram padronizadas (média=1, desvio-padrão=0) para poder comparar os seus efeitos na produção primária.

Primeiramente, foi avaliado se a taxa de produção primária apresentava mudanças sazonais (inverno de 2019 vs verão de 2020) através de um teste *t*, complementado pela visualização dos dados através de um *boxplot* que também permitiu registar os valores máximos e médios de produção primária em cada campanha.

Seguidamente, com o objetivo de identificar as variáveis mais explicativas dentro de cada tipo de stress (Tabela 1), foram calculadas as correlações de Pearson entre as variáveis ambientais e a produção primária para cada uma das campanhas. Para cada tipo de stress, foram selecionadas preferencialmente as variáveis que apresentavam coeficientes de correlação absoluto (sem considerar o sinal) mais altos e que estabeleciam correlações significativas para cada campanha. Para evitar redundâncias e problemas nos modelos, das variáveis com correlações significativas, escolheu-se para os modelos unicamente um conjunto de quatro preditores com baixa colinearidade (*Variance Inflation Factor*  $\leq 2$ ), uma para cada tipo de stress (a intensificação do uso do solo, a hidrologia, a vegetação ribeirinha e o clima).

Finalmente, utilizando os preditores selecionados na etapa anterior, foram criados os modelos gerais para testar os efeitos aditivos e interativos dos agentes de stress na produção primária seguindo a abordagem de Feld *et al.* (2016). Para testar as hipóteses, foram incluídas duas interações nos modelos gerais: 1) variável do par intensificação do uso do solo x variável representando a alteração da vegetação ribeirinha, e 2) variável do intensificação do uso do solo x variável hidrológica.

Para cada campanha, começou-se com a criação de um modelo geral aditivo sem interações (mod1) em que foram incluídas todas as variáveis ambientais selecionadas para cada categoria na etapa anterior; e depois dois modelos com interações em que se mantiveram todas as variáveis preditivas selecionadas do modelo geral, mais uma interação a analisar: no segundo modelo (mod2) adicionou-se a interação da variável representativa da intensificação do uso do solo com a variável representativa da vegetação ribeirinha; e no terceiro modelo (mod3) adicionou-se a interação da mesma variável da intensificação do uso do solo com a variável representativa da hidrologia (Tabela 2). Os modelos foram ordenados em relação aos valores do critério de informação de Akaike para amostras pequenas (AICc), onde um menor AICc corresponde ao modelo com uma maior capacidade explicativa (Burnham & Anderson, 2002). Para cada campanha, selecionou-se o melhor modelo (o modelo com um AICc menor) para o análise final.

**Tabela 2.** Descrição dos modelos de estudos criados para a campanha de inverno e de verão, na análise das interações das variáveis e o seu efeito na resposta da produção primária.

Modelo	Variável da intensificação do uso do solo	Variável hidrológica	Variável vegetação ribeirinha	Clima	Interação da intensificação do uso do solo x vegetação ribeirinha	Interação da intensificação do uso do solo x hidrologia
mod1	x	x	x	x		
mod2	x	x	x	x	x	
mod3	x	x	x	x		x

Finalmente, para o cálculo dos coeficientes dos agentes de stress e das suas interações, foi adotada uma abordagem *multimodel inference* (Burnham *et al.*, 2010), usando a função *dredge()* do pacote *MuMIn* (Bartoń, 2020). Esta abordagem testa todas as combinações possíveis de variáveis preditivas dum modelo geral e ordena todos os modelos resultantes em relação aos seus valores de AICc

e dos seus Akaike *weights* (probabilidade de ser o melhor modelo). Para fazer a inferência dos efeitos dos agentes de stress e das duas combinações, foram selecionados os modelos com  $\Delta AICc \leq 4$ .

Destes modelos, foram quantificados os coeficientes de regressão, suporte estatístico e a importância dos preditores selecionados. Os coeficientes de regressão servem para ajudar a perceber, em caso de modelos com interação, o tipo de interação em estudo: coeficientes individuais dos agentes de stress com o mesmo sinal, mas um coeficiente de interação deste agentes de stress com sinal oposto, a interação provavelmente é antagonista. Caso todos os coeficientes individuais dos agentes de stress e da sua interação tenham o mesmo sinal, a interação é sinérgica. Para conhecer a importância individual de cada preditor e das interações, analisou-se a partição da variância dos modelos selecionados no *multimodel inference* (pacote *variancePartition*). Para isto, foi calculada a média da variância explicada de cada preditor ponderada pelos Akaike *weights*. Finalmente, foram criados os gráficos com a resposta da produção primária a dos fatores de stress mais importantes separadamente para as duas campanhas. Estes gráficos permitem visualizar os efeitos combinados dos fatores de stress mais importantes, através da previsão conjunta dos modelos selecionados no *multimodel inference* (previsão média dos modelos selecionados ponderada pelos Akaike *weights*).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Variáveis ambientais**

Na análise das variáveis ambientais foram observados individualmente para cada variável o seu valor máximo, mínimo e médio, que são indicadores da presença de um gradiente nos diferentes rios (Tabela 3).

Comparando as variáveis no verão e no inverno, observamos que no verão os valores médios e máximos da variável luz apresentavam valores mais elevados do que no inverno, tal como a temperatura; no inverno as variáveis hidrológicas como a velocidade da corrente, a profundidade e o caudal apresentavam os valores mais elevados do que no verão e uma gama de valores máximos e mínimos mais ampla. Os valores de QBR, sombra e uso do solo antropogénico só foram recolhidos na campanha de inverno de 2019, assumindo assim os mesmo valores para a campanha de verão de 2020.

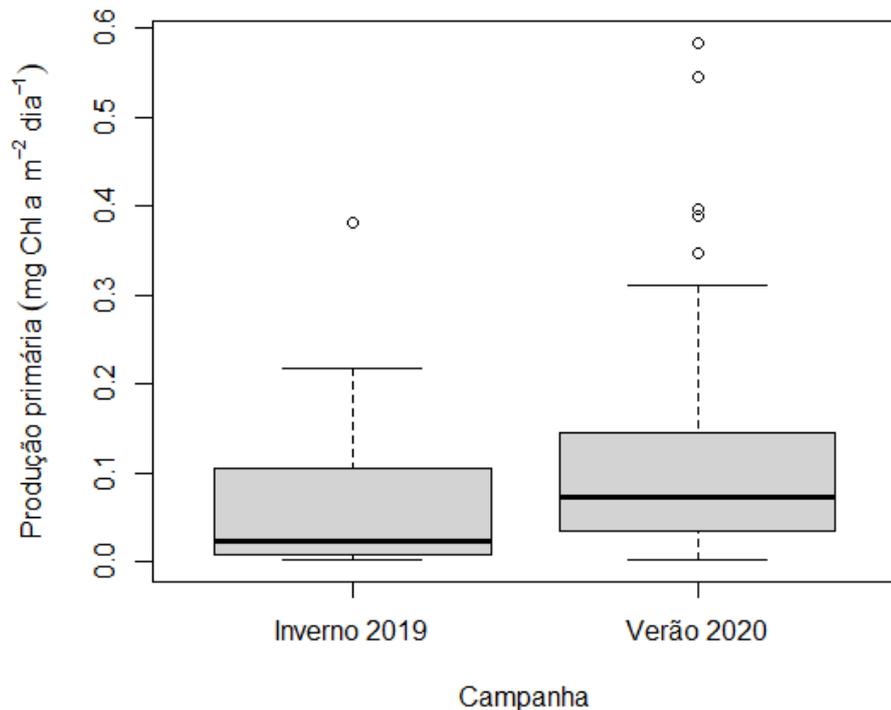
**Tabela 3.** Valores médios (mínimo-máximo) obtidos para as variáveis ambientais em cada campanha: inverno de 2019 e verão de 2020.

Variáveis ambientais	Média (mínimo – máximo)	
	Inverno	Verão
QBR	55 (0 – 95)	55 (0 – 95)
Sombra (%)	47 (0 – 100)	47 (0 – 100)
Luz (lux m <sup>2</sup> )	4,54 (0,00 – 24,13)	31,83 (0,50 – 393,50)
Temperatura (°C)	12,4 (8,7 – 16,2)	18,2 (13,5 – 25,7)
Azoto inorgânico dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	1,08 (0,12 – 5,75)	1,12 (0,03 – 4,69)
Ortofosfato (P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	0,09 (0,01 – 0,85)	0,32 (0,00 – 2,82)
Uso do solo antropogénico (%)	51 (0 – 100)	51 (0 – 100)
Profundidade (cm)	43,90 (3,60 – 116,40)	22,55 (2,20 – 63,80)
Velocidade da corrente (m s <sup>-1</sup> )	0,58 (0,11 – 1,84)	0,12 (0,01 – 0,32)
Caudal (m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )	2,05 (0,01 – 17,67)	0,17 (0,00 – 1,73)

### 3.2. Taxa de produção primária

Analisando a taxa de cada campanha, observamos uma taxa de produção primária significativamente maior no verão do que aquela registada no inverno (*teste t*,  $p = 0,0038$ ; diferença: 0,122 - 0,057 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) (Figura 5).

Na campanha de inverno, o valor médio de produção primária foi de 0,057 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup> apresentando um valor máximo de 0,381 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup> na ribeira dos Rodilhões, localizado na bacia hidrográfica do Cávado, onde a taxa foi considerável maior do que em qualquer outro rio no inverno. No verão, encontramos uma taxa média de 0,122 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>, que corresponde a um aumento de 214% em relação ao valor médio registado no inverno, e com vários rios com valores bastante superiores ao valor médio, como é o caso do rio Veiga (0,584 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>), rio Este (0,546 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>), rio Selho (0,396 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) e rio Vizela (0,389 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) pertencentes à bacia hidrográfica do Ave; e ribeira dos Rodilhões (0,347 mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) pertencente à bacia hidrográfica do Cávado.



**Figura 5.** Boxplot dos valores médios, máximos e *outliers* da taxa de produção primária ( $\text{mg Chl } a \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ) do perifiton em cada campanha (inverno 2019,  $n=50$  e verão 2020,  $n=50$ ).

### 3.3. Importância das variáveis ambientais para explicar os padrões de produção primária

Os resultados das correlações de Pearson entre as variáveis ambientais selecionadas e as taxa de produção primária para cada campanha, inverno e verão, (Tabela 4) mostraram que, de um modo geral, as variáveis ambientais tem uma maior capacidade preditiva no verão do que no inverno. Analisando cada campanha individualmente, percebemos que no verão as variáveis mais importantes foram a concentração de azoto inorgânico dissolvido, a temperatura; e as variáveis hidrológicas velocidade da corrente e caudal. Para o inverno, as variáveis mais relevantes foram o uso do solo antropogénico, a luz e as mesmas variáveis hidrológicas do que no verão, ou seja, a velocidade da corrente e o caudal.

**Tabela 4.** Coeficientes das correlações de Pearson entre as variáveis ambientais e a taxa de produção primária do perifiton em cada campanha (inverno de 2019 e verão de 2020). A *negrito* assinalam-se as correlações significativas ( $p < 0,05$ ).

Variáveis ambientais	Coeficiente de correlação de Pearson	
	Inverno	Verão
QBR	-0,128	-0,258
Sombra	-0,061	-0,267
Luz	0,221	-0,006
Temperatura	0,183	<b>0,447</b>
Azoto inorgânico dissolvido	0,121	<b>0,571</b>
Ortofosfato (P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	-0,123	0,177
Uso do solo antropogénico	<b>0,347</b>	<b>0,411</b>
Profundidade	0,225	0,261
Velocidade da corrente	<b>0,301</b>	<b>0,409</b>
Caudal	<b>0,327</b>	<b>0,470</b>

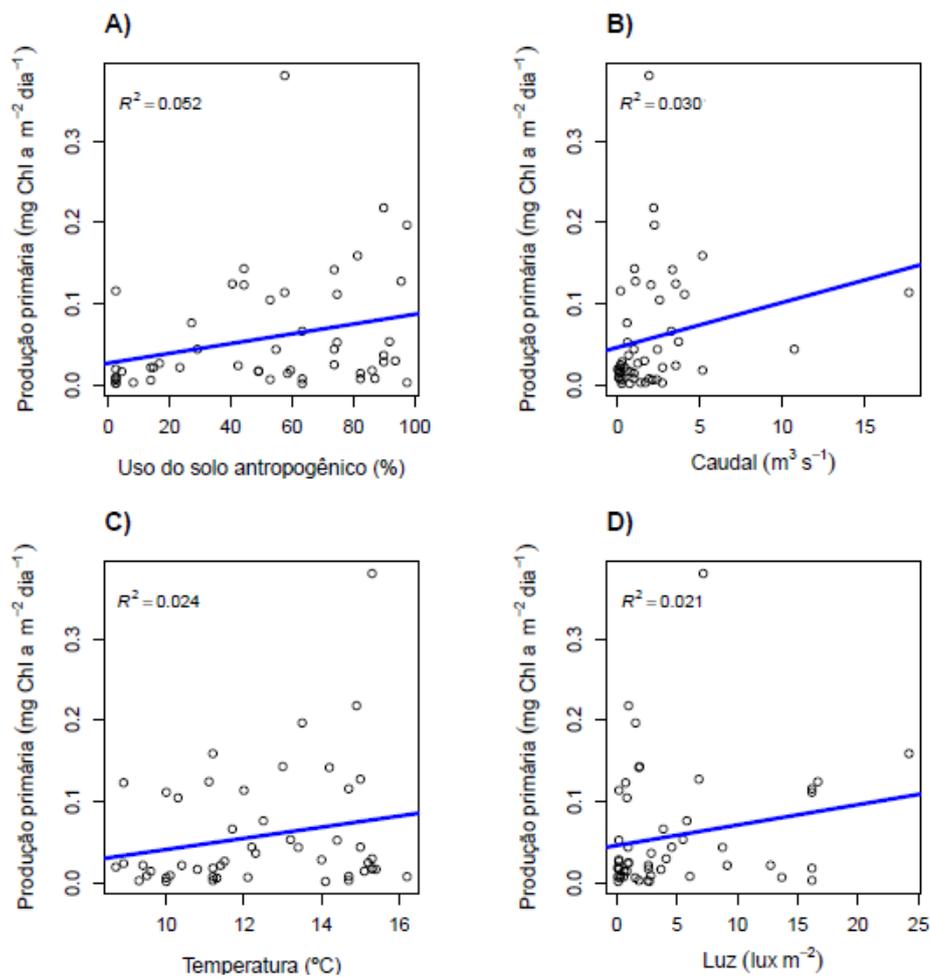
Nas duas campanhas, as variáveis relacionadas com a intensificação do uso do solo (azoto inorgânico dissolvido e a percentagem do uso do solo antropogénico), e a hidrologia (velocidade da corrente e caudal) foram as que mais se correlacionaram com a taxa de produção primária. É interessante reparar que a luz foi uma variável correlacionada positivamente com a taxa de produção primária na campanha de inverno, o que não aconteceu na campanha de verão. Por outro lado, a temperatura foi uma das variáveis com uma correlação mais alta com a taxa de produção primária no verão, o que não se verificou no inverno.

Tendo em conta estes resultados, para os modelos finais, foi selecionada uma variável por categoria de stress e para cada campanha. Foram escolhidas as variáveis mais correlacionadas e significativas de cada campanha (Tabela 5).

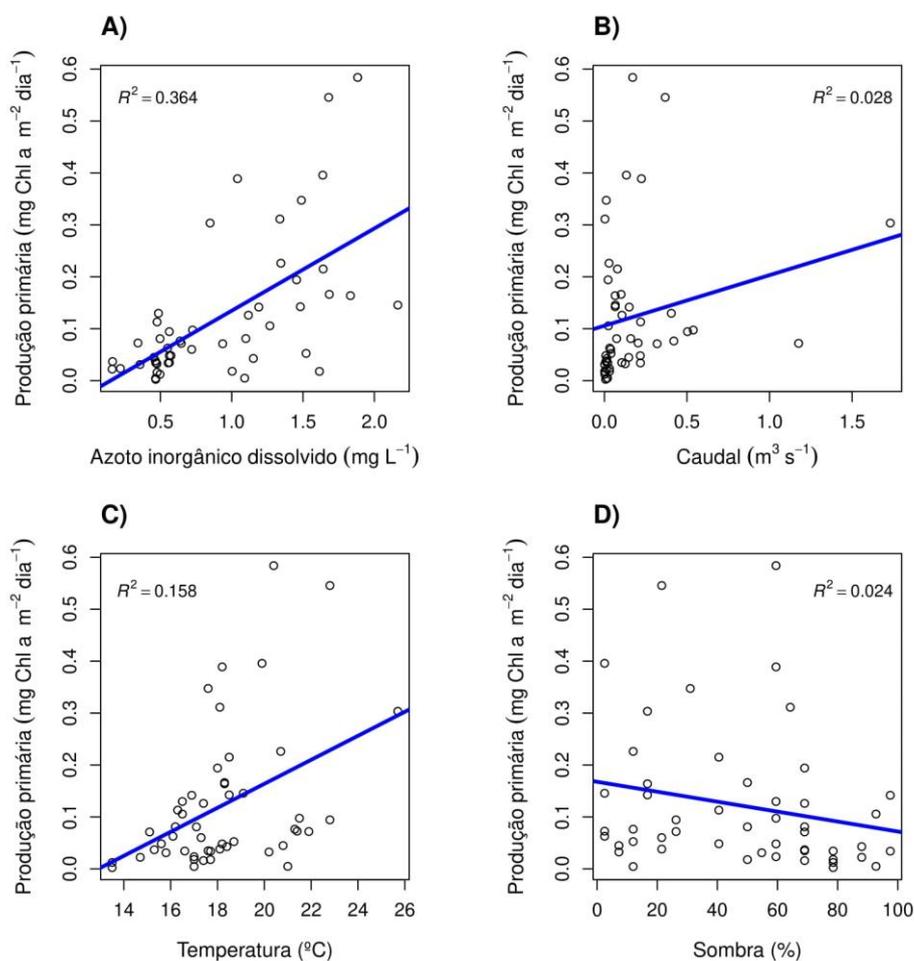
**Tabela 5.** Variáveis finais preditoras selecionadas para cada categoria de stress: intensificação do uso do solo, hidrologia, vegetação ribeirinha e clima, nas campanhas de inverno e de verão.

	Inverno	Verão
Intensificação do uso do solo	Uso do solo antropogénico	Azoto inorgânico dissolvido
Hidrologia	Caudal	Caudal
Vegetação ribeirinha	Luz	Sombra
Clima	Temperatura	Temperatura

As Figuras 6 e 7 mostram as relações entre as variáveis ambientais selecionadas e as taxas de produção no inverno e no verão, respectivamente. No inverno, verificou-se uma relação linear positiva e significativa entre a produção primária e o uso do solo antropogênico, o caudal, a temperatura e a luz (Figura 6). Quanto ao Verão, a produção primária mostrou uma relação linear positiva e significativa com o azoto inorgânico dissolvido, o caudal e a temperatura (Figura 7). As correlações da produção primária com a variável azoto inorgânico dissolvido e o caudal, são mais fortes do que as correlações encontradas no inverno.



**Figura 6.** Modelos de regressão linear entre a taxa de produção primária do perifiton (mg Chl a m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) e cada variável ambiental selecionada na campanha do inverno de 2019: A) Uso do solo antropogênico (%); B) Caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); C) Temperatura (°C); D) Luz (lux m<sup>-2</sup>).



**Figura 7.** Modelos de regressão linear entre a taxa de produção primária do perifiton (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) e cada variável ambiental selecionada na campanha do verão de 2020: A) Azoto inorgânico total (mg L<sup>-1</sup>); B) Caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); C) Temperatura (°C); D) Sombra (%).

### 3.4. Efeitos combinados dos fatores de stress na produção primária

#### 3.4.1. Campanha de inverno (2019)

Os preditores do modelo geral (mod1) são a percentagem do uso do solo antropogénico, a luz, o caudal e a temperatura. O segundo modelo (mod2) inclui os preditores do mod1 e a interação entre o uso do solo antropogénico e a entrada de luz; e o terceiro modelo (mod3) inclui os preditores do mod1 mais a interação entre o uso do solo antropogénico e o caudal.

Destes modelos, o modelo que apresentou uma maior capacidade preditiva (menor AICc) foi o mod3, que corresponde ao modelo onde foi incluída a interação do uso do solo antropogénico com o caudal (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valor do critério de informação (*AICc*) dos modelos com e sem interações para prever os padrões da produção primária para a campanha de inverno. A *negrito* encontra-se o melhor modelo (menor *AICc*).

Modelo	Uso do solo antropogénico	Caudal	Luz	Temperatura	Uso solo antropogénico x Luz	Uso do solo antropogénico x Caudal	AICc
mod1	x	x	x	x			176,9
mod2	x	x	x	x	x		179,5
mod3	x	x	x	x		x	<b>175,4</b>

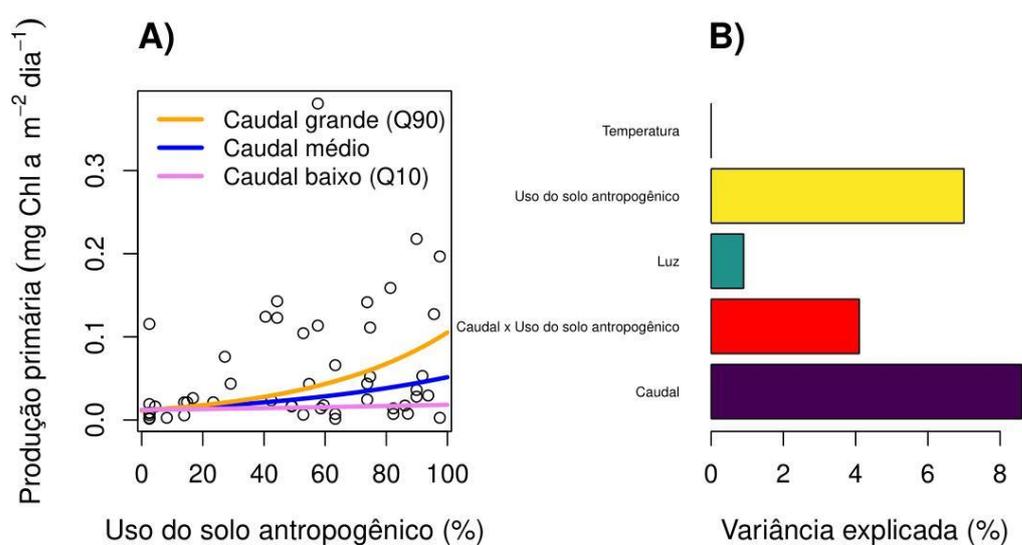
Das combinações de preditores resultantes do mod3, foram encontrados 8 modelos com  $\Delta AICc \leq 4$  (Tabela 7). O primeiro modelo incluiu o caudal, o uso do solo antropogénico e a interação do uso do solo antropogénico com o caudal. O uso do solo antropogénico foi o preditor mais incluído nos modelos, presente em 7 dos 8 modelos (gama de coeficiente: 0,367 – 0,481), seguido do caudal, incluído em 6 dos 8 modelos (gama do coeficiente: 0,235 – 0,501). A luz (gama de coeficientes: 0,144 – 0,307) e a interação do uso do solo antropogénico com o caudal (gama de coeficientes: 0,360 – 0,408) foram incluídos em 3 dos modelos. Todos os preditores tiveram um efeito positivo na produção primária.

Verificámos que existia uma interação sinérgica e positiva na produção primária, onde a influência da percentagem de uso do solo antropogénico na produção primária dependia do nível de caudal (Figura 8A). Em rios de caudal pequeno, a percentagem de uso do solo antropogénico não era um fator importante para aumentar a taxa da produção primária. No entanto, quando o caudal era grande, a percentagem do uso do solo antropogénico tinha uma grande influência na produção primária. Num rio de caudal grande, uma percentagem de uso do solo antropogénico elevada (>60%) corresponde a uma taxa de produção primária elevada.

**Tabela 7.** Modelos relacionando a produção primária com o caudal, luz, uso do solo antropogénico, temperatura (Temp) e a interação uso do solo antropogénico x caudal, e os coeficientes de regressão, *goodness-of-fit* ( $R^2$ ), graus de liberdade (df), valores de AICc,  $\Delta$ AICc e o Akaike weight (*weight*).

Ranking	Intercept	Caudal	Luz	Uso do solo antropogénico	Temp	Uso do solo antropogénico x Caudal	$R^2$	df	AICc	$\Delta$ AICc	<i>weight</i>
1	-3,78	0,50		0,47		0,39	0,24	5	171,0	0,00	0,34
2	-3,77	0,43	0,14	0,48		0,36	0,25	6	173,0	2,00	0,12
3	-3,65		0,31	0,47			0,17	4	173,2	2,20	0,11
4	-3,65	0,33		0,37			0,17	4	173,2	2,25	0,11
5	-3,79	0,54		0,39	0,12	0,41	0,25	6	173,3	2,31	0,11
6	-3,65			0,48			0,12	3	173,7	2,70	0,09
7	-3,65	0,24	0,22	0,39			0,19	5	174,3	3,35	0,06
8	-3,65	0,45					0,11	3	174,4	3,44	0,06

Os modelos selecionados explicaram em média 20,6% da variação da resposta da produção primária. O caudal foi a variável com maior capacidade preditiva (8,6%), seguida do uso do solo antropogénico (7,0%). A luz teve uma capacidade explicativa pequena (0,9%), tal como a temperatura (0,0%). A interação uso do solo antropogénico x caudal explicou 4,1% da variância (Figura 8B).



**Figura 8.** A) Resposta da produção primária (mg Chl *a* m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) contra as combinações da percentagem do uso do solo antropogénico diferentes caudais (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); B) Variância média explicada pelos fatores de stress dos melhores modelos ( $\Delta$ AICc $\leq$ 4): temperatura (°C), uso do solo antropogénico (%), luz (lux m<sup>-2</sup>), caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), e a interação do caudal x uso do solo antropogénico.

### 3.4.2. Campanha de verão (2020)

Tal como para a campanha de inverno, no verão selecionamos um modelo geral sem interações (mod1) composto por todas os preditores selecionadas para o verão apresentadas na tabela 5. O segundo modelo (mod2) inclui todas os preditores do mod1 mais a interação do azoto inorgânico dissolvido e a sombra; e o terceiro modelo (mod3) também inclui todas os preditores do mod1 mais a interação do azoto inorgânico dissolvido e o caudal. No verão, nenhum modelo de interação foi melhor do que o modelo geral (AICc 140.9), por isso, o modelo selecionado foi o mod1 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valor do critério de informação (AICc) dos modelos com e sem interações para prever os padrões da produção primária para a campanha de verão. A *negrito* encontra-se o melhor modelo (menor AICc).

Modelo	Azoto inorgânico dissolvido	Caudal	Sombra	Temperatura	Azoto inorgânico dissolvido x Sombra	Azoto inorgânico dissolvido x Caudal	AICc
mod1	x	x	x	x			<b>140,9</b>
mod2	x	x	x	x	x		142,8
mod3	x	x	x	x		x	141,6

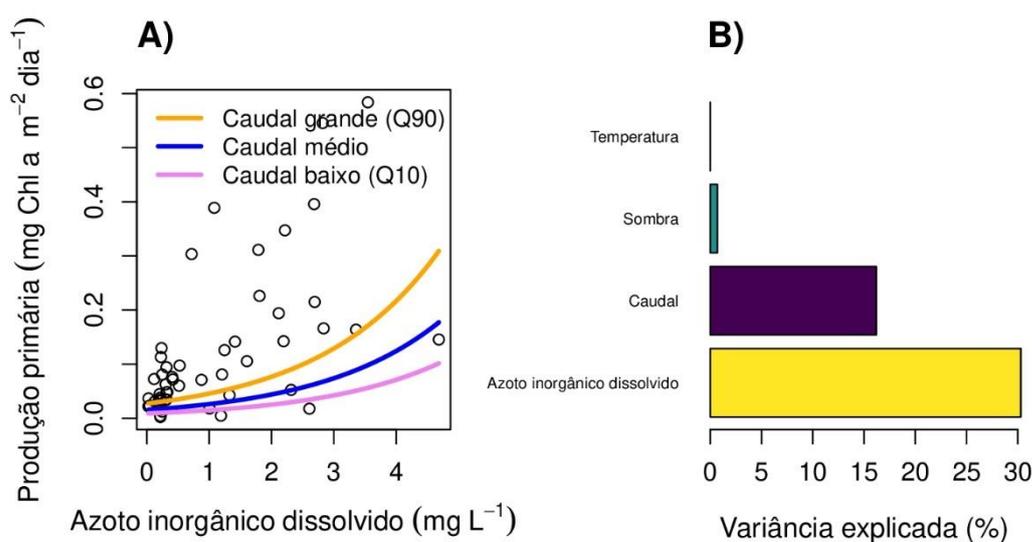
Das combinações de preditores resultantes do mod3, foram encontrados 4 modelos com  $\Delta AICc \leq 4$  (Tabela 9). O primeiro modelo incluiu o azoto inorgânico dissolvido e o caudal como preditores. O azoto inorgânico dissolvido e o caudal foram os preditores mais incluídos nos modelos e estavam presentes em todos os modelos e com uma correlação positiva com a produção primária (gama dos coeficientes: 0,589 – 0,602 e 0,450 – 0,491, respetivamente). Por outro lado, a sombra (coeficientes: -0,164 e -0,167) estava presente em 2 dos 4 modelos, e apresentava uma correlação negativa com a produção primária. A temperatura (coeficientes: 0,072 e -0,009), também presente em 2 dos 4 modelos, teve correlações positivas e negativas com a produção primária. Através do gráfico observamos que os efeitos na produção primária eram aditivos e positivos (Figura 9A). O azoto inorgânico dissolvido teve um efeito positivo na produção primária, no entanto, este efeito também estava dependente dos diferentes níveis de caudal: rios com menor caudal apresentam menor produção primária, e rios com maior caudal apresentam maior produção primária à medida que aumenta a concentração de azoto inorgânico dissolvido. Apesar de haver uma grande concentração de azoto inorgânico dissolvido, a produção primária não era tão elevada quando o caudal era baixo relativamente a quando o caudal era grande.

Em ambos os caudais, verificou-se um aumento crescente na taxa de produção primária quando a concentração de azoto inorgânico dissolvido era superior a 2.5 mg L<sup>-1</sup>. Percebemos então que a maior taxa de produção primária estava presente em rios de caudal grande e com elevadas concentrações de azoto inorgânico dissolvido.

**Tabela 9.** Modelos relacionando a produção primária com o azoto inorgânico dissolvido, caudal, sombra e temperatura (Temp), e os coeficientes de regressão, *goodness-of-fit* (R<sup>2</sup>), graus de liberdade (df), valores de AICc, ΔAICc, e o peso dos modelos (*weight*).

Ranking	Azoto					R <sup>2</sup>	df	AICc	ΔAICc	<i>weight</i>
	Intercept	inorgânico dissolvido	Caudal	Sombra	Temp					
1	-2,69	0,60	0,49			0,24	4	137,5	0,00	0,46
2	-2,69	0,59	0,46	-0,16		0,25	5	138,3	0,81	0,31
3	-2,69	0,59	0,45		0,07	0,17	5	139,8	2,28	0,17
4	-2,69	0,59	0,46	-0,17	-0,01	0,17	6	140,9	3,40	0,08

Os modelos selecionados explicaram em média 47,2% da variação da resposta da produção primária. O preditor com maior capacidade preditiva foi o azoto inorgânico dissolvido (30,3%), seguido pelo caudal (16,2%). Tal como no inverno, a temperatura não foi uma variável importante (0,0%), e a sombra apresentou um valor muito baixo (0,7%) (Figura 9B).



**Figura 9.** A) Resposta da produção primária (mg Chl a m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>) contra as combinações das duas melhores variáveis do modelo: azoto inorgânico dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e diferentes caudais (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); B) Variância média explicada pelos fatores de stress dos melhores modelos (ΔAICc≤4): azoto inorgânico dissolvido (mg L<sup>-1</sup>), caudal (m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), sombra (%) e temperatura (°C).

#### 4. Discussão

Este estudo demonstra que a produção primária conduzida pelo perifíton tem sido alterada principalmente por fatores provenientes da intensificação agrícola, pecuária e urbana, que resultaram em maiores concentrações de nutrientes, e também por alterações do caudal. Percebemos que a combinação destes agentes de stress foi capaz de explicar melhor as alterações que ocorrem na produção primária do que as suas respostas individuais. Estes agentes de stress em combinação tiveram um efeito aditivo no verão, e um efeito sinérgico no inverno. Porém, a proposta de interação da luz com os nutrientes não foi capaz de explicar a resposta da produção primária em nenhuma das campanhas deste estudo.

As taxas de produção primária encontradas no verão eram consideravelmente maiores do que no inverno. Era esperada sazonalidade do perifíton uma vez que já foi demonstrada a existência de um menor crescimento de biomassa das algas no inverno (Murdock *et al.*, 2004; Rosemond *et al.*, 2000). A diminuição da temperatura característica do inverno, provoca períodos de dormência na comunidade do perifíton, tornando uma parte da comunidade metabolicamente inativa, que volta a ser ativada com o aumento da temperatura na primavera (DeNicola, 1996; Elliott, 2010). A luz também foi um fator importante uma vez que existem diferenças nos valores de luz registados nas diferentes campanhas (Tabela 3), demonstrando que aumentos de luz no verão resulta em aumento de biomassa maior comparativamente a outra estação, também pelo concomitante aumento de temperatura. As diferenças encontradas na sazonalidade também podem ser explicadas pelos nutrientes (Francoeur *et al.*, 1999), uma vez que o verão é considerada a estação de crescimento do perifíton, e este pareceu responder de maneira mais significativa à presença de nutrientes nesta campanha comparativamente ao inverno.

Os valores de taxa de produção primária mais altos que foram registados em ambas as campanhas analisadas inserem-se nas bacias hidrográficas do rio Ave e do rio Cávado, e pertencem a rios com grande influência humana e agrícola. Por exemplo, a ribeira de Rodilhões tem grande influência agrícola e o rio Este é um rio muito alterado pelo impacto da poluição doméstica e industrial junto à cidade de Braga. Estas bacias hidrográficas apresentam grande densidade populacional, agrícola e industrial, que agem como fontes de poluição nos rios, aumentando a presença de nutrientes azotados nas águas dos rios e levando muitas vezes ao aumento da biomassa das algas (McDowell *et al.*, 2020). O aumento da concentração de azoto nos rios em locais onde estes se encontram limitantes (Elser *et al.*, 2007) induzem o crescimento das algas ao nível local (O'Brien & Wehr 2010, McDowell *et al.*, 2020).

No nosso estudo, a tendência do aumento da taxa de produção primária em rios com elevada percentagem de uso do solo antropogénico, e em rios com valores elevados de azoto inorgânico dissolvido, demonstra a importância destes nutrientes no ecossistema para o perifíton induzir uma resposta de crescimento, apoiando a nossa hipótese. Na campanha de verão, a resposta das variáveis do azoto inorgânico dissolvido e do ortofosfato eram mais elevadas comparativamente ao inverno, o que pode ser explicado pela aplicação de fertilizantes, ricos em azoto e fosfato, na primavera – verão, e que acabam por entrar no ecossistema ribeirinho (Exner-Kittridge *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012).

No nosso trabalho foi observada uma tendência crescente da produção primária com o aumento do caudal. Esperávamos esta tendência crescente para caudais médios, o que se confirmou, mas uma tendência decrescente a partir de caudais elevados pela abrasão das algas bentónicas devido à forte velocidade da corrente e ao transporte de sedimentos na coluna de água (Francoeur & Biggs, 2006), o que não se confirmou. Os valores de caudal registados neste estudo apresentaram um valor médio de  $2,05 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  para o inverno e de  $0,17 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  para o verão. Associado ao caudal temos também a velocidade da corrente onde no inverno os valores eram mais elevados (gama de  $0,11\text{-}1,84 \text{ m s}^{-1}$ ) comparativamente ao verão (gama de  $0,01\text{-}0,32 \text{ m s}^{-1}$ ) (Tabela 3). No verão, a velocidade da corrente era relativamente baixa ( $<0,3 \text{ m s}^{-1}$ ), pelo que não ocorria abrasão (Biggs, 1996), demonstrando-se unicamente o efeito positivo da velocidade da corrente no aumento da biomassa pela facilidade na renovação de nutrientes (Pacheco *et al.*, 2022). No inverno, o aumento do caudal parece alterar a composição em espécies de perifíton e favorecer a colonização de algumas espécies de diatomáceas de crescimento mais rápido (Biggs *et al.*, 1998).

A luz e a temperatura também demonstraram ser importantes na resposta da produção de biomassa. Existe uma tendência para o aumento da taxa de produção primária com o aumento da temperatura e da luz incidente no rio. Por consequência, no nosso estudo, verificou-se uma diminuição da produção primária com o aumento da percentagem de sombra presente na zona ribeirinha. A luz pode ser um fator limitante em rios florestados, pelo que o aumento da incidência de luz, leva ao aumento da taxa de produção primária (Cibils-Martina *et al.*, 2017). É importante notar que, no nosso estudo, o aumento da produção primária com o aumento da temperatura foi mais acentuado no verão comparativamente ao inverno, e isto pode ser explicado pelas temperaturas registadas no verão serem as temperaturas ótimas para o crescimento máximo do perifíton ( $15\text{-}30^\circ\text{C}$ ) (Piggott, Niyogi, *et al.*, 2015). Também pode ser explicado por um efeito indireto em que o aumento de decomposição de matéria

orgânica aumenta com o aumento da temperaturas, o que leva ao concomitante aumento da concentração de nutrientes inorgânicos nos rios (Schneider, 2015).

Neste estudo foi possível confirmar com dados *in situ* provenientes de uma extensa campanha de amostragem em rios do noroeste de Portugal que a produção primária está dependente de vários fatores abióticos e de vários agentes de stress, mas que apenas a interação do caudal com os nutrientes se revelou significativa.

Não encontramos suporte nos nossos resultados à resposta da produção primária à interação da luz com os nutrientes. Era esperada uma interação sinérgica, ou seja, um aumento acentuado da taxa de produção primária, uma vez que em rios onde a luz é um fator limitante pela presença da vegetação ribeirinha, os nutrientes também são geralmente fatores limitantes, pelo que um aumento da concentração de nutrientes e da disponibilidade de luz que incide sobre o rio, deveria resultar num aumento significativo da biomassa do perifiton (Hill *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2022; Ylla *et al.*, 2007). Nenhum dos nossos modelos se tornou mais explicativo com a adição desta interação em nenhuma das campanhas em estudo. É importante notar que nos modelos finais selecionados, a luz não explicava muita da variância. Isto pode ter acontecido porque provavelmente nenhuma dessas duas variáveis era muito limitante nos nossos rios. No estudo de McCall *et al.* (2017), o perifiton só era limitado pela luz e nutrientes quando estes se encontravam em valores baixos (<0.003 mg/L), o que geralmente não aconteceu nos nossos rios em nenhuma das campanhas. Apesar da luz ser um fator importante, e levar ao aumento da taxa de produção primária, outros fatores poderão influenciar e sobrepor-se ao efeito da luz (Allan & Castillo, 2007). Estas interações não foram explicativas das alterações que ocorrem na taxa de produção primária dos nossos rios.

Contudo, no nosso estudo, foi demonstrado que o impacto do aumento dos nutrientes no ecossistema ribeirinho estava relacionado com o caudal, apesar de apresentarem respostas diferentes quando combinadas em diferentes intensidades de cada fator. Para além disso, a resposta da produção primária a estas combinações de variáveis acabou por ser diferente nas duas campanhas de estudo: no inverno, encontramos uma interação sinérgica positiva, e no verão a combinação destas duas variáveis resultou numa resposta aditiva. Vários estudos já demonstraram que com o par caudal - nutrientes obtiveram uma resposta antagonista (Bækkelie *et al.*, 2017; Segurado *et al.*, 2018), sendo que produção primária aumentou com aumento do caudal e dos nutrientes, mas o seu aumento foi inferior ao aumento esperado com base nos efeitos individuais. Outros estudos suportam os nossos resultados de que a

maior parte dos efeitos da combinação de agentes de stress resulta em interações não significativas, sugerindo, que os efeitos são maioritariamente aditivos (Burgess *et al.*, 2021; Romero *et al.*, 2019).

No inverno, a resposta da produção primária foi muito dependente do caudal. Locais com grande impacto antropogénico e, por consequência, com grandes entradas de nutrientes e contaminantes nos rios, que apresentavam caudais baixos, não levaram a uma maior resposta da produção primária, resultando numa resposta semelhante à de um local sem qualquer percentagem de uso do solo antropogénico. Contudo, num rio de caudal grande, a resposta da produção primária aumentou em locais com influência antropogénica, resultando numa resposta maior do que o esperado. O efeito sinérgico da produção primária ocorre quando a presença de um agente de stress facilita a utilização de outro agente pelo perífiton. No inverno, a presença de um caudal grande parece facilitar a utilização dos nutrientes pelo perífiton. Com velocidades da corrente elevadas pode haver um maior contributo de espécies de diatomáceas com crescimento rápido, sendo estas capazes de converter grandes concentrações de nutrientes inorgânicos em biomassa, sendo, por isso favorecidas, pelo aumento de nutrientes neste regime hidrológico (Hill *et al.*, 2011).

No verão, o aumento da concentração de nutriente juntamente com o aumento de caudal, resultou numa taxa de produção mais elevada. O efeito aditivo do caudal e da concentração de nutrientes, observado no verão, provém da intensificação da agricultura que contribui para levar nutrientes para os rios nesta estação do ano durante os períodos de irrigação agrícola (Herrero *et al.*, 2018), e o aumento do caudal, que geralmente se encontra mais pequeno comparativamente ao inverno, pode favorecer ainda mais a renovação dos nutrientes.

Conseguimos concluir em ambas as campanhas que um aumento da concentração de nutrientes em ecossistema de rios com caudal grande levam a uma resposta positiva na produção de biomassa pelo perífiton. A relação de nutrientes e o caudal nos rios encontra-se bem estabelecidas, pois a presença de um fator influencia o efeito do outro, visto que a renovação dos nutrientes é garantida pelo caudal e pela corrente que os transporta (Biggs & Close, 1989).

## **5. Considerações finais**

Concluimos com este estudo que um aumento do caudal dos rios, em locais com grande atividade humana, levou a um aumento da produção primária e da biomassa do perífiton nos rios

estudados. Nos casos mais extremos, este processo poderia causar a eutrofização dos rios expostos a concentrações altas de nutrientes e a grandes caudais. Assim, o controlo do perifíton é relevante pois a eutrofização conduz a degradação da qualidade da água e do próprio ecossistema aquático, alterando o funcionamento das cadeias alimentares. Logo, é importante perceber que fatores afetam o perifíton e como é que esses fatores interagem. A combinação e a interação de múltiplos agentes de stress no ecossistema podem ser responsáveis pelo degradado em que se encontram muitos rios. A presença de uma interação sinérgica neste estudo demonstrou a importância de implementar medidas de ação, uma vez que estas têm o potencial de causar um efeito severo nas comunidades do perifíton durante o inverno (Brown *et al.*, 2013).

Com as previsíveis alterações climáticas, a hidrologia dos rios vai ser modificada (Arnell & Gosling, 2016), e poderá vir a acentuar o efeito dos nutrientes nos ecossistemas. Segundo os nossos resultados, mudanças na precipitação, e consequentemente no caudal, terão consequências várias: o aumento da precipitação média no inverno terá um efeito maior na taxa de produção primária em locais de grande concentração de nutrientes pelo maior escoamento destes para o rio (Soares *et al.*, 2015). E no verão uma menor precipitação média, mas com períodos mais intensos de precipitação, aumentarão o caudal que se encontra mais limitado no verão, e leva a um aumento da taxa de produção primária.

O enriquecimento do ecossistema aquático em nutrientes foi um fator que demonstrou ter um grande impacto na produção primária pelo perifíton, pelo que deverá haver um esforço para limitar a entrada destes nutrientes na água. Isto pode ser conseguido através da implementação de boas práticas no uso de fertilizantes agrícolas, com ações de diminuição e controlo de poluição nos rios, e com a implementação de medidas de conservação da zona ribeirinha que funciona como um tampão e que ajuda a reter azoto antropogénico e outros contaminantes. Este estudo sugere a inclusão do caudal, da intensificação do uso do solo e dos nutrientes dissolvidos na água para prever e controlar a eutrofização dos rios tendo em conta os todos benefícios que estes ecossistemas providenciam à humanidade.

## 6. Referências

- Ahn, M., Yoon, B., & Ji, U. (2019). Uncertainty Analysis for Mean Flow Velocity and Discharge Measurements using Floats based on Large-Scale Experiments. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 23(8), 3364–3371. <https://doi.org/10.1007/s12205-019-2002-1>
- Allan, J. D., & Castillo, M. M. (2007). Primary producers. In *Stream Ecology: Structure and function of running waters* (pp. 105–134). Springer.
- Alves, C. M., Boaventura, R. R. A. R., & Soares, H. M. V. M. (2009). Evaluation of Heavy Metals Pollution Loadings in the Sediments of the Ave River Basin (Portugal). *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 18(5), 603–618. <https://doi.org/10.1080/15320380903113568>
- Arnell, N. W., & Gosling, S. N. (2016). The impacts of climate change on river flood risk at the global scale. *Climatic Change*, 134(3), 387–401. <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1084-5>
- Aufdenkampe, A. K., Mayorga, E., Raymond, P. A., Melack, J. M., Doney, S. C., Alin, S. R., Aalto, R. E., & Yoo, K. (2011). Riverine coupling of biogeochemical cycles between land, oceans, and atmosphere. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9(1), 53–60. <https://doi.org/10.1890/100014>
- Bækkelië, K. A. E., Schneider, S. C., Hagman, C. H. C., & Petrin, Z. (2017). Effects of flow events and nutrient addition on stream periphyton and macroinvertebrates: an experimental study using flumes. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 418, 47. <https://doi.org/10.1051/kmae/2017041>
- Bartoń, K. (2020). MuMIn: Multimodel Inference. R-Packages. <https://cran.r-project.org/web/packages/MuMIn/index.html>
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Battin, T. J., Luysaert, S., Kaplan, L. A., Aufdenkampe, A. K., Richter, A., & Tranvik, L. J. (2009). The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*, 2(9), 598–600. <https://doi.org/10.1038/ngeo618>
- Beck, W. S., Rugenski, A. T., & Poff, N. L. (2017). Influence of experimental, environmental, and geographic factors on nutrient-diffusing substrate experiments in running waters. *Freshwater Biology*, 62(10), 1667–1680. <https://doi.org/10.1111/fwb.12989>
- Biggs, B. J. F. (1996). Patterns in Benthic Algae of Streams. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystem* (pp. 31–56). Academic Press.

- Biggs, B. J. F., & Close, M. E. (1989). Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biology*, 22(2), 209–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1989.tb01096.x>
- Biggs, B. J. F., Stevenson, R. J., & Lowe, R. L. (1998). A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Fundamental and Applied Limnology*, 143(1), 21–56. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/143/1998/21>
- Birk, S., Chapman, D., Carvalho, L., Spears, B. M., Andersen, H. E., Argillier, C., Auer, S., Baattrup-Pedersen, A., Banin, L., Beklioglu, M., Bondar-Kunze, E., Borja, A., Branco, P., Bucak, T., Buijse, A. D., Cardoso, A. C., Couture, R.-M., Cremona, F., de Zwart, D., & Feld, C. K. (2020). Impacts of multiple stressors on freshwater biota across spatial scales and ecosystems. *Nature Ecology & Evolution*, 4(8), 1060–1068. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1216-4>
- Bott, T. L. (2006). Primary productivity and community respiration. In *Methods in Stream Ecology* (pp. 263–290). Elsevier.
- Bowes, M. J., Ings, N. L., McCall, S. J., Warwick, A., Barrett, C., Wickham, H. D., Harman, S. A., Armstrong, L. K., Scarlett, P. M., Roberts, C., Lehmann, K., & Singer, A. C. (2012). Nutrient and light limitation of periphyton in the River Thames: Implications for catchment management. *Science of the Total Environment*, 434, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.082>
- Brett, M. T., Bunn, S. E., Chandra, S., Galloway, A. W. E., Guo, F., Kainz, M. J., Kankaala, P., Lau, D. C. P., Moulton, T. P., Power, M. E., Rasmussen, J. B., Taipale, S. J., Thorp, J. H., & Wehr, J. D. (2017). How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshwater Biology*, 62(5), 833–853. <https://doi.org/10.1111/fwb.12909>
- Brook, B., Sodhi, N., & Bradshaw, C. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(8), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.011>
- Brown, C. J., Saunders, M. I., Possingham, H. P., & Richardson, A. J. (2013). Managing for Interactions between Local and Global Stressors of Ecosystems. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065765>
- Bruno, D., Gutiérrez-Cánovas, C., Sánchez-Fernández, D., Velasco, J., & Nilsson, C. (2016). Impacts of environmental filters on functional redundancy in riparian vegetation. *Journal of Applied Ecology*, 53(3), 846–855. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12619>
- Burgess, B. J., Purves, D., Mace, G., & Murrell, D. J. (2021). Classifying ecosystem stressor interactions: Theory highlights the data limitations of the additive null model and the difficulty in revealing ecological surprises. *Global Change Biology*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/gcb.15630>

- Burnham, K. P., & David Raymond Anderson. (2002). *Model selection and multimodel inference : a practical information-theoretic approach*. Springer.
- Burnham, K. P., Anderson, D. R., & Huyvaert, K. P. (2010). AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(1), 23–35. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-1029-6>
- Calapez, A. R., Elias, C. L., Almeida, S. F. P., Brito, A. G., & Feio, M. J. (2019). Sewage contamination under water scarcity effects on stream biota: biofilm, grazers, and their interaction. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(26), 26636–26645. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05876-7>
- Carmichael, J. J. (1996). Impacts of Climate Change and Seasonal Variability on Economic Treatment Costs: A Case Study of the Nitra River Basin, Slovakia. *International Journal of Water Resources Development*, 12(2), 209–228. <https://doi.org/10.1080/07900629650041966>
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8(3), 559–568. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:nposww\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:nposww]2.0.co;2)
- Carta de Uso e Ocupação do Solo. (2018). Direção-Geral Do Território. <https://www.dgterritorio.gov.pt/Carta-de-Uso-e-Ocupacao-do-Solo-para-2018>
- Cibils-Martina, L., Márquez, J., Principe, R., Gari, N., & Albariño, R. (2017). Pine afforestation affects key primary producers in mountain grassland streams in Córdoba, Argentina. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 51(4), 591–607. <https://doi.org/10.1080/00288330.2017.1329746>
- Cox, B. A., & Whitehead, P. G. (2009). Impacts of climate change scenarios on dissolved oxygen in the River Thames, UK. *Hydrology Research*, 40(2-3), 138–152. <https://doi.org/10.2166/nh.2009.096>
- DeNicola, D. M. (1996). Periphyton Responses to Temperature at Different Ecological Levels. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystem* (pp. 150–176). Academic Press.
- Dobriyal, P., Badola, R., Tuboi, C., & Hussain, S. A. (2016). A review of methods for monitoring streamflow for sustainable water resource management. *Applied Water Science*, 7(6), 2617–2628. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0488-y>
- Dodds, W., & Smith, V. (2016). Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Inland Waters*, 6(2), 155–164. <https://doi.org/10.5268/iw-6.2.909>
- Doyle, S. A., Saros, J. E., & Williamson, C. E. (2005). Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1362–1367. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1362>

- Dunck, B., Lima-Fernandes, E., Cássio, F., Cunha, A., Rodrigues, L., & Pascoal, C. (2015). Responses of primary production, leaf litter decomposition and associated communities to stream eutrophication. *Environmental Pollution*, 202, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.014>
- Elliott, J. A. (2010). The seasonal sensitivity of Cyanobacteria and other phytoplankton to changes in flushing rate and water temperature. *Global Change Biology*, 16(2), 864–876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01998.x>
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12), 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>
- Exner-Kittridge, M., Strauss, P., Blöschl, G., Eder, A., Saracevic, E., & Zessner, M. (2016). The seasonal dynamics of the stream sources and input flow paths of water and nitrogen of an Austrian headwater agricultural catchment. *Science of the Total Environment*, 542, 935–945. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.151>
- Feld, C. K., Fernandes, M. R., Ferreira, M. T., Hering, D., Ormerod, S. J., Venohr, M., & Gutiérrez-Cánovas, C. (2018). Evaluating riparian solutions to multiple stressor problems in river ecosystems – A conceptual study. *Water Research*, 139, 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.014>
- Feld, C. K., Segurado, P., & Gutiérrez-Cánovas, C. (2016). Analysing the impact of multiple stressors in aquatic biomonitoring data: A “cookbook” with applications in R. *The Science of the Total Environment*, 573, 1320–1339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.243>
- Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V., & Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography*, 44(3part2), 864–877. [https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3\\_part\\_2.0864](https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0864)
- Francoeur, S. N., & Biggs, B. J. F. (2006). Short-term Effects of Elevated Velocity and Sediment Abrasion on Benthic Algal Communities. *Hydrobiologia*, 561(1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1604-4>
- Francoeur, S. N., Smith, R. A., & Lowe, R. L. (1999). Nutrient Limitation of Algal Biomass Accrual in Streams: Seasonal Patterns and a Comparison of Methods. *Journal of the North American Benthological Society*, 18(2), 242–260. <https://doi.org/10.2307/1468463>
- Gómez, N., Donato, J. C., Giorgi, A., Guasch, H., Mateo, P., & Sabater, S. (2009). La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. In *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (pp. 219–242). Fundación BBVA.

- Gonçalves, E. P. R., Boaventura, R. A. R., & Mouvet, C. (1992). Sediments and aquatic mosses as pollution indicators for heavy metals in the Ave river basin (Portugal). *Science of the Total Environment*, 114, 7–24. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90410-T](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90410-T)
- Gonçalves, E. P. R., Soares, H. M. V. M., Boaventura, R. A. R., Machado, A. A. S. C., & Esteves da Silva, J. C. G. (1994). Seasonal variations of heavy metals in sediments and aquatic mosses from the Cávado river basin (Portugal). *Science of the Total Environment*, 142(3), 143–156. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90322-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90322-0)
- Gregory, S. V., Swanson, F. J., McKee, W. A., & Cummins, K. W. (1991). An Ecosystem Perspective of Riparian Zones. *BioScience*, 41(8), 540–551. <https://doi.org/10.2307/1311607>
- Gudmundsson, L., Boulange, J., Do, H. X., Gosling, S. N., Grillakis, M. G., Koutroulis, A. G., Leonard, M., Liu, J., Müller Schmied, H., Papadimitriou, L., Pokhrel, Y., Seneviratne, S. I., Satoh, Y., Thiery, W., Westra, S., Zhang, X., & Zhao, F. (2021). Globally observed trends in mean and extreme river flow attributed to climate change. *Science*, 371(6534), 1159–1162. <https://doi.org/10.1126/science.aba3996>
- Hall, R. O., Likens, G. E., & Malcom, H. M. (2001). Trophic basis of invertebrate production in 2 streams at the Hubbard Brook Experimental Forest. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(3), 432–447. <https://doi.org/10.2307/1468040>
- Halliday, S. J., Skeffington, R. A., Wade, A. J., Bowes, M. J., Read, D. S., Jarvie, H. P., & Loewenthal, M. (2016). Riparian shading controls instream spring phytoplankton and benthic algal growth. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(6), 677–689. <https://doi.org/10.1039/c6em00179c>
- Heaston, E. D., Kaylor, M. J., & Warren, D. R. (2017). Characterizing short-term light dynamics in forested headwater streams. *Freshwater Science*, 36(2), 259–271. <https://doi.org/10.1086/691540>
- Heathwaite, A. L. (2010). Multiple stressors on water availability at global to catchment scales: understanding human impact on nutrient cycles to protect water quality and water availability in the long term. *Freshwater Biology*, 55, 241–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02368.x>
- Hering, D., Johnson, R. K., Kramm, S., Schmutz, S., Szoszkiewicz, K., & Verdonschot, P. F. M. (2006). Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology*, 51(9), 1757–1785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01610.x>
- Herrero, A., Gutiérrez-Cánovas, C., Vigiak, O., Lutz, S., Kumar, R., Gampe, D., Huber-García, V., Ludwig, R., Batalla, R., & Sabater, S. (2018). Multiple stressor effects on biological quality elements in the Ebro River: Present diagnosis and predicted responses. *Science of the Total Environment*, 630, 1608–1618. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.032>

- Hill, W. R., Rinchar, J., & Czesny, S. (2011). Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton. *Freshwater Biology*, 56(9), 1825–1836. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02622.x>
- Hofmann, A. M., Geist, J., Nowotny, L., & Raeder, U. (2020). Depth-distribution of lake benthic diatom assemblages in relation to light availability and substrate: implications for paleolimnological studies. *Journal of Paleolimnology*, 64(3), 315–334. <https://doi.org/10.1007/s10933-020-00139-9>
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannou, C., Nakis, L., Ruhí, A., Acuña, V., Sabater, S., & Barcelo, D. (2016). Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a wastewater treatment plant-impacted river. *Science of the Total Environment*, 540, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.049>
- Hynes, H. B. N. (1975). The stream and its valley. *SIL Proceedings*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/03680770.1974.11896033>
- Jackson, M. C., Loewen, C. J. G., Vinebrooke, R. D., & Chimimba, C. T. (2016). Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 22(1), 180–189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028>
- Jäger, C. G., & Borchardt, D. (2018). Longitudinal patterns and response lengths of algae in riverine ecosystems: A model analysis emphasising benthic-pelagic interactions. *Journal of Theoretical Biology*, 442, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.01.009>
- Jesus, Â. (2012). Contributos para o Estabelecimento de Descargas Máximas Diárias de Poluentes na Bacia Hidrográfica do Rio Cávado.
- Jones, V. J. (2013). Diatoms introduction. In *Encyclopedia of Quaternary Science* (pp. 471–480). Elsevier.
- Kingsford, R. T. (2011). Conservation management of rivers and wetlands under climate change - a synthesis. *Marine and Freshwater Research*, 62(3), 217–222. <https://doi.org/10.1071/mf11029>
- Larsen, S., Muehlbauer, J. D., & Marti, E. (2016). Resource subsidies between stream and terrestrial ecosystems under global change. *Global Change Biology*, 22(7), 2489–2504. <https://doi.org/10.1111/gcb.13182>
- Lee, K. E., Lorenz, D. L., Petersen, J. C., & Greene, J. B. (2012). Seasonal patterns in nutrients, carbon, and algal responses in wadeable streams within three geographically distinct areas of the United States, 2007-08 (p. 55). U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2012–5086.
- Lowe, R. L., & LaLiberte, G. D. (2017). Benthic Stream Algae: Distribution and Structure. In *Methods in Stream Ecology* (pp. 193–221). Elsevier.
- McCall, S. J., Hale, M. S., Smith, J. T., Read, D. S., & Bowes, M. J. (2017). Impacts of phosphorus concentration and light intensity on river periphyton biomass and community structure. *Hydrobiologia*, 792(1), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3067-1>

- McDowell, R. W., Noble, A., Pletnyakov, P., Haggard, B. E., & Mosley, L. M. (2020). Global mapping of freshwater nutrient enrichment and periphyton growth potential. *Scientific Reports*, 10(1), 3568. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60279-w>
- Minshall, G. W. (1978). Autotrophy in Stream Ecosystems. *BioScience*, 28(12), 767–771. <https://doi.org/10.2307/1307250>
- Munné, A., Solá, C., & Prat, N. (1998). QBR: Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera. *Tecnología Del Agua*, 175, 20–37.
- Murdock, J., Roelke, D., & Gelwick, F. (2004). Interactions between flow, periphyton, and nutrients in a heavily impacted urban stream: implications for stream restoration effectiveness. *Ecological Engineering*, 22(3), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2004.05.005>
- Niyogi, D. K., Koren, M., Arbuckle, C. J., & Townsend, C. R. (2006). Stream Communities Along a Catchment Land-Use Gradient: Subsidy-Stress Responses to Pastoral Development. *Environmental Management*, 39(2), 213–225. <https://doi.org/10.1007/s00267-005-0310-3>
- Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J. M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., & Birk, S. (2016). Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Science of the Total Environment*, 540, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.045>
- O'Brien, P. J., & Wehr, J. D. (2010). Periphyton biomass and ecological stoichiometry in streams within an urban to rural land-use gradient. *Hydrobiologia*, 657(1), 89–105. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9984-5>
- O'Hare, M. T., Baattrup-Pedersen, A., Baumgarte, I., Freeman, A., Gunn, I. D. M., Lázár, A. N., Sinclair, R., Wade, A. J., & Bowes, M. J. (2018). Responses of Aquatic Plants to Eutrophication in Rivers: A Revised Conceptual Model. *Frontiers in Plant Science*, 9, 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00451>
- Ormerod, S. J., Dobson, M., Hildrew, A. G., & Townsend, C. R. (2010). Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 55, 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02395.x>
- Pacheco, J. P., Calvo, C., Aznarez, C., Barrios, M., Meerhoff, M., Jeppesen, E., & Baattrup-Pedersen, A. (2022). Periphyton biomass and life-form responses to a gradient of discharge in contrasting light and nutrients scenarios in experimental lowland streams. *Science of the Total Environment*, 806, 150505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150505>
- Parkyn, S. M., Davies-Colley, R. J., Halliday, N. J., Costley, K. J., & Croker, G. F. (2003). Planted Riparian Buffer Zones in New Zealand: Do They Live Up to Expectations? *Restoration Ecology*, 11(4), 436–447. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100x.2003.rec0260.x>

- Pereda, O., von Schiller, D., García-Baquero, G., Mor, J.-R., Acuña, V., Sabater, S., & Elosegí, A. (2021). Combined effects of urban pollution and hydrological stress on ecosystem functions of Mediterranean streams. *Science of the Total Environment*, 753, 141971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141971>
- Perkins, D. M., Bailey, R. A., Dossena, M., Gamfeldt, L., Reiss, J., Trimmer, M., & Woodward, G. (2014). Higher biodiversity is required to sustain multiple ecosystem processes across temperature regimes. *Global Change Biology*, 21(1), 396–406. <https://doi.org/10.1111/gcb.12688>
- Piggott, J. J., Niyogi, D. K., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Multiple stressors and stream ecosystem functioning: climate warming and agricultural stressors interact to affect processing of organic matter. *Journal of Applied Ecology*, 52(5), 1126–1134. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12480>
- Piggott, J. J., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and Evolution*, 5(7), 1538–1547. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>
- Pinho, J., Ferreira, R., Vieira, L., & Schwanenberg, D. (2014). Comparison Between Two Hydrodynamic Models for Flooding Simulations at River Lima Basin. *Water Resources Management*, 29(2), 431–444. <https://doi.org/10.1007/s11269-014-0878-6>
- Price, K. J., & Carrick, H. J. (2016). Effects of experimental nutrient loading on phosphorus uptake by biofilms: evidence for nutrient saturation in mid-Atlantic streams. *Freshwater Science*, 35(2), 503–517. <https://doi.org/10.1086/686269>
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2018). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Romero, F., Acuña, V., Font, C., Freixa, A., & Sabater, S. (2019). Effects of multiple stressors on river biofilms depend on the time scale. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52320-4>
- Rosemond, A. D. (1994). Multiple Factors Limit Seasonal Variation in Periphyton in a Forest Stream. *Journal of the North American Benthological Society*, 13(3), 333–344. <https://doi.org/10.2307/1467363>
- Rosemond, A. D., Mulholland, P. J., & Brawley, S. H. (2000). Seasonally shifting limitation of stream periphyton: response of algal populations and assemblage biomass and productivity to variation in light, nutrients, and herbivores. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(1), 66–75. <https://doi.org/10.1139/f99-181>
- Sabater, S., Donato, J. C., Giorgi, A., & Elosegí, A. (2009). El río como ecosistema. In *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (pp. 23-37). Fundación BBVA.

- Sanderson, E. W., Jaiteh, M., Levy, M. A., Redford, K. H., Wannebo, A. V., & Woolmer, G. (2002). The Human Footprint and the Last of the Wild. *BioScience*, 52(10), 891. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0891:thfat\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0891:thfat]2.0.co;2)
- Schindler, D. E., & Smits, A. P. (2017). Subsidies of Aquatic Resources in Terrestrial Ecosystems. *Ecosystems*, 20(1), 78–93. <https://doi.org/10.1007/s10021-016-0050-7>
- Schneider, S. C., Laizé, C. L. R., Acreman, M. C., & Flörke, M. (2013). How will climate change modify river flow regimes in Europe? *Hydrology and Earth System Sciences*, 17(1), 325–339. <https://doi.org/10.5194/hess-17-325-2013>
- Schneider, S. C. (2015). Greener rivers in a changing climate?—Effects of climate and hydrological regime on benthic algal assemblages in pristine streams. *Limnologica*, 55, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2015.10.004>
- Segurado, P., Almeida, C., Neves, R., Ferreira, M. T., & Branco, P. (2018). Understanding multiple stressors in a Mediterranean basin: Combined effects of land use, water scarcity and nutrient enrichment. *Science of the Total Environment*, 624, 1221–1233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.201>
- Skovsholt, L. J., Pastor, A., Docherty, C. L., Milner, A. M., & Riis, T. (2020). Changes in hydrology affects stream nutrient uptake and primary production in a high-Arctic stream. *Biogeochemistry*, 151(2-3), 187–201. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00719-x>
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100(1-3), 179–196. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00091-3)
- Soares, H. M. V. M., Boaventura, R. A. R., Machado, A. A. S. C., & Esteves da Silva, J. C. G. (1999). Sediments as monitors of heavy metal contamination in the Ave river basin (Portugal): multivariate analysis of data. *Environmental Pollution*, 105(3), 311–323. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00048-2)
- Soares, P. M. M., Cardoso, R. M., Ferreira, J. J., & Miranda, P. M. A. (2015). Climate change and the Portuguese precipitation: ENSEMBLES regional climate models results. *Climate Dynamics*, 45(7), 1771–1787. <https://doi.org/10.1007/s00382-014-2432-x>
- Soria, M., Gutiérrez-Cánovas, C., Bonada, N., Acosta, R., Rodríguez-Lozano, P., Fortuño, P., Burgazzi, G., Vinyoles, D., Gallart, F., Latron, J., Llorens, P., Prat, N., & Cid, N. (2020). Natural disturbances can produce misleading bioassessment results: Identifying metrics to detect anthropogenic impacts in intermittent rivers. *Journal of Applied Ecology*, 57(2), 283–295. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13538>

- Steinman, A., Lamberti, G., Leavitt, P., & Uzaraski, D. (2017). Biomass and Pigments of Benthic Algae. In *Methods in Stream Ecology: Ecosystem Structure* (pp. 223–241). Elsevier.
- Stevenson, J. (2014). Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *Journal of Phycology*, 50(3), 437–461. <https://doi.org/10.1111/jpy.12189>
- Subalusky, A. L., Dutton, C. L., Njoroge, L., Rosi, E. J., & Post, D. M. (2018). Organic matter and nutrient inputs from large wildlife influence ecosystem function in the Mara River, Africa. *Ecology*, 99(11), 2558–2574. <https://doi.org/10.1002/ecy.2509>
- Timoner, X., Colls, M., Salomón, S. M., Oliva, F., Acuña, V., & Sabater, S. (2019). Does biofilm origin matter? Biofilm responses to non-flow period in permanent and temporary streams. *Freshwater Biology*, 65(3), 514–523. <https://doi.org/10.1111/fwb.13447>
- Turunen, J., Elbrecht, V., Steinke, D., & Aroviita, J. (2021). Riparian forests can mitigate warming and ecological degradation of agricultural headwater streams. *Freshwater Biology*, 66(4), 785–798. <https://doi.org/10.1111/fwb.13678>
- Turunen, J., Markkula, J., Rajakallio, M., & Aroviita, J. (2019). Riparian forests mitigate harmful ecological effects of agricultural diffuse pollution in medium-sized streams. *Science of the Total Environment*, 649, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.427>
- Vinebrooke, R. D., Cottingham, K. L., Marten Scheffer, J. N., Dodson, S. I., C. Maberly, S. C., & Sommer, U. (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos*, 104(3), 451–457. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13255.x>
- von Schiller, D. V., Martí, E., Riera, J. L., & Sabater, F. (2007). Effects of nutrients and light on periphyton biomass and nitrogen uptake in Mediterranean streams with contrasting land uses. *Freshwater Biology*, 52(5), 891–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01742.x>
- Wagner, K., Besemer, K., Burns, N. R., Battin, T. J., & Bengtsson, M. M. (2015). Light availability affects stream biofilm bacterial community composition and function, but not diversity. *Environmental Microbiology*, 17(12), 5036–5047. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12913>
- Wang, B., Hu, J., Li, S., Yu, L., & Huang, J. (2018). Impacts of anthropogenic inputs on hypoxia and oxygen dynamics in the Pearl River estuary. *Biogeosciences*, 15(20), 6105–6125. <https://doi.org/10.5194/bg-15-6105-2018>
- Webb, B. W., Hannah, D. M., Moore, R. D., Brown, L. E., & Nobilis, F. (2008). Recent advances in stream and river temperature research. *Hydrological Processes*, 22(7), 902–918. <https://doi.org/10.1002/hyp.6994>

- Weissteiner, C. J., Bouraoui, F., & Abo, A. (2013). Reduction of nitrogen and phosphorus loads to European rivers by riparian buffer zones. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 408, 08. <https://doi.org/10.1051/kmae/2013044>
- Whitton, B. A. (2013). Use of Benthic Algae and Bryophytes for Monitoring Rivers. *Journal of Ecology and Environment*, 36(1), 95–100. <https://doi.org/10.5141/ecoenv.2013.012>
- Xiong, W., Ni, P., Chen, Y., Gao, Y., Li, S., & Zhan, A. (2019). Biological consequences of environmental pollution in running water ecosystems: A case study in zooplankton. *Environmental Pollution*, 252(Part B), 1483–1490. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.055>
- Ylla, I., Romani, A. M., & Sabater, S. (2007). Differential effects of nutrients and light on the primary production of stream algae and mosses. *Fundamental and Applied Limnology*, 170(1), 1–10. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2007/0170-001>