



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Maria João Alves Nogueira

Efeitos dos incêndios florestais na decomposição da
folhada em rios: estudo em microcosmos

Tese de Mestrado

Mestrado em Ecologia

Trabalho sob orientação de:

Prof. Dr. Fernanda Maria Fraga Mimoso Gouveia Cássio

Prof. Dr. Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal

Prof. Dr. Néilson José Abrantes

DECLARAÇÃO

Nome: Maria João Alves Nogueira

Endereço electrónico: maryjanenogueira@gmail.com

Telefone: 917989508

Número do Bilhete de Identidade: 13000453

Título tese: Efeitos dos incêndios florestais na decomposição da folhada em rios: estudo em microcosmos

Orientadores: Cláudia Pascoal; Fernanda Cássio e Nélson Abrantes

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Ecologia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

(Maria João Alves Nogueira)

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus sobrinhos, por tudo.

Agradecimentos

Finda mais uma etapa da minha vida, não poderia deixar de agradecer às pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Foi sem dúvida um ano de muitas dificuldades, muitas surpresas, muito trabalho e espírito de sacrifício, em suma, uma etapa de evolução pessoal e profissional muito gratificante.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, a professora doutora Fernanda Cássio, a professora doutora Cláudia Pascoal e ao professor doutor Nélson Abrantes, pela aposta em mim e neste projeto, pelas valiosas contribuições que me proporcionaram, e pela generosa disponibilidade que sempre apresentaram ao longo da realização deste trabalho.

À doutora Isabel Fernandes, à doutora Sofia Duarte, ao Paulo Geraldês, por toda a ajuda que me deram ao longo deste trabalho, pelos conselhos e conhecimentos que me transmitiram e sem dúvida pela sua disponibilidade total em ajudar sempre que possível.

Um agradecimento especial á aluna de doutoramento Diana Barros, porque foi sem dúvida uma pessoa indispensável ao longo deste trabalho, a sua ajuda, conselhos e motivação, fizeram com que muitos dos obstáculos que enfrentei este ano fossem superados.

Agradeço a toda a equipe que trabalhou comigo, nomeadamente aos meus colegas de mestrado Bruno Antunes, Francisco Carvalho e José Trábulo, à Eva Fernandes, à Ana Pereira, à Carla Silva e ao Arunava, pela cooperação em todos os trabalhos de grupo, pela boa disposição que implementaram no laboratório e pela ajuda que me deram sempre.

A todo o pessoal não docente, nomeadamente à dona Isabel, à Magda, à Cristina, ao Sr. Amaro, e ao Sr. José, por toda a disponibilidade.

Aos meus grandiosos amigos de coração, Manó Mota, Susana Barros, André Carvalho, Liliana Fernandes e Hugo Ribeiro por estarem sempre do meu lado, por me ajudarem na dura luta que sabem que travei este ano e por terem acreditado sempre em mim

Ao meu primo e mestre em Biologia Marinha João Alves, por toda a ajuda que me deu!

A todos os meus amigos nomeadamente à Paula Afonso, à Rita Cunha, à Rita Carneiro, à Ana Carneiro, ao Bruno Malheiro, à Mariana Pereira dos Reis, ao Ricardo Lira, ao Paulo, ao Vitor, à Andreia Silva, à Julieta Silva, à Mariana Faisca, à Margarida Vieira, à Nídia Costa, à Rafaela Magalhães, ao Luís Mendes, ao Valdemar Costa, à Maria José Bacelar, à Carolina Marques, ao João Pedro Peixoto, ao Jorge Ferreira e à Joana Magalhães, por estarem “sempre lá”.

Agradeço ainda ao projeto FIRETOX - Toxic effects of wildfires on aquatic systems (PTDC/AAG-GLO/4176/2012) que suportou este estudo.

Efeitos dos incêndios florestais na decomposição da folhada em rios: estudo em microcosmos

Sumário

Os incêndios florestais são um distúrbio cada vez mais frequente na região do Mediterrâneo com diversas repercussões ao nível económico, social e ambiental. Entre os problemas ambientais associados a este distúrbio, os efeitos da contaminação dos cursos de água por substâncias pirolíticas provenientes dos incêndios, nomeadamente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e metais, têm sido relativamente negligenciados.

Neste estudo, para compreender os efeitos nos rios das escorrências provenientes de áreas aridas, foram avaliados os efeitos de extratos aquosos de cinzas na decomposição da folhada conduzida por microrganismos e invertebrados detritívoros. Para isso, foram colhidas cinzas após um incêndio florestal decorrido na localidade da Várzea (Viseu, Portugal) e preparados extratos aquosos de cinzas nas proporções 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100%. Os efeitos dos extratos aquosos de cinzas foram testados na perda de massa de folha promovida pelos microrganismos, nas taxas de esporulação e na biomassa de fungos, bem como no comportamento alimentar de invertebrados detritívoros da espécie *Alogamus lignonifer*. A análise química dos extratos aquosos de cinzas indicou a presença do fenantreno e de cinco metais (manganês, cobre, zinco, níquel e crómio). A exposição aos extratos de cinzas estimulou a decomposição microbiana, assim como a taxa de consumo de folhada pelo invertebrado detritívoro. Contudo, não foram observados efeitos significativos na taxa de esporulação nem na biomassa dos fungos. O aumento da decomposição da folhada com o aumento da concentração dos extratos aquosos de cinzas, pode ser explicado pelas baixas concentrações de PAHs e de metais nos extratos, assim como pela presença de concentrações elevadas de nutrientes que poderão ter tido um efeito estimulador da atividade microbiana mascarando os potenciais efeitos tóxicos dos PAHs ou dos metais.

Palavras-chave: Incêndios florestais, extratos aquosos de cinzas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais, decomposição dos detritos vegetais, microrganismos, invertebrados detritívoros, ecossistemas aquáticos

Effects of wildfires on leaf-litter decomposition in streams: studies in microcosms

Abstract

The occurrence of wildfires is increasing in the Mediterranean region with several economic, social and environmental impacts. Among the environmental problems associated with wildfires, contamination of freshwaters by pyrolytic substances, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals, has been neglected. This study was designed to evaluate the effects of aqueous extracts of ashes to simulate the runoff from burned areas in the process of litter decomposition in rivers, carried out by microorganisms and invertebrates. We collected ashes in a post-fire event in a forest in Várzea (Viseu, Portugal) and we prepared aqueous extracts of ashes in the proportions of 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100%. The effects of aqueous extracts of ashes were assessed on leaf litter decomposition by microorganisms, on sporulation rates and biomass of fungi and on the feeding behavior of invertebrates of the species *Alogamus ligonifer* in microcosms experiment. Chemical analysis of the aqueous extracts of ashes indicated the presence of phenanthrene (PAH) and five metals (manganese, copper, zinc, nickel and chromium). The exposure to aqueous extracts of ashes stimulated microbial decomposition of leaf litter and the rate of leaf consumption by the invertebrate shredder. However, no significant effects were observed on the rate of sporulation or biomass of fungi. The stimulation of litter decomposition promoted by increased concentrations of the aqueous extracts of ashes might be explained by the low concentrations of PAHs and metals. Furthermore, our results suggested that the presence of elevated concentrations of inorganic nutrients might have stimulated microbial activity counterbalancing the putative negative effects of metals and PAHs.

Keywords: Wildfires, aqueous extracts of ashes, polycyclic aromatic hydrocarbons, metals, plant litter decomposition, microbes, invertebrate detritivores, freshwater ecosystems

Índice

1. Introdução	1
1.1. Os incêndios florestais no contexto global	1
1.2. Impactes dos incêndios florestais no solo, na vegetação e nos processos hidrológicos.....	2
1.3. Os incêndios florestais nos ecossistemas aquáticos.....	3
1.3.1. Implicações dos incêndios florestais no transporte de nutrientes.....	3
1.3.2. Principais contaminantes provenientes de incêndios florestais	6
1.4. A decomposição da folhada nos rios e os organismos associados.....	9
2. Objetivos	11
3. Material e métodos	12
3.1. Local de amostragem.....	12
3.2. Colonização microbiana da folhada	13
3.3. Caracterização da área de recolha das cinzas	13
3.3.1. Obtenção dos extratos de cinzas e extratos aquosos de cinzas.....	13
3.3.2. Caracterização química das cinzas e extratos aquosos de cinzas	14
3.4. Perda de massa foliar	15
3.5. Esporulação de fungos.....	15
3.6. Biomassa de fungo	15
3.7. Experiência de alimentação	16
3.8. Tratamento estatístico dos dados	17
4. Resultados	18
4.1. Concentrações de PAHs e metais nos extratos aquosos de cinzas	18
4.2. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na decomposição das folhas pelos hifomicetos aquáticos	20
4.3. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na diversidade de fungos aquáticos.....	21
4.4. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na taxa de esporulação de fungos.....	22
4.5. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na biomassa dos fungos	22
4.6. Efeitos das concentrações de extratos aquosos de cinzas no consumo de folhada pelos invertebrados detritívoros.....	23
5. Discussão.....	24
6. Considerações finais	29
7. Referências Bibliográficas.....	30

Índice de figuras

- Figura 1.** Regressão linear da percentagem de decomposição da folhada de amieiro pelos hifomicetos aquáticos em função das concentrações dos extratos aquosos de cinzas. 20
- Figura 2.** Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos associados às folhas de amieiro em decomposição expostas a concentrações crescentes de extratos aquosos de cinzas 22
- Figura 3.** Biomassa de fungos associada às folhas de amieiro em decomposição expostas a concentrações crescentes de extratos aquosos de cinzas.....23
- Figura 4.** Taxa de consumo de folha de amieiro pelos invertebrados detritívoros expostos 7 dias em microcosmos a diferentes concentrações de extratos aquosos de cinzas..... 23

Índice de tabelas

Tabela 1. Características físicas e químicas da água do rio Algeriz	12
Tabela 2. Preparação das soluções correspondentes a cada concentração a ser testada	14
Tabela 3. Concentração de PAHs presentes nos extratos aquosos de cinzas (EACs).	19
Tabela 4. Concentração de metais presentes nos EACs	19
Tabela 5. Concentração total de nutri entes presentes nos extratos aquosos de cinzas	20
Tabela 6. Percentagem de contribuição de cada taxa de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídias.	21

1. Introdução

1.1. Os incêndios florestais no contexto global

Todos os anos, os incêndios florestais queimam grandes áreas de floresta, especialmente na América do norte, no sudeste da Austrália e no Mediterrâneo (Food and Agriculture Organization, [FAO],2001), representando uma importante ameaça para a biodiversidade e para os recursos naturais. Apesar da zona do Mediterrâneo e da costa atlântica serem marcadas por uma longa história de incêndios florestais desde o final do período quaternário (Carrión et al., 2003) e da existência de registos fósseis com 300-350 milhões de anos da sua ocorrência (Komarek, 1973), a maior preocupação sobre os efeitos dos incêndios florestais surgiu a partir da década de 1960, devido ao aumento exponencial de ocorrências (Pausas, 2004). Atualmente, cerca de 50 000 incêndios são reportados anualmente na zona do Mediterrâneo Europeu, incluindo países como Espanha, Portugal, Itália e Grécia, queimando em média 600 000 hectares de floresta (Rulli et al., 2006). O aumento da atividade de fogo nestes países pode ser atribuído a vários fatores naturais, nomeadamente às características climáticas peculiares, ao forte crescimento vegetativo durante a época chuvosa, o que origina uma alta carga de combustível, bem como à ocorrência de verões muito quentes e secos, o que propicia a ocorrência de incêndios (Lloret et al., 2009). Os fatores antropogénicos como a plantação de espécies vegetais altamente inflamáveis, como por exemplo o eucalipto, e o abandono das terras, provocado pela ampla mudança sócio-económica dos últimos anos, são vistos como importantes impulsionadores no aumento da ocorrência de incêndios nestas regiões (Moreira et al., 2009). O aumento da ocorrência de fogo nas últimas décadas (Pausas et al., 2008; Shakesby, 2011) transformou este fenómeno natural num problema social e ambiental preocupante, pois os seus efeitos traduzem-se em malefícios a nível da saúde e segurança humanos, prejuízos económicos, poluição do ar e da água, impactes na biodiversidade e no uso sustentável da terra (Campos et al., 2012). Deste modo, embora os incêndios florestais em pequena escala façam parte da dinâmica natural dos ecossistemas do mediterrâneo e contribuam para a gestão dos recursos naturais, a crescente intensificação dos mesmos nas últimas décadas, contribuiu substancialmente para a redução da capacidade de regeneração natural de certas áreas, verificando-se extensas zonas marcadamente afetadas por perdas de biodiversidade, pela erosão dos solos e pela escassez de água (Olivella et al., 2006).

1.2. Impactes dos incêndios florestais no solo, na vegetação e nos processos hidrológicos

Os incêndios florestais são considerados um dos principais agentes de degradação e erosão dos solos na zona do Mediterrâneo (Ferreira et al., 2008; Lloret et al., 2009). Os efeitos dos incêndios no solo podem ser divididos em (1) efeitos diretos, decorrentes das altas temperaturas sobre a componente orgânica dos solos, o que proporciona o aumento da mineralização da matéria orgânica existente no solo, tornando-a deste modo, mais facilmente exportável pelos processos erosivos e hidrológicos e (2) efeitos indiretos, derivados do desaparecimento da cobertura vegetal, levando a que o solo seja mais facilmente erodível e proporcionando alterações consideráveis nos processos hidrológicos (Alegre et al., 2010). Estes efeitos estão dependentes de uma série de fatores, nomeadamente das características do solo, como a humidade e o teor de matéria orgânica, da severidade do fogo, que corresponde à quantidade de biomassa que é destruída durante o fogo, às condições meteorológicas locais, à frequência com que ocorrem os fogos, às características do combustível e às características do terreno, como o declive e a topografia (Ferreira et al., 2008; Neary et al., 1999). Deste modo, há uma série de mudanças a nível físico, químico, mineralógico e biológico dos solos que são impulsionadas pelos fogos (Shakesby e Doerr, 2006). O aumento da erosão dos solos após fogo, compromete negativamente certas propriedades do solo que contribuem para o bom funcionamento hidrológico, nomeadamente a porosidade, a condutividade, as taxas de infiltração e a capacidade de armazenamento de água (Neary et al., 1999), aumentando deste modo o escoamento superficial. Para além destas mudanças, o fogo pode também reduzir a estabilidade estrutural dos solos e dos seus agregados bem como consumir as raízes superficiais que contribuem para a coesão/força do solo (Hyde et al., 2007). Além disso, em solos afetados pelo fogo, o escoamento superficial pode ser reforçado pela formação de uma camada repelente de água. Esta camada repelente da água (hidrofóbica) perto da superfície do solo, é gerada devido à vaporização e à condensação de compostos do solo, estando a sua formação diretamente relacionada com as altas temperaturas de combustão decorrentes do incêndio bem como dos combustíveis disponíveis. Esta camada é formada quando as temperaturas do solo são superiores a 176°C o que impossibilita a água de molhar os agregados do solo, levando a uma acentuada redução das taxas de infiltração de água (DeBano, 2000; Letey, 2001), aumentando

a escorrência superficial que, deste modo, facilita a mobilização da camada de cinzas hidrofílica, sendo lixiviados uma importante fonte de nutrientes até aos cursos de água a jusante.

1.3. Os incêndios florestais nos ecossistemas aquáticos

1.3.1. Implicações dos incêndios florestais no transporte de nutrientes

Devido à alta conectividade existente entre o habitat terrestre e aquático, os incêndios florestais acabam por afetar significativamente os sistemas aquáticos, especialmente os rios de baixa ordem, uma vez que a área ardida circundante é consideravelmente mais restrita e, deste modo, mais suscetível de ser queimada (Minshall et al., 1997).

Os efeitos que os fogos podem ter nos ecossistemas aquáticos podem ser divididos em (1) consequências a curto prazo, que incluem a mobilização de nutrientes, o aumento da temperatura da água e alterações na composição química da água (Gresswell, 1999; Minshall et al., 1989) e (2) respostas a longo prazo, resultantes da remoção e substituição da cobertura vegetal (Minshall et al., 1989). Os efeitos a médio prazo (1-10 anos) incluem mudanças mais dramáticas e geralmente ocorrem na primeira década a seguir ao incêndio, e os efeitos a longo prazo (> 10 até 100-300 anos) correspondem à fase de re-vegetação das áreas queimadas. Como referido anteriormente, os efeitos diretos que o fogo tem sobre a cobertura vegetal e as propriedades do solo, alteram substancialmente os processos hidrológicos aumentando o transporte de sedimentos, de nutrientes e de poluentes para os cursos de água (Shakesby e Doerr, 2006). No caso do transporte de nutrientes e dos seus efeitos na qualidade da água, os resultados obtidos na literatura são bastante limitados e inconsistentes. Geralmente, a entrada de nutrientes nos cursos de água está dependente de vários processos como a lixiviação das cinzas, a difusão de gases ou o processo de nitrificação, o que aumenta consideravelmente a entrada de nutrientes como o azoto, o fósforo, o nitrato e a amónia nos cursos de água (Certini, 2005; Spencer et al., 2003). Contudo, alguns autores não encontram alterações significativas na qualidade da água após um incêndio florestal (Davis, 1989; McColl e Grigal, 1977). Apesar do efeito específico das cinzas sobre a qualidade das águas ser difícil de distinguir do efeito dos sedimentos minerais que entram nos rios, um estudo, onde foi examinada a influência da

entrada de cinzas provenientes de áreas ardidadas num rio de primeira ordem, mostrou que após a entrada de cinzas, a qualidade da água mudou significativamente, estando a concentração de iões e de nutrientes significativamente aumentados. Neste estudo, o tempo, a duração e a quantidade de precipitação, foram os principais fatores que influenciaram a quantidade de cinzas libertadas nos rios (Earl e Blinn, 2003). A incoerência dos resultados, nos estudos acima referidos, deriva muito provavelmente da existência de múltiplas variáveis que influenciam o impacto dos fogos nos ecossistemas de rio, nomeadamente a intensidade e a duração do fogo, o tipo de solo, a quantidade e o tipo de vegetação, as condições climatéricas e a geomorfologia (Britton, 1991). Como resultado, os efeitos do fogo na composição química da água variam substancialmente entre as áreas de estudo (Robison e Beschta, 1990). Alguns estudos demonstram que, após um incêndio, os organismos podem exibir respostas diferentes a este distúrbio. Por exemplo, Minshall et al. (1995) mostrou haver uma significativa redução da biomassa do perifiton após fogo enquanto Earl e Blinn (2003) mostraram que a biomassa do perifiton não era significativamente afetada pelo fogo, no entanto, documentaram algumas alterações nas comunidades de diatomáceas, nomeadamente variações na abundância relativa dos diferentes taxa.

Nas últimas décadas, muitos estudos têm-se focado na análise dos efeitos dos incêndios florestais na comunidade de macroinvertebrados e peixes. Os efeitos dos fogos sobre estes organismos podem ser separados em efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos fazem-se sentir a curto prazo e englobam o aquecimento da água, o aumento dos nutrientes, de cinzas e de carvão vegetal, bem como a exposição prolongada ao fumo (Rinne, 1996; Minshall et al., 2001). Apesar de estes efeitos serem normalmente negligenciáveis podem, em casos excepcionais, causar a morte de macroinvertebrados e de peixes (Spencer e Hauer, 1991). Por outro lado, os efeitos indiretos (médio/ longo prazo) são os que tem maior impacto nas comunidades e estão associados às alterações das características físicas do canal, do aumento do escoamento superficial, bem como do transporte e deposição de sedimentos (Minshall et al., 1997, 2001). As comunidades de invertebrados aquáticos também mostram respostas diferentes aos incêndios florestais. Enquanto alguns autores, referem aumentos significativos na biomassa das comunidades de macroinvertebrados após o fogo (Haggerty et al., 2004; Stone e Wallace, 1998), Minshall (2003) detetou apenas efeitos mínimos nas comunidades de macroinvertebrados estudados. O aumento de nutrientes após incêndio, pode contribuir para o aumento da biomassa de macroinvertebrados bentónicos (Scrimgeour et al., 2001). Contudo,

Earl e Blinn (2003) mostraram que a densidade de certos grupos de macroinvertebrados como os Diptera, Ephemeroptera e Trichoptera foi fortemente reduzida nos rios pela entrada de cinzas provenientes de um incêndio florestal.

No que respeita a organismos de níveis tróficos superiores, foi referida uma redução significativa da densidade de salmonídeos, após um incêndio florestal (Rinne, 1996). Também Spencer et al. (2003) observaram um aumento significativo da morte de peixes (especialmente de *Oncorhynchus clarkii lewisi*) num rio em Montana (EUA), sendo este declínio atribuído às altas temperaturas decorridas durante o fogo, à difusão de fumo e às altas concentrações de amónia na água. O fogo pode ainda comprometer populações de anfíbios que vivem associados aos ecossistemas de água doce, uma vez que os habitats ripícolas são importantes zonas para alimentação e reprodução destes vertebrados (Burke e Gibbons, 1995). Assim, após o fogo, há uma série de alterações que comprometem a sobrevivência destes organismos, nomeadamente a perda de vegetação, o que faz com que se tornem mais suscetíveis de serem capturados por predadores, a intolerância de algumas espécies às temperaturas elevadas da água bem como a mudanças na qualidade da água, que podem comprometer os estados de vida aquáticos destes vertebrados (Pilliod et al., 2003).

Após um incêndio, as alterações ao nível dos recursos vegetais, como por exemplo a perda de vegetação ripícola, faz com que a superfície da água esteja exposta a uma maior radiação solar, promovendo uma maior produção autotrófica (Mihuc e Minshall, 2005). Este facto faz com que o regime alimentar das comunidades de macroinvertebrados dos rios possa mudar consideravelmente após o incêndio (Mihuc e Minshall, 2005). Num estudo efetuado por Mihuc e Minshall (1995) foi examinada a ecologia trófica de 11 macroinvertebrados bentónicos em Cache Creek, após um incêndio. Neste estudo, das 11 espécies estudadas, apenas uma, *Paraleptophlebia heteronea*, exibiu crescimento quando alimentada com folhas queimadas, provavelmente porque esta espécie foi capaz de se adaptar a recursos alimentares de baixa qualidade. Noutro estudo, o triturador *Pteronarcella badia* foi capaz de crescer quando alimentado com folhas queimadas, no entanto, a intensidade deste incêndio foi consideravelmente menor do que o que ocorreu em Cache Creek, sugerindo que os incêndios de menor intensidade provocam efeitos menos adversos nos recursos alimentares e, portanto, nos organismos. Além disso, os estudos demonstram que espécies oportunistas, bem como espécies com uma maior diversidade de habitats e de recursos alimentares são as que se adaptam melhor a perturbações como as provocadas pelo fogo (Resh et al., 1988). Num estudo feito por

Gama et al. (2007) foram comparadas as taxas de decomposição, a biomassa microbiana (fungos e bactérias) e a diversidade e abundância de macroinvertebrados em folhas de eucalipto expostas a fogo e em folhas de eucalipto “controle”. Neste estudo as taxas de decomposição e a biomassa fúngica foram idênticas nos dois tratamentos, mas as taxas de esporulação dos fungos e a respiração microbiana foram significativamente mais baixas nas folhas expostas ao fogo. Contudo, os invertebrados detritívoros preferiram as folhas de eucalipto expostas ao fogo, provavelmente porque as folhas sujeitas a combustão perdem óleos essenciais e compostos fenólicos que são reconhecidos inibidores do consumo de folhas pelos invertebrados. Deste modo, os autores sugeriram que as mudanças na qualidade de matéria orgânica alóctone após um incêndio parecem não comprometer, a curto prazo, o funcionamento dos ecossistemas de rio.

1.3.2. Principais contaminantes provenientes de incêndios florestais

Em ambientes aquáticos, os processos ecológicos, bem como as comunidades biológicas que os conduzem, são afetados pelas propriedades físicas e químicas da água. As alterações da qualidade da água, como a presença de poluentes e contaminantes, podem afetar a estrutura das comunidades e a atividade dos organismos que participam nos processos responsáveis pelo bom funcionamento dos ecossistemas de rio (Dangles et al., 2004; Niyogi et al., 2003). Após um incêndio florestal, as cinzas que entram nos rios podem conter uma grande quantidade de carbono na matéria orgânica particulada e elevadas quantidades de vários nutrientes, elementos vestigiais, bem como metais e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Goforth et al., 2005; Johansen et al., 2003; Smith et al., 2011).

Os PAHs são uma classe de compostos orgânicos, constituídos por dois ou mais anéis benzênicos, conhecidos pelas suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas, ubiquidade e tendência para a bioacumulação (Vila-Escalé et al., 2007; Xue e Warshawsky, 2005). Os PAHs são compostos hidrofóbicos cuja persistência nos ecossistemas está associada à sua baixa solubilidade em água. No entanto, apesar de pouco solúveis em água, os PAHs podem ligar-se à matéria orgânica particulada e acumular-se em elevadas concentrações nos sedimentos dos rios afetando a atividade dos organismos bentônicos (Gust e Fleeger, 2006). Alguns organismos aquáticos bentônicos podem acumular no seu corpo este tipo de compostos (Kukkonen e Landrum, 1995). Certos organismos, especialmente os microrganismos, têm a capacidade de

metabolizar e degradar PAHs sendo utilizados em processos de biorremediação na recuperação de sítios contaminados com PAHs (Cerniglia, 1993). Os fungos desempenham um papel determinante no metabolismo de vários hidrocarbonetos aromáticos tanto em ambientes terrestres como em ambientes aquáticos, pois produzem metabolitos, por norma menos inofensivos e mais solúveis em água e que, geralmente, apresentam menor reatividade biológica comparada com o composto de origem (Cerniglia e Sutherland, 2001). Por exemplo, o hifomiceto aquático *Heliscus lugdunensis* metaboliza o PAH 1-naphtol (Augustin et al., 2006), o Fenantreno pode ser degradado pelo fungo decompositor do género *Bjerkandera* (Soares et al., 2005; Terrazas et al., 2005) e pelo fungo terrestre *Cunninghamella elegans* (Lisowska et al., 2006).

Os metais ocorrem naturalmente no meio ambiente mas, após um incêndio florestal, a mineralização da matéria orgânica juntamente com a produção de cinzas resultantes da combustão, aumenta substancialmente o pH do solo, fazendo com que os metais alterem a sua forma, para a forma iónica, aumentando o seu transporte até aos cursos de água (Pereira e Úbeda, 2010). Apesar de alguns metais serem essenciais para o crescimento dos organismos, os metais em concentrações excessivas, podem tornar-se tóxicos (Alloway, 1995). Assim, a poluição dos ecossistemas aquáticos por metais é bastante preocupante, uma vez que os metais não são biodegradáveis e, portanto, tornam-se poluentes persistentes nestes ambientes (Rand et al., 1995). Vários estudos têm demonstrado que os metais, acima de uma certa concentração limite, podem comprometer a atividade e a diversidade dos organismos. A atividade e a diversidade de fungos aquáticos é negativamente afetada pela exposição a metais (Duarte et al., 2004, 2008). A reprodução, o crescimento e o comportamento alimentar de muitas espécies de invertebrados podem também ser afetados pela presença de metais (Felten et al., 2008). O aumento da temperatura pode aumentar a toxicidade de metais como o Cd, comprometendo a reprodução de fungos, a decomposição microbiana bem como o consumo de folha por invertebrados detritívoros (Batista et al., 2012). No entanto, o efeito dos metais ao nível dos ecossistemas lóticos torna-se difícil de prever uma vez que nestes ecossistemas, os organismos estão expostos a uma multiplicidade de agentes de stresse que atuam simultaneamente, podendo não responder da forma como previsto em experiências de laboratório, onde os efeitos dos agentes de stresse ambientais são, geralmente, testados individualmente (Duarte et al., 2008; Fernandes et al., 2009). Devido ao interesse no estudo da qualidade da água para consumo humano, a maioria dos estudos efetuados no que se refere ao impacte dos incêndios

na qualidade da água tendem a focar-se essencialmente no estudo dos sedimentos e nutrientes (fosfatos, nitrato e amónia) (Spencer et al., 2003), sendo que apenas alguns estudos se focam na entrada de contaminantes como metais e PAHs para os cursos de água. Num estudo efetuado por Olivella et al. (2006), cerca de um mês após um incêndio florestal decorrido no norte de Espanha, houve um aumento significativo da concentração de PAHs que atingiram os cursos de água, no entanto, estes níveis de PAHs diminuíram substancialmente devido a fatores como o efeito de diluição, provocado pela precipitação após incêndio, a degradação de PAHs (por foto-oxidação) bem como com a adsorção destes contaminantes a partículas (Olivella et al., 2006). Outro estudo, efetuado no rio Gallifa (um afluente de primeira ordem, localizado na Catalunha, Espanha) onde se avaliou a distribuição e permanência de PAHs considerados poluentes prioritários, constatou que a presença de PAHs depende em grande parte da intensidade e frequência da precipitação o que sugere que a estação do ano é um dos principais agentes que afeta o potencial tóxico e possíveis efeitos dos PAHs nestes ecossistemas, sendo que o decréscimo destes componentes é mais acentuado depois das primeiras chuvas após um incêndio (Villa-Escalé et al., 2007). Nestes estudos, os níveis de PAHs nos rios pareceram não ser um problema uma vez que se encontravam abaixo dos limites considerados legais para o consumo de água potável. Contudo, o aumento significativo de metais como o cobre, o chumbo e o zinco em rios da Lituânia, após os incêndios ocorridos no verão de 2002 (Ignatavičius et al., 2006), permitem inferir que os incêndios florestais podem contribuir para a poluição das águas.

O transporte de contaminantes como metais e PAHs para os cursos de água para além de poder afetar a qualidade da água para o consumo humano, pode também alterar a estrutura e a composição das comunidades biológicas existentes nesses ecossistemas (Gupta e Singh, 2011). Campos et al. (2012) expôs quatro espécies aquáticas de diferentes níveis tróficos, nomeadamente, a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, a macrófita *Lemna minor* e o invertebrado *Daphnia magna* a escorrências recolhidas imediatamente após o incêndio e a escorrências recolhidas um ano após um incêndio. Os resultados mostram que as escorrências tiveram efeitos inibitórios no crescimento de três das espécies estudadas (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Lemna minor*), mas não afetaram a reprodução da espécie do nível trófico mais elevado (*Daphnia magna*). Além disso, as escorrências recolhidas imediatamente após o incêndio mostraram ser menos tóxicas para os organismos do que as escorrências recolhidas um ano após o incêndio. Uma vez que a concentração de PAHs presentes nas escorrências recolhidas logo após o incêndio eram quatro vezes superiores às

escorrências recolhidas um ano após o incêndio, os autores sugeriram que o aumento da toxicidade das escorrências recolhidas um ano após incêndio derivavam provavelmente das diferenças na composição em PAHs, nomeadamente da predominância do PAH Naftaleno, presente nos lixiviados recolhidos um ano após o incêndio. Deste modo, os autores sugeriram que a composição em PAHs é mais relevante do que as cargas totais de PAHs, e que os efeitos destes contaminantes nos organismos não se restringem ao período imediatamente após o fogo.

1.4. A decomposição da folhada nos rios e os organismos associados

Nos ecossistemas lóticos, a matéria orgânica pode ter origem autóctone, sendo proveniente da produção primária, ou origem alóctone sendo neste caso proveniente da vegetação ribeirinha circundante (Dobson e Frid, 1998). Nos rios de baixa ordem, a decomposição do material vegetal alóctone é um processo chave que assegura a obtenção de carbono e energia necessários para o funcionamento das cadeias alimentares aquáticas (Allan e Castillo, 2007). A decomposição do material vegetal nos rios resulta da ação combinada de processos físicos, químicos e biológicos (Webster et al., 1999) e ocorre em três fases principais e interdependentes: a lixiviação, o condicionamento microbiano e a fragmentação física e biótica (Gessner et al., 1999). A lixiviação, processo através do qual as folhas perdem os seus constituintes solúveis quando imersos em água, está dependente de uma variedade de fatores, nomeadamente da composição das espécies vegetais, das condições climáticas, do tempo de queda das folhas, da largura do rio e da morfologia e inclinação do vale (Gessner et al., 1999). Seguidamente, ocorre o condicionamento microbiano, processo resultante da colonização e atividade de microrganismos decompositores como os fungos e as bactérias. Por último, a fragmentação física ocorre devido à abrasão física exercida pelo fluxo de água, e a fragmentação biótica é promovida pela atividade dos microrganismos e dos invertebrados trituradores (Gessner et al., 1999; Graça, 2001). Todo o processo de decomposição dos detritos vegetais está dependente de vários fatores nomeadamente da temperatura da água (Suberkropp e Weyers, 1996), das características químicas da água como o pH, alcalinidade e a concentração de nutrientes dissolvidos (Suberkropp e Chauvet, 1995), das características e composição química das folhas (Bärlocher et al., 1995) bem como pela presença de invertebrados trituradores nos rios que contribuem para a degradação foliar (Suberkropp, 1998; Pascoal et al., 2005). A decomposição da folhada é um processo dinâmico em que participam ativamente

microrganismos, como os fungos e as bactérias, e os invertebrados detritívoros (Suberkropp, 1998). De entre os microrganismos que participam neste processo, os fungos, especificamente os hifomicetos aquáticos, são particularmente relevantes. Os hifomicetos aquáticos são um grupo de fungos filogeneticamente heterogêneo com uma distribuição ubíqua nos rios e ribeiros, sendo particularmente comuns em águas limpas e de corrente rápida (Bärlocher, 1992). Estes microrganismos possuem características peculiares que contribuem para o seu sucesso no que diz respeito à colonização das folhas em ambientes lóticos, nomeadamente: (1) elevadas taxas de esporulação e de germinação de conídias, (2) a forma tetraradiada das conídias que lhes permitem maior contacto com o substrato, (3) a presença de reservas de glicogénio, o que permite a sobrevivência por longos períodos de tempo e (4) a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas (pectinases, hemicelulases e celulases) que degradam os polissacarídeos das paredes celulares das plantas (Suberkropp, 1998; Bärlocher, 2005). Além disso, os hifomicetos aquáticos aumentam a palatabilidade e o valor nutritivo da folhada para os organismos de níveis tróficos superiores, nomeadamente os invertebrados detritívoros (Suberkropp, 1998). Os invertebrados detritívoros têm um papel fundamental na decomposição dos detritos vegetais dos rios uma vez que asseguram a transferência de energia para os níveis tróficos superiores (Graça e Canhoto, 2006). Este grupo de organismos é bastante abundante nos rios, possuindo uma distribuição mundial. Além disso, são organismos bastante sensíveis a contaminantes e a tóxicos, com ciclos de vida curtos e altas taxas de reprodução o que os torna especialmente importantes em estudos de ecotoxicologia (De Schamphelaere et al., 2004; Gerhardt et al., 2004).

2. Objetivos

Os incêndios florestais constituem um importante problema ambiental na região do mediterrâneo. Apesar dos conhecidos efeitos dos incêndios florestais nos ecossistemas terrestres, estes podem constituir uma fonte de contaminação dos ecossistemas aquáticos, uma vez que, após um incêndio, várias substâncias pirolíticas como os metais e os PAHs podem entrar nos rios. Contudo, a informação disponível sobre os efeitos destes contaminantes presentes nas escozências de áreas ardidas nos ecossistemas de rio é escassa. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de escozências provenientes de incêndios florestais: (1) nos decompositores microbianos, examinando a perda de massa foliar, a diversidade e a atividade dos fungos aquáticos e (2) no consumo de folha pelos invertebrados detritívoros. Para isso, foram preparados extratos aquosos de cinzas, diluindo as cinzas em água nas proporções 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100%, de maneira a simular as escozências provenientes das áreas ardidas. Em microcosmos, estes extratos foram usados para testar os efeitos na decomposição microbiana da folhada, nas taxas de esporulação e na biomassa de fungos associados às folhas em decomposição, bem como no comportamento alimentar do invertebrado detritívoro *Allogamus ligonifer*.

3. Material e métodos

3.1. Local de amostragem

O local de amostragem usado para a colonização microbiana da folhada, situa-se no rio Algeriz (Bacia do rio Cávado), um rio de baixa ordem, localizado no nordeste de Portugal (41° 350' N 8° 220' W). Neste rio, a vegetação ripícola dominante é constituída por *Eucalyptus globulus* Labill., *Quercus robur* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. e *Rubus* sp. A caracterização físico-química da água do rio no local de amostragem foi feita pela determinação *in situ* do pH, da condutividade, do oxigénio dissolvido e da temperatura utilizando a sonda Multiline F/set 3 n° 400327. A água do rio Algeriz apresentou baixa condutividade (31 $\mu\text{S cm}^{-1}$), alta concentração de oxigénio dissolvido (99,2%) sendo o pH ligeiramente ácido (Tabela 1). Ainda no local, foram recolhidas amostras de água em garrafas de plástico e transportadas numa caixa de refrigeração (4°C) até ao laboratório para determinação da concentração de nutrientes inorgânicos por métodos espectrofotométricos utilizando o HACH DR/2000 (Hach, Loveland, CO) de acordo com o protocolo descrito pelo fornecedor. As concentrações de nutrientes obtidas foram: nitratos (0,02 $\text{mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$); nitritos (0,003 $\text{mg L}^{-1} \text{NO}_2^-$); fósforo (0,01 $\text{mg L}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$) e amónia (<0,01 $\text{mg L}^{-1} \text{NH}_3$) (Tabela 1).

Tabela 1. Características físicas e químicas da água do rio Algeriz

Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	31
Oxigénio dissolvido (%)	99,2
pH	6,41
Temperatura ($^{\circ} \text{C}$)	12
NO_3^- (mg L^{-1})	0,02
NO_2^- (mg L^{-1})	0,003
PO_4^{3-} (mg L^{-1})	0,01
NH_3 (mg L^{-1})	<0,01

3.2. Colonização microbiana da folhada

Folhas de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn (amieiro), colhidas em setembro de 2012, imediatamente antes da abscisão, foram postas a secar, à temperatura ambiente, durante duas semanas. Posteriormente, as folhas foram lixiviadas em água desionizada durante 72 horas. Após lixiviação, as folhas foram cortadas em discos com 12 mm de diâmetro. Conjuntos de 30 discos de folhas foram posteriormente colocados em sacos de malha de rede com 0,5 mm (16 x 20 cm) sendo posteriormente colocados no rio para permitir a colonização microbiana. Após 11 dias de imersão no rio, os sacos foram recolhidos e transportados para o laboratório para posterior utilização na experiência em microcosmos.

3.3. Caracterização da área de recolha das cinzas

As cinzas utilizadas na experiência foram recolhidas após um incêndio florestal ocorrido em setembro de 2012 na localidade da Várzea, Viseu, centro de Portugal. A área ardida correspondeu a povoamento de pinheiro (*Pinus pinaster*, Ainton). O incêndio, considerado de severidade moderada-alta, consumiu uma área total de 3 000 hectares.

3.3.1. Obtenção dos extratos de cinzas e extratos aquosos de cinzas

Para preparar os extratos aquosos de cinzas, as cinzas foram moídas num moinho de café e secas numa estufa a 42°C, durante três dias. Seguidamente, as cinzas moídas foram passadas por um crivo com uma malha de 0,35 mm sendo o pó resultante, mantido no escuro, até à preparação das soluções. As soluções foram preparadas pesando as cinzas e diluindo-as em água na proporção (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100%). O 0% corresponde ao controlo, ou seja, sem adição de cinzas. Todas as soluções foram sonicadas (VWN, P Selecta-Ultrasons, nº 383350) durante aproximadamente uma hora sendo posteriormente arrefecidas em gelo para utilização nos microcosmos (Tabela 2).

Tabela 2. Preparação das soluções correspondentes a cada concentração a ser testada

Concentração(%)	Quantidade cinza (mg)	Volume água (mL)
5	11,25	300
10	22,5	300
20	45	300
40	90	300
60	135	300
80	180	300
100	225	300

Os discos de folhas recolhidos de cada saco foram lavados com água desionizada e transferidos para frascos Erlenmeyer de 150 mL com as soluções correspondentes a cada nível de concentração a ser testado num volume final de 70 mL. Foram feitas 4 réplicas por tratamento. Todos os microcosmos foram mantidos protegidos da luz sob agitação (140 rpm Certomat BS 3; Braun, Melsungen, Germany) durante 21 dias a 16°C. As soluções dos microcosmos foram renovadas a cada 7 dias. No final da experiência, as suspensões de conídias foram preservadas com formaldeído (37%) e Triton X-100 (15%), a 16°C, até à contagem e identificação das conídias. Os discos de folhas de cada microcosmo foram recolhidos e lavados com água desionizada para estimar a perda de massa foliar e a biomassa dos fungos.

3.3.2. Caracterização química das cinzas e extratos aquosos de cinzas

O extrato aquoso de cinzas (EAC) correspondente à concentração 100% (C100) foi analisado para quantificação de metais e PAHs. Os PAHs foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) segundo o método DIN 38407-F39. A determinação dos metais presentes nos EAC foi feita por digestão assistida por microondas, segundo o método DIN EN ISO 17294-2. As análises foram efetuadas num laboratório de análises acreditado de acordo com a norma DIN EN ISO / IEC 17025 ao abrigo do sistema de acreditação DAkkS Alemão. A análise de nutrientes (azoto total - TN; fósforo total – TP e nitratos – N-NO₃-) foi efetuada por colorimetria, recorrendo a um analisador por injeção em fluxo (FOSS FIAstar 5000 Analyser) de acordo com as normas ISO 15681-1, ISO 11905 e ISO 13395, respetivamente.

3.4. Perda de massa foliar

No final da experiência, os discos de folhas de cada tratamento foram congelados, liofilizados e pesados. Um conjunto de discos de folhas colonizadas foram usados para estimar a massa seca inicial das folhas usadas na experiência de microcosmo. A perda de massa foliar foi determinada como sendo a diferença entre o peso dos discos de folha no início da experiência e o peso dos discos de folha no final da experiência sendo a diferença transformada em percentagem.

3.5. Esporulação de fungos

Após os 21 dias de exposição das folhas em microcosmos, as suspensões de conídias foram filtradas (5 mm tamanho do poro Millipore, Billerica, MA) e as conídias retidas no filtro foram coradas com 0,05% de azul de algodão em ácido láctico. Para determinar a contribuição de cada espécie de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídias, as conídias retidas nos filtros foram contadas e identificadas ao microscópio ótico (Leica Biomed, Heerbrug, Switzerland) na ampliação de 400x. Foram contadas cerca de 300 conídias por lâmina.

3.6. Biomassa de fungo

Para avaliar a biomassa de fungos associados à folhada, foi quantificada a concentração de ergosterol, que é uma molécula presente na membrana dos fungos e que pode ser usado como uma medida da biomassa de fungos viáveis. Para isso foram usados 6 discos de folhas de cada réplica, previamente liofilizados e pesados. Os lípidos foram extraídos dos discos de folhas por aquecimento (80°C durante 30 minutos) numa solução de KOH em metanol a 0,8% (p/v) sendo o extrato purificado por extração em fase sólida (Sep-Pak, Waters) e eluído em isopropanol. A quantificação do ergosterol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num sistema Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series (Thermo Scientific). O sistema consistiu numa bomba e num detetor UV ligados a um computador controlo, equipado com uma coluna RP18 Lichrospher com 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. A eluição do ergosterol da coluna foi realizada isocraticamente com uma solução de metanol para HPLC (Fisher

Scientific) a um fluxo de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ e o pico do ergosterol foi observado a 282 nm. A quantificação do ergosterol foi feita através duma curva de calibração obtida a partir de uma solução *stock* de ergosterol em isopropanol (200 mg ml^{-1}). Posteriormente, as concentrações de ergosterol foram convertidas em biomassa de fungo usando um fator de conversão de 5,5 mg de ergosterol g^{-1} de massa de fungo (Gessner e Chauvet, 1993).

3.7. Experiência de alimentação

Para avaliar o comportamento alimentar de um invertebrado detritívoro foi utilizada a espécie *Allogamus ligonifer* (McLachlan, 1876), um invertebrado pertencente à família Limnephilidae, bastante comum nos rios de baixa ordem do norte de Portugal (Varandas e Cortes, 2010). Os animais foram recolhidos no Rio Cávado e colocados em recipientes de plástico contendo água do rio e areia sendo transportados para o laboratório numa caixa refrigerada (4°C). No laboratório, os animais foram colocados num aquário com água e areia e mantidos sob arejamento à temperatura 16°C . Os animais foram alimentados com folhas de *A. glutinosa* (amieiro) durante duas semanas antes do início da experiência. Os animais usados na experiência (40 animais), tinham cerca de $14 \pm 1 \text{ mm}$ de comprimento e foram postos em jejum durante 24 horas antes da realização da experiência. Quinze discos de folhas, previamente colonizados no rio e expostos às diferentes concentrações de extratos aquosos de cinzas, foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 150 mL com as soluções correspondentes a cada nível de concentração a ser testado, num volume final de 70 mL. Foram feitas quatro réplicas por tratamento, utilizando um animal por réplica. Todos os microcosmos foram arejados com bombas de aquário e mantidos à temperatura de 16°C , durante 7 dias, sendo as soluções renovadas a cada 4 dias para remover os compostos excretados pelos animais. No decorrer da experiência, a sobrevivência dos animais foi registada duas vezes por dia. No final da experiência os discos de folhas e os animais de cada tratamento foram congelados e, posteriormente, liofilizados. A massa seca de folha (DM) consumida pelos invertebrados (Le) foi determinada como $(\text{Li}-\text{Lf})$, onde Li é o peso inicial da massa de folha seca (g) fornecida aos animais e Lf o peso da massa de folha seca (g) no final da experiência de alimentação. A taxa de consumo da folha foi calculada como $\text{Le}/(\text{Lf} \times t)$ onde Lf é a massa seca do animal e t o tempo de exposição (7 dias). Os resultados foram expressos em $\text{mg folha DM mg}^{-1} \text{ animal DM d}^{-1}$ (Ferreira et al., 2010).

3.8. Tratamento estatístico dos dados

Para testar a decomposição da folhada pelos microrganismos e invertebrados detritívoros em função das diferentes concentrações de extratos aquosos de cinzas, foram feitas regressões lineares.

Com o intuito de verificar a existência de efeitos significativos ($\alpha = 0,05$) entre o controlo e as diferentes concentrações de cinzas na taxa de esporulação e biomassa de fungo foram efetuadas análises de variância unifatorial (one way ANOVA). A distribuição dos dados e a homogeneidade da variância foram previamente testadas através da aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov e do teste de Bartlett, respetivamente (Zar, 2009). Todos estes testes foram efetuados usando o *software* Graph Pad Prism 5 (GraphPad software Inc., San Diego, CA).

4. Resultados

4.1. Concentrações de PAHs e metais nos extratos aquosos de cinzas

A caracterização química dos extratos aquosos de cinzas (EACs), no que respeita à concentração de PAHs e de metais, é apresentada, respetivamente, na Tabela 3 e Tabela 4. As análises dos EACs não foram sujeitos a filtração, logo a caracterização química corresponde ao total (fração dissolvida + fração particulada). A análise de PAHs no nosso estudo incluiu a caracterização de 16 PAHs considerados poluentes prioritários por parte da Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA). De entre os PAHs testados nos extratos aquosos de cinzas, o fenantreno foi o único PAH detetado, com uma concentração de 30 ng L^{-1} . Os restantes PAHs apresentavam valores abaixo do limite de quantificação (LQ; $<10 \text{ ng L}^{-1}$) (Tabela 3). A nível Europeu, segundo a diretiva relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água (2008/105/CE), apenas 8 destes PAHs são considerados poluentes prioritários: o naftaleno, o antraceno, o benzo(a)-pireno, o fluoranteno, o benzo(b)-fluoranteno, o benzo(g,h,i)-perileno e o indeno(1,2,3)-pireno. Os valores das concentrações máximas admissíveis para estes compostos de acordo com a Norma de Qualidade Ambiental (NQA-CMA) estão especificados na Tabela 3.

Nos EACs, o metal presente em maior quantidade foi o Cr ($98 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) com uma concentração de mais do dobro do valor do segundo composto presente em maior concentração, o Mn ($41 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Os metais presentes em menor quantidade foram o Cu ($16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e o Ni ($6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), sendo que os restantes metais se encontravam a baixo dos limites de quantificação ($<\text{LQ}$) (Tabela 4). De entre os metais presentes nos EACs, apenas 3 (Cd; Ni e Pb) constam da lista de poluentes prioritários, segundo a diretiva relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água (2008/105/CE). Os valores de NQA-CMA encontram-se especificados na Tabela 4.

Tabela 3. Concentração de PAHs presentes nos extratos aquosos de cinzas (EACs) e concentrações máximas admissíveis para estes compostos, de acordo com a Norma de Qualidade Ambiental (NQA-CMA) estabelecida com base na diretiva 2008/105/CE, no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água, para águas de superfície interiores. LQ – limite de quantificação.

PAHs	Nº anéis de benzeno	EAC (ng L ⁻¹)		NQA-CMA (ng L ⁻¹)
		LQ	Quantificação	
Naftaleno	2	10	<LQ	N.A ¹
Acenaftileno	3	10	<LQ	-
Acenafteno	3	10	<LQ	-
Fluoreno	3	10	<LQ	-
Fenantreno	3	10	30	-
Antraceno	3	10	<LQ	0,4
Fluoranteno	4	10	<LQ	1
Pireno	4	10	<LQ	-
Benzo(a) Antraceno	4	10	<LQ	-
Criseno	4	10	<LQ	-
Benzo(b)fluoranteno	5	10	<LQ	N.A
Benzo(k)fluoranteno	5	10	<LQ	N.A
Benzo(a) pireno	5	10	<LQ	0,1
Indeno(1,2,3-cd) pireno	6	10	<LQ	N.A
Dibenz(a,h)antraceno	5	10	<LQ	-
Benzo(g,h,i)perileno	6	10	<LQ	-
Soma PAHs			30	

¹ N.A Não aplicável

Tabela 4. Concentração de metais presentes nos EACs e concentrações máximas admissíveis para estes compostos de acordo com a Norma de Qualidade Ambiental (NQA-CMA) estabelecida com base na diretiva 2008/105/CE, no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. LQ – limite de quantificação.

Metais	EAC (µg L ⁻¹)		NQA-CMA (µg L ⁻¹)
	LQ	Quantificação	
Manganês	5	41	-
Cobre	5	16	-
Zinco	10	40	-
Chumbo	5	<LQ	N.A
Níquel	5	6	N.A
Crómio	5	98	-
Vanádio	10	<LQ	-
Arsénio	5	<LQ	-
Cobalto	5	<LQ	-
Cádmio	1	<LQ	1,5
Molibdénio	20	<LQ	-

A análise da concentração de nutrientes presentes nos extratos de cinzas mostrou a presença de fósforo total (TP, 0,539 mg L⁻¹), azoto total (TN, 2,402 mg L⁻¹) e NO₃⁻ (0,216 mg L⁻¹) (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração total de nutrientes presentes nos extratos de cinzas

Nutrientes	Concentração (mg L ⁻¹)
Fósforo total	0,539
Azoto total	2,402
NO ₃ ⁻ -N	0,216

4.2. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na decomposição das folhas pelos hifomicetos aquáticos

A decomposição microbiana da folhada de amieiro em microcosmos expostos aos extratos aquosos de cinzas variou entre 37,7 % no controlo e 56,4% nos extratos mais concentrados (Figura 1). O aumento gradual da concentração dos extratos aquosos de cinzas afetou significativamente a decomposição microbiana da folhada (regressão linear, $p=0,0011$; $r^2=0,3026$; $y= 0,1392x-292,6$) (Figura 1).

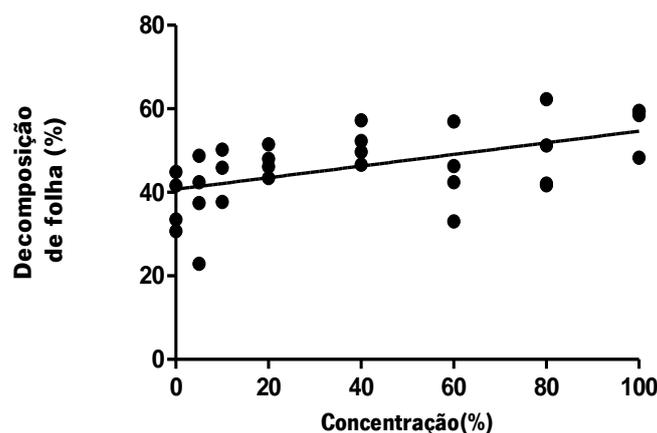


Figura 1. Regressão linear da percentagem de decomposição microbiana da folhada de amieiro em função da concentração dos extratos aquosos de cinzas. As folhas de amieiro foram colonizadas no rio Algeriz e expostas em microcosmos aos extratos aquosos de cinzas durante 21 dias. Regressão linear ($y= 0,1392x-292,6$; $r^2=0,3026$; $p=0,0011$). Os números no eixo do X indicam a percentagem de diluição do extrato (100% = extrato não diluído).

4.3. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na diversidade de fungos aquáticos

Durante a experiência em microcosmos foram observados um total de 22 espécies de hifomicetos aquáticos. Os taxa dominantes de fungos foram as espécies *Articulospora tetracladia* e *infundibura* sp. A espécie *Lemonnieria aquatica* mostrou uma maior contribuição para o total de conídias produzidas nos microcosmos controlo (0%:27,3%) e no tratamento com a concentração mais baixa de extrato de cinzas (5%:17,9%), diminuindo para menos de metade a sua contribuição para a produção de total de esporos nos tratamentos com concentrações mais elevadas de extratos aquosos de cinzas (20% a 100%).

Tabela 6. Percentagem de contribuição de cada taxa de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídias em folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas a crescentes concentrações de extratos aquosos de cinzas (EACs) durante 21 dias em microcosmos. 0%, sem adição de extrato de cinzas; 100%, extrato não diluído.

Espécies	Concentração EAC (%)							
	0	5	10	20	40	60	80	100
<i>Alatospora pulchella</i> Marvanová	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Anguillospora filiformis</i> Greathead	-	-	1,0	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1
<i>Articulospora tetracladia</i> Ingold	51,4	59,6	54,4	42,0	46,2	45,5	54,3	59,3
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	1,3	0,3	-	-	0,2	0,3	0,1	-
<i>Flagellospora penicillioides</i> Ingold	1,6	1,1	0,2	0,5	1,1	0,7	0,5	0,2
<i>Flagelospora</i> sp	23	0,8	1,9	2,8	5,1	2,2	5,3	1,9
<i>Fontanospora</i> sp	0,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fontanospora eccentrica</i> R.H. Petersen	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-
<i>Fontanospora fusiramosa</i> Maronavá	-	-	-	-	-	0,3	-	-
<i>Fusarium</i> sp	-	-	0,2	-	0,1	-	-	-
<i>Geniculospora inflata</i> (Ingold) Sv.Nilsson	-	-	-	-	0,1	-	-	0,5
<i>Heliscella stellata</i> Ingold e Cox	2,0	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	-
<i>Heliscus lugdunensis</i> Sacc. et Théry	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>Infundibura</i> sp	15,6	18,3	32,1	47,53	42,7	47,3	23,1	30,6
<i>Lemonnieria aquatica</i> De Wildeman	27,3	17,9	8	5,9	3,9	2,5	5,8	6,9
<i>Lemonnieria terrestris</i> Tubaki	1,3	0,6	0,1	-	-	-	-	-
<i>Lunulospora curvula</i> Ingold	1,7	1,1	1,4	0,9	0,5	0,5	1,4	0,4
<i>Tetrachaetum elegans</i> Ingold	-	-	0,2	-	0,3	-	0,2	0,1
<i>Tricladium chaetocladium</i> Ingold	0,1	-	-	0,2	0,4	0,2	0,3	-
<i>Tricladium splendens</i> Ingold	-	-	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1
<i>Triscelophorus acuminatus</i> Ingold	-	-	-	-	-	-	0,4	-
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	0,1	-	0,1	0,3	0,2	0,2	0,3	-
Nº total de espécies	13	10	15	12	14	12	14	10

4.4. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na taxa de esporulação de fungos

Após 21 dias em microcosmos, a taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos variou entre $4,7 \times 10^5$ conídias g^{-1} folha DM d^{-1} no controlo (0%) e $7,7 \times 10^5$ conídias g^{-1} folha DM d^{-1} na concentração mais elevada de extrato (100%) (Figura 2). As taxas de esporulação dos hifomicetos aquáticos não foram significativamente afetadas pelo aumento da concentração dos extratos aquosos de cinzas (one-way ANOVA, $p > 0,05$).

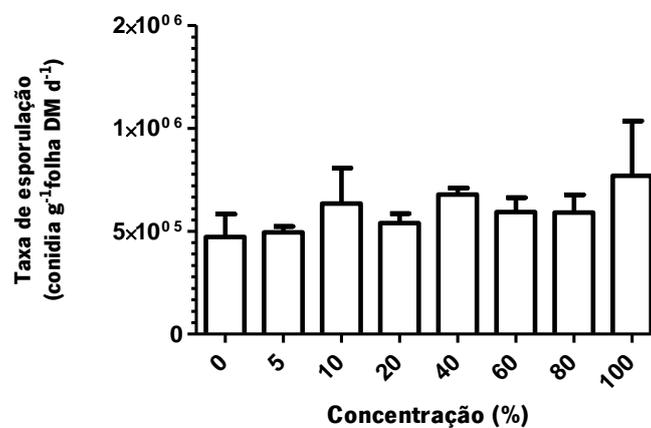


Figura 2. Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos associados às folhas de amieiro em decomposição expostas a concentrações crescentes de extratos aquosos de cinzas. As folhas de amieiro foram colonizadas no rio Algeriz e expostas em microcosmos aos extratos aquosos de cinzas durante 21 dias.

4.5. Efeito dos extratos aquosos de cinzas na biomassa dos fungos

A biomassa dos fungos associada às folhas de amieiro em decomposição variou entre 62,6 mg g^{-1} folha DM no controlo (0%) e 65,5 mg g^{-1} folha DM na concentração correspondente a 100%. A biomassa fúngica não foi significativamente afetada pelo aumento da concentração de EACs (Figura 3; one-way ANOVA, $p > 0,05$).

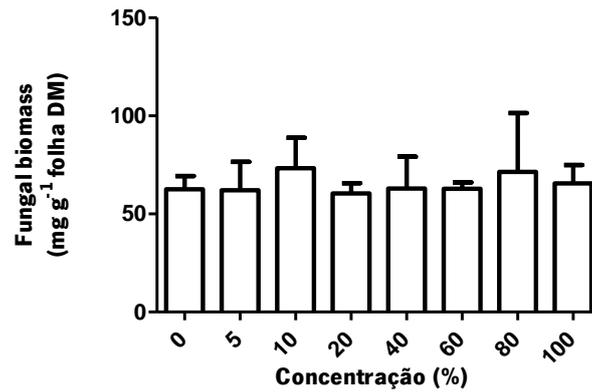


Figura 3. Biomassa de fungos associada às folhas de amieiro em decomposição expostas a concentrações crescentes de extratos aquosos de cinzas. As folhas de amieiro foram colonizadas no rio Algeriz e expostas em microcosmos aos extratos aquosos de cinzas durante 21 dias.

4.6. Efeitos das concentrações de extratos aquosos de cinzas no consumo de folhada pelos invertebrados detritívoros

A taxa de consumo de folha pelo invertebrado *A. ligonifer* durante os 7 dias de experiência em microcosmos variou entre 0,07 g folha DM g⁻¹ animal DM dia⁻¹ no controlo (0%) e 0,16 g folha DM g⁻¹ animal DM dia⁻¹ na concentração correspondente a 100% (Figura 4). O aumento da concentração dos extratos aquosos de cinzas afetou significativamente a taxa de consumo de folha (regressão linear, $p = 0,0017$; $r^2 = 0,3013$; $y = 0,0007969x - 76,68$) (Figura 4).

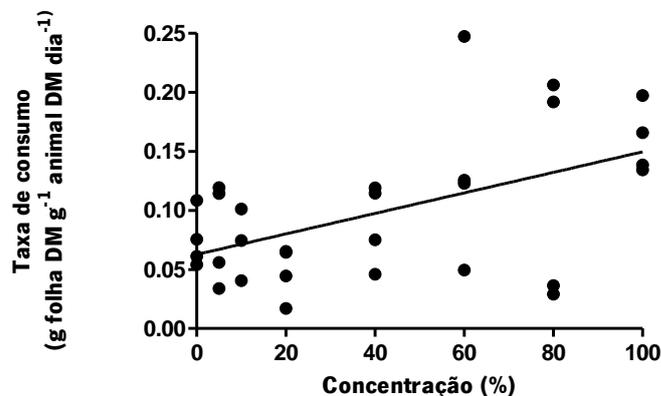


Figura 4. Taxa de consumo de folha de amieiro pelos invertebrados detritívoros expostos 7 dias em microcosmos a diferentes concentrações de extratos aquosos de cinzas (Regressão linear, $y = 0,0007969x - 76,68$, $r^2 = 0,3013$; $p = 0,0017$)

5. Discussão

Os incêndios florestais através do transporte e exportação de substâncias pirolíticas potencialmente tóxicas, como os metais e os PAHs, podem constituir uma fonte de poluição difusa para os ecossistemas aquáticos, comprometendo a qualidade da água e a integridade ecológica desses ecossistemas. No presente trabalho, a caracterização química efetuada aos extratos aquosos de cinzas (EACs) permitiu quantificar apenas um PAH, o fenantreno (30 ng L^{-1}), foi possível quantificar estando todos os restantes PAHs abaixo do limite de quantificação. Uma vez que a solubilidade dos PAHs é inversamente proporcional ao seu peso molecular, os PAHs com menor peso molecular (2-3 anéis benzénicos) como o fenantreno e o naftaleno, são geralmente mais solúveis comparativamente aos PAHs com maior número de anéis benzénicos (4-6 anéis benzénicos) (Geffard et al., 2003). Alguns estudos demonstram que, de todos os PAHs que atingem os cursos de água após os incêndios, os PAHs de menor peso molecular predominam face aos PAHs de maior peso molecular, sendo o fenantreno um dos PAHs presente em maior concentração (e.g. Olivella et al., 2006; Vila-Escalé et al., 2007). No estudo de Campos et al. (2012), embora o benzo(a)-antraceno (BaA), com 4 anéis benzénicos, tenha estado presente em maior concentração na fração dissolvida, é dado igualmente destaque ao naftaleno e ao acenaftileno, ambos constituídos por 2 anéis benzénicos. No presente estudo, todos os PAHs considerados como poluentes prioritários segundo a Diretiva 2008/105/EC 2008, encontravam-se abaixo do limite de quantificação, não representando, deste modo, um risco para a qualidade das águas superficiais interiores (rios e lagos). No que respeita ao fenantreno, a concentração obtida neste trabalho (30 ng L^{-1}) foi inferior às concentrações encontradas para o mesmo composto em rios da Grécia (Manolli et al., 2000). Também, outros estudos em rios Europeus (e.g. Fernandes et al., 1997; Gotz et al., 1998; Olivella et al., 2006; Vila-Escalé et al., 2007) mostraram uma concentração de PAHs superior à encontrada no nosso estudo.

A análise dos dados dos metais presentes nos EACs, mostrou que o crómio ($98 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), o zinco ($40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), o manganês ($41 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e o cobre ($16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) foram os metais presentes em maior concentração. Todos estes metais são considerados essenciais, sendo o Zn e o Cu importantes constituintes de enzimas como a citocromo oxidase e a superóxido dismutase (Walker et al., 1996). Num estudo onde se pretendeu simular as escorrências, a partir de uma amostra de cinzas colhida numa zona ardida no sul da Califórnia, foram encontradas concentrações de

elementos como o Cr, Mn, Zn, Pb e As $<0,005 \text{ mg L}^{-1}$ (Plumlee et al., 2007). Contudo, após um incêndio em Cerro Grande, no Novo México (E.U.A) algumas amostras revelaram concentrações consideráveis de elementos como o Mn (102 mg L^{-1}), Zn ($3,6 \text{ mg L}^{-1}$), As ($0,14 \text{ mg L}^{-1}$), Al (995 mg L^{-1}), Cr ($0,51 \text{ mg L}^{-1}$) e Pb ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$) (Gallaher et al., 2002). Também em amostras recolhidas do rio Buckland, após um incêndio, foram reportados elementos como As ($0,28 \text{ mg L}^{-1}$), Cr ($0,92 \text{ mg L}^{-1}$), e Pb ($0,98 \text{ mg L}^{-1}$) (Leak et al., 2003) em concentrações muito superiores aos obtidos nos nossos extratos.

Comparativamente com dados da literatura (Campos et al., 2012), os EACs utilizados neste estudo sugerem que a concentração de PAHs presentes era substancialmente inferior à obtida em escorrências que ocorrem naturalmente após incêndios florestais. Deste modo, podemos inferir que a quantidade de cinzas bem como as diluições efetuadas que utilizámos para preparação dos EACs podem ter resultado numa quantidade de substâncias pirolíticas inferior ao que seria de esperar em escorrências que ocorrem naturalmente após incêndio. Além disso, devido à baixa solubilidade dos PAHs em água, o método de agitação a que foram submetidos os extratos poderá ter levado a uma menor dissolução destes componentes na água, atenuando os possíveis efeitos adversos dos PAHs e dos metais presentes nas cinzas.

A quantificação de nutrientes nos EACs usados no nosso estudo revelou uma concentração de fósforo total (TP) de $0,539 \text{ mg L}^{-1}$, de azoto total (TN) de $2,402 \text{ mg L}^{-1}$ e de nitratos (NO_3^-) de $0,216 \text{ mg L}^{-1}$. Após um incêndio, a concentração destes nutrientes na água pode variar consideravelmente. No que concerne ao contributo dos incêndios para a concentração de nutrientes na água, é referido que os valores de TP e de TN podem aumentar entre 5-60 vezes alguns dias após incêndio (Spencer e Hauer, 1991). Segundo estes autores, foram registados valores máximos de TP de $0,21 \text{ mg L}^{-1}$, de TN de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ e de NO_3^- de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ como consequência do incêndio. Já Leak et al. (2003), 3 meses após a ocorrência de um incêndio em Virgínia, encontraram valores máximos de TN de 410 mg L^{-1} e de TP de 110 mg L^{-1} registados no rio Buckland.

No presente estudo, os EACs não pareceram ser tóxicos para microrganismos decompositores e o aumento da concentração dos compostos nos EACs estimulou a decomposição da folhada por parte dos microrganismos. Estes resultados foram opostos ao verificado por Campos et al. (2012), onde as escorrências provenientes de áreas ardidas causaram toxicidade em organismos de níveis tróficos distintos. Comparando os perfis de PAHs dos nossos EACs e das

escorrências usadas nos ensaios ecotoxicológicos por Campos et al. (2012), algumas diferenças são verificadas, nomeadamente na composição de PAHs. Nos EACs utilizados no nosso estudo, apenas foi detetada a presença de fenantreno, enquanto nas escorrências provenientes de áreas ardidas foram detetados 5 PAHs ($\sum 90 \text{ ng L}^{-1}$) na fase dissolvida, e 8 PAHs ($\sum 1,104 \text{ ng L}^{-1}$) na fase particulada, sendo os PAHs dominantes o benzo(a) antraceno, o naftaleno, e o acenaftileno (Campos et al., 2012)). Estas diferenças na concentração e na composição em PAHs, nomeadamente a presença de Naftaleno, podem estar na origem da diferença de toxicidade observada entre os dois estudos, uma vez que o Naftaleno, um PAH de baixo peso molecular (2 anéis benzénicos), e portanto mais solúvel em água, tende a produzir efeitos tóxicos mais acentuados, pois está mais biodisponível para os organismos (Campos et al., 2012; Kayal e Connel, 1995). Além disso, alguns estudos demonstram que os nutrientes presentes na água, mesmo a elevadas concentrações, podem estimular a decomposição microbiana da folhada (Gulis e Suberkropp 2003; Niyogi et al., 2003). Deste modo, as concentrações de fósforo (P) e azoto (N) presentes nos EACs podem ter estimulado a decomposição da folhada por parte dos microrganismos. Alguns estudos sugerem que certas espécies de hifomicetes aquáticos são capazes de tolerar altas concentrações de metais, nomeadamente cádmio (Guimarães-Soares et al., 2007), e PAHs (Moreirinha et al., 2011), bem como metabolizar PAHs (Augustin et al., 2006). Apesar dos contaminantes que entram nos rios como os metais e os PAHs poderem ocorrer simultaneamente, poucos estudos consideram o efeito interativo destes dois tipos de contaminantes. Num estudo onde foram testados os efeitos de misturas de cádmio e fenantreno no processo de decomposição da folhada por microrganismos, verificou-se que houve um aumento da inibição da biomassa de fungos, bem como uma diminuição da diversidade de hifomicetes aquáticos nos tratamentos com misturas dos dois tóxicos, sugerindo que a presença do fenantreno acentua os efeitos negativos do cádmio na diversidade e atividade dos fungos aquáticos decompositores (Moreirinha et al., 2011). Em contraste com esta evidência, Gust e Fleeger (2006) verificaram que o fenantreno diminui a toxicidade do Cd (efeito antagonista) na taxa de alimentação da oligoqueta *Ilyodrilus templetoni*. Apesar dos efeitos que estes compostos podem ter nos organismos, as concentrações de PAHs e metais usadas nos trabalhos acima descritos foram bastante superiores aos valores presentes nos EACs usados no nosso estudo. Além disso, alguns estudos demonstram que pequenas doses ($0,015\text{-}1,5 \text{ mg L}^{-1}$) de metais como o Cd, podem acelerar a decomposição dos detritos vegetais pelos microrganismos (Batista et al., 2012) bem como estimular a reprodução e o crescimento de alguns organismos, como os

caracóis aquáticos (Lefcort et al., 2008) e as bactérias aquáticas luminescentes (Shen et al., 2009).

As taxas de esporulação dos fungos associados à folhada não foram afetadas significativamente pela exposição aos EACs usados no presente estudo, embora um ligeiro aumento da taxa de esporulação tenha sido observado na concentração mais elevada de EAC. Apesar dos resultados de outros estudos indicarem que as taxas de esporulação dos hifomicetos aquáticos são bastante sensíveis a diferentes stressores, como os metais e os PAHs (Duarte et al., 2008, Moreirinha et al., 2011), no nosso caso, as concentrações do fenantreno e dos metais presentes nos EACs pareceram não ter sido suficientes para induzir mudanças significativas nas taxas de esporulação dos hifomicetos aquáticos e, portanto, não comprometeram a sua reprodução. Além disso, alguns metais, como o zinco, podem, em pequenas doses, estimular a produção de conídias por parte dos hifomicetos aquáticos (Duarte et al., 2004). A contribuição relativa das espécies de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídias não variou significativamente com a concentração de EACs. No entanto, verificou-se que a espécie *Infundibura sp* aumentou a sua contribuição para quase o dobro entre o controlo e a concentração máxima de EAC, e que a espécie *Lemonniera aquatica* diminuiu a sua contribuição para cerca de 1/3 entre o controlo e as concentrações mais elevadas de EACs.

A produção de biomassa de fungos na folhada em decomposição, não foi afetada pela exposição às diferentes concentrações de EACs. Estes resultados vão ao encontro dos observados por Earl e Blinn (2003) em que a produção de biomassa associada às comunidades de macroinvertebrados não foi significativamente afetada pelas cinzas provenientes de áreas aridas. Alguns estudos demonstram que algumas espécies de hifomicetos aquáticos parecem ser tolerantes a metais. A exposição a metais, como o zinco ou o cádmio ($< 1,2 \text{ mg L}^{-1}$) não afetaram significativamente a produção de biomassa de fungos associados a folhada em decomposição (Duarte et al., 2004; Moreirinha et al., 2011). Além disso, os fungos parecem ser menos sensíveis aos metais do que as bactérias, como verificado pelos efeitos na biomassa produzida por estes microrganismos quando associados a folhas em decomposição (Duarte et al., 2008).

As folhas de amieiro são altamente nutritivas, e o seu valor nutritivo aumenta ainda mais após colonização pelos hifomicetos aquáticos (Graça, 2001). Efetivamente, os microrganismos aumentam a palatabilidade da folhada para os invertebrados detritívoros. No nosso estudo, a

taxa de decomposição da folhada pelos invertebrados detritívoros da espécie *Allogamus ligonifer* foi estimulada pelo aumento da concentração de EACs, o que seria de esperar, uma vez que a decomposição microbiana também foi estimulada pelo aumento da concentração de EACs. Os nossos resultados sugerem que mesmo nas concentrações mais elevadas, os microrganismos foram capazes de promover a palatabilidade das folhas para o invertebrado *A. ligonifer*. Além disso, a presença de nutrientes nos EACs pode ter atenuado os possíveis efeitos tóxicos dos PAHs e dos metais, como verificado por Campos et al. (2012).

6. Considerações finais

A exposição aos extratos aquosos de cinzas (EACs) utilizados neste trabalho estimulou a decomposição microbiana da folhada, bem como a taxa de consumo foliar pelo invertebrado detritívoro *A. ligonifer*. Contudo, as taxas de esporulação dos hifomicetos aquáticos e a biomassa de fungos associados à folhada não foram afetadas pela exposição aos EACs. A análise química efetuada aos EACs utilizados neste trabalho, revelou a presença de apenas um PAH, o fenantreno, e de alguns metais como Cr, Zn, Mn e Cu. Comparativamente aos dados da literatura para escorrências provenientes de áreas ardidas e que causam toxicidade a algumas espécies aquáticas (Campos et al., 2012), a composição e a concentração em PAHs nos EACs usados neste trabalho foi notavelmente inferior. Além disso, a presença de metais essenciais em baixas concentrações bem como de nutrientes limitantes como P e N poderão ter contribuído para o aumento da atividade dos microrganismos e, portanto, para uma maior decomposição da folha. Aliado a este estímulo da atividade decompositora microbiana, o aumento da palatabilidade das folhas assegurou um maior consumo por parte dos invertebrados detritívoros.

Será importante salientar que a utilização de EACs visou mimetizar as escorrências provenientes de áreas ardidas. Neste sentido, ainda que as cinzas utilizadas para preparação dos extratos tenham sido de origem natural, a quantidade de cinzas utilizada no presente estudo, e o modo de preparação dos EACs, poderá não reproduzir a composição e concentração dos compostos presentes nas escorrências que ocorrem naturalmente nos rios. Uma vez que no ambiente natural a concentração de cinzas está dependente de vários fatores, torna-se difícil avaliar qual a quantidade de cinzas a utilizar de modo a melhor mimetizar as escorrências provenientes de áreas ardidas. Não obstante, podemos inferir que as concentrações de cinzas utilizadas na preparação dos nossos EACs possam ter resultado numa concentração de substâncias pirolíticas (PAHs e metais) muito inferior ao que seria de esperar em rios sob influência de áreas ardidas. Além disso, as respostas dos organismos à exposição aos EACs devem ser interpretados com cuidado pois é importante considerar que todos os ensaios foram realizados em condições laboratoriais controladas. Assim, deveremos ter em conta que todos os fatores bióticos e abióticos que exercem a sua influência num ambiente natural, podem levar a respostas diferentes daquelas descritas neste estudo.

7. Referências Bibliográficas

Alegre, S. P., Batista, S., Bugalho, M., Carvalho, T., Catry, F. X., Coelho, C., Correa, C., Esteves, T., Fernandes, P., Ferreira, A. D., Moreira, F., Morgado, R., Nunes, L. F., Paiva, V., Pinheiro, A. Q., Pinho, J., Rego, F., Silva, J. S. e Vallejo, R. 2010. *Ecologia do fogo e gestão de áreas ardidas*: ISA Press.

Allan, J. D. e Castillo, M. M. 2007. *Stream ecology: structure and function of running waters*. 2nd edition, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 436 pages.

Alloway, C. J. 1995. *Heavy Metals in Soils*. Springer-Verlag.

Augustin, T., Schlosser, D., Baumbach, R., Schmidt, J., Grancharov, K., Krauss, G. e Krauss, G. J. 2006. Biotransformation of 1-Naphthol by a Strictly Aquatic Fungus. *Current Microbiology* 52:216-220.

Bärlocher, F., Ed. 1992. *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin.

Bärlocher, F., Canhoto, C. e Graça, M. 1995. Fungal colonization of alder and eucalypt leaves in two streams in Central Portugal. *Archiv für Hydrobiologie* 133:457-470.

Bärlocher, F. 2005. *Freshwater fungal communities. The fungal community: its organization and role in the ecosystem* pp.39-59.

Batista, D., Pascoal, C. e Cássio, F. 2012. Impacts of warming on aquatic decomposers along a gradient of cadmium stress. *Environmental Pollution* 169:35-41.

Britton, D. L. 1991. Fire and the chemistry of a South African mountain stream. *Hydrobiologia* 218:177-192.

Burke, V. J. e Gibbons, J. W. 1995. Terrestrial Buffer Zones and Wetland Conservation: A case study of freshwater turtles in a Carolina Bay. *Conservation Biology* 9:1365-1369.

- Campos, I., Abrantes, N., Vidal, T., Bastos, A. C., Gonçalves, F. e Keizer, J. J. 2012. Assessment of the toxicity of ash-loaded runoff from a recently burnt eucalypt plantation. *European Journal of Forest Research* 131:1889-1903.
- Carrion, J. S., Sánchez-Gómez, P., Mota, J. F., Yll, R. e Chain, C. 2003. Holocene vegetation dynamics, fire and grazing in the Sierra de Gádor, southern Spain. *The Holocene*. 13: 839-849.
- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 4:331-338.
- Cerniglia, C. E. e Sutherland, J. B. 2001. *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi*. In: Gadd, G.M. (Ed.), British Mycological Society Symposium Series, Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, pp.136-187
- Certini, G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143:1-10.
- Chessman, B. C. 1986. Impact of the 1983 wildfires on river water quality in East Gippsland, Victoria. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 399–420.
- Dangles, O., Gessner, M. O., Guerold, F. e Chauvet, E. 2004. Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology* 41:365-378.
- Davis, E. A. 1989. Prescribed fire in Arizona chaparral: Effects on stream water quality. *Forest Ecology and Management* 26:189-206.
- De Schampelaere, K. A. C., Vasconcelos, F. M., Tack, F. M. G., Allen, H. E. e Janssen, C. R. 2004. Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1248-1255.
- DeBano, L. F. 2000. Water repellency in soils: a historical overview. *Journal of Hydrology* 231–232:4-32.

Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial da União Europeia*.348:84-97.

Dobson, M. e Frid, C. 1998. *Ecology of aquatic ecosystems*.Essex: Addison Wesley Longman Limited .

Duarte, S., Pascoal, C. e Cássio, F. 2004. Effects of zinc on leaf decomposition by fungi in streams: studies in microcosms. *Microbial Ecology* 48:366-374.

Duarte, S., Pascoal, C., Alves, A., Correia, A. e Cássio, F. 2008. Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. *Freshwater Biology* 53:91-101.

Earl, S. R. e Blinn, D. W. 2003. Effects of wildfire ash on water chemistry and biota in South-Western U.S.A. streams. *Freshwater Biology* 48:1015-1030.

FAO. 2001. Global Forest Fire Assessment 1990–2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forestry Department, Forest Resources Assessment Programme Working Paper 55, Rome.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. e Geffard, O. 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86: 413-425.

Fernandes, I., Duarte, S., Cássio, F. e Pascoal, C. 2009. Mixtures of zinc and phosphate affect leaf litter decomposition by aquatic fungi in streams. *Science of The Total Environment* 407:4283-4288.

Fernandes, M. B., Sicre, M. A., Boireau, A. e Tronszynski, J. 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34:857– 67.

Ferreira, A. J. D., Coelho, C. O. A., Ritsema, C. J., Boulet, A. K. e Keizer, J. J. 2008. Soil and water degradation processes in burned areas: Lessons learned from a nested approach. *Catena* 74:273-285.

Ferreira, V., Gonçalves, A. N. A. L., Godbold, D. L. e Canhoto, C. 2010. Effect of increased atmospheric CO₂ on the performance of an aquatic detritivore through changes in water temperature and litter quality. *Global Change Biology* 16:3284-3296.

Gallaher, B., Koch, R. e Mullen, K. 2002. Quality of storm water runoff at Los Alamos national laboratory in 2000 with emphasis on the impact of the Cerro Grande fire. Los Alamos National Laboratory LA-13926.

Gama, M., Gonçalves, A. L., Ferreira, V., Graça, M. A. S. e Canhoto, C. 2007. Decomposition of fire exposed eucalyptus leaves in a portuguese lowland stream. *International Review of Hydrobiology* 92:229-241.

Geffard, O., Geffard A., His, E. e Budzinski. H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin* 46: 481-490.

Gerhardt, A., Janssens de Bisthoven, L. e Soares, A. M. V. M. 2004. Macroinvertebrate response to acid mine drainage: community metrics and on-line behavioural toxicity bioassay. *Environmental Pollution* 130:263-274.

Gessner, M. O. e Chauvet, E. 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59:502-507

Gessner, M. O., Chauvet, E. e Dobson, M. 1999. A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos* 85: 377-384.

Goforth, B. R., Graham, R. C., Hubbert, K. R., Zanner, C. W. e Minnich, R. A. 2005. Spatial distribution and properties of ash and thermally altered soils after high-severity forest fire, southern California. *International Journal of Wildland Fire* 14:343-354.

Gotz, R., Bauer, O. H., Friesel, P. e Roch, K. 1998. Organic trace compounds in the water of the river Elbe near Hamburg: Part II. *Chemosphere* 36:2103-18.

Graça, M. A. S. 2001. The Role of Invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a Review. *International Review of Hydrobiology* 86:383-393.

Graça, M. A. S e Canhoto, C. 2006. Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica* 25:1-10.

Gresswell, R. E. 1999. Fire and aquatic ecosystems in forested biomes in North America. *Transactions of the American Fisheries Society* 128:193-221.

Guimarães-Soares, L., Pascoal, C. e Cássio, F. 2007. Effects of heavy metals on the production of thiol-compounds by the aquatic fungi *Fontanospora fusiformis* and *Flagellospora curta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:36-43.

Gulis, V. e Suberkropp, K. 2003. Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microbial Ecology* 45:11-19.

Gupta, S. K. e Singh, J. 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *The IIOAB Journal - Special Issue on Environmental Management for Sustainable Development* 2: 48-57.

Gust, K. e Fleeger, J. 2006. Exposure to cadmium-phenanthrene mixtures elicits complex toxic responses in the freshwater tubificid oligochaete, *ilyodrilus templetoni*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:54-60.

Haggerty, S. M., Batzer, D. P. e Jackson, C. R. 2004. Macroinvertebrate response to logging in coastal headwater streams of Washington, U.S.A. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61:529-537.

Hyde, K., Woods, S. W. e Donahue, J. 2007. Predicting gully rejuvenation after wildfire using remotely sensed burn severity data. *Geomorphology* 86:496-511.

Ignatavičius, G., Sakalauskiene, G. e Oskinis, V. 2006. Influence of land fires on increase of heavy metal concentrations in river waters of Lithuania. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 14: 46-51.

Johansen, M. P., Hakonson, T. E., Whicker, F. W. e Breshears, D. D. 2003. Pulsed redistribution of a contaminant following forest fire. *Journal of Environmental Quality* 32:2150-2157.

Kayal, S. e Connel, D. W. . 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in biota from the Brisbane river estuary, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 40:475–493.

Komarek, E. 1973. Ancient fires Proceedings of the twelfth Tall Timbers Fire ecology conference. Tall Timbers, Tallahassee, Florida, Conference.

Kukkonen, J. e Landrum, P. F. 1995. Measuring assimilation efficiencies for sediment-bound PAH and PCB congeners by benthic organisms. *Aquatic Toxicology* 32:75-92.

Leak, M., Passuello, R. e Tyler, B. 2003. I've seen fire. I've seen rain. I've seen muddy waters that I thought would never clear again. *Waterworks* 6:38–44.

Lefcort, H., Freedman, Z., House, S. e Pendleton, M. 2008. Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good? *EcoHealth* 5: 10-17.

Letey, J. 2001. Causes and consequences of fire-induced soil water repellency. *Hydrological Processes* 15:2867-2875.

Lisowska, K., Bizukojc, M. e Długoński, J. 2006. An unstructured model for studies on phenanthrene bioconversion by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1464-1470.

Lloret, F., Piñol, J. e Castellnou, M. 2009. *Wildfires. The physical geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford pp, 541-560.

Manoli, E., Samara, C., Konstantinou, I. e Albanis, T. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 41:1845–55..

McCull, J. G. e Grigal, D. F. 1977. Nutrient changes following a forest wildfire in minnesota: effects in watersheds with differing soils. *Oikos* 28:105-112.

Mihuc, T. B. e Minshall, G. W. 1995. Trophic generalists vs. trophic specialists: implications for food web dynamics in post-fire streams. *Ecology* 76:2361-2372.

Mihuc, T. e Minshall, G. W. 2005. The trophic basis of reference and post-fire stream food webs 10 years after wildfire in Yellowstone national park. *Aquatic Sciences* 67:541-548.

Minshall, G. W., Brock, J. T. e Varley, J. D. 1989. Wildfires and Yellowstone's stream ecosystems. *BioScience* 39:707-715.

Minshall, G. W., Robinson, C. T., Royer, T. V. e Rushforth, S. R. 1995. Benthic community structure in two adjacent streams in Yellowstone national park 5 years after the 1988 wildfires. *Great Basin Naturalist* 55: 193–200.

Minshall, G. W., Robinson, C. T. e Lawrence, D. E. 1997. Postfire responses of lotic ecosystems in Yellowstone national park, U.S.A. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:2509-2525.

Minshall, G. W., Robinson, C. T., Lawrence, D. E., Andrews, D. A. e Brock, J. T. 2001. Benthic macroinvertebrate assemblages in five central Idaho (USA) streams over a 10-year period following disturbance by wildfire. *International Journal of Wildland Fire* 10:201-213.

Minshall, G. W. 2003. Responses of stream benthic macroinvertebrates to fire. *Forest Ecology and Management* 178:155-161.

Moreira, F., Vaz, P., Catry, F. e Silva, J. S. 2009. Regional variations in wildfire susceptibility of land-cover types in Portugal: implications for landscape management to minimize fire hazard. *International Journal of Wildland Fire* 18:563-574.

Moreirinha, C., Duarte, S., Pascoal, C. e Cássio, F. 2011. Effects of cadmium and phenanthrene mixtures on aquatic fungi and microbially mediated leaf litter decomposition. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 211–219.

Neary, D. G., Klopatek, C. C., DeBano, L. F. e Ffolliott, P. F. 1999. Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management* 122:51-71.

Niyogi, D. K., Simon, K.S. e Towesend, A. R. 2003. Breakdown of tussock grass in streams along a gradient of agricultural development in New Zealand. *Freshwater Biology* 48:1698–1708.

Olivella, M., Ribalta, T., Defebrer, A., Mollet, J. e Delasheras, F. 2006. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after Mediterranean forest fires. *Science of the Total Environment* 355: 156-166.

Pascoal, C., Cássio, F. e Marvanová, L. 2005. Anthropogenic stress may affect aquatic hyphomycete diversity more than leaf decomposition in a low-order stream. *Archiv für Hydrobiologie* 162:481-496.

Pausas, J. G. 2004. Changes in fire and climate in the eastern iberian peninsula (Mediterranean Basin). *Climatic Change* 63:337-350.

Pausas, J. G., Llovet, J., Rodrigo, A. e Vallejo, R. 2008. Are wildfires a disaster in the Mediterranean basin? – A review. *International Journal of Wildland Fire* 17:713-723.

Pereira, P. e Úbeda, X. 2010. Spatial distribution of heavy metals released from ashes after a wildfire. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 18:13-22.

Pilliod, D. S., Bury, R. B., Hyde, E. J., Pearl, C. A. e Corn, P. S. 2003. Fire and amphibians in North America. *Forest Ecology and Management* 178:163-181.

Plumlee, G. S., Martin, D. A., Hoefen, T., Kokaly, R., Hageman, P., Eckberg, A., Meeker, G. P., Adams, M., Anthony, M. e Lamothe, P. J. 2007. Preliminary analytical results for ash and burned soils from the october 2007 Southern California wildfires. *United States Geological Survey Open File Report* 2007-1407.

Rand, G. M. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. City Taylor & Francis.

Resh, V. H., Brown, A. V., Covich, A. P., Gurtz, M. E., Li, H. W., Minshall, G. W., Reice, S. R., Sheldon, A. L., Wallace, J. B. e Wissmar, R. C. 1988. The role of disturbance in stream ecology. *Journal of the North American Benthological Society* 7:433-455.

Rinne, J. N. 1996. Management briefs: short-term effects of wildfire on fishes and aquatic macroinvertebrates in the Southwestern United States. *North American Journal of Fisheries Management* 16:653-658.

Robison, E. G. e Beschta, R. L. 1990. Characteristics of coarse woody debris for several coastal streams of southeast Alaska, USA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47: 1684-1793.

Rulli, M. C., Bozzi, S., Spada, M., Bocchiola, D. e Rosso, R. 2006. Rainfall simulations on a fire disturbed mediterranean area. *Journal of Hydrology* 327:323-338.

Scrimgeour, G. J., Tonn, W. M., Paszkowski, C. A. e Goater, C. 2001. Benthic macroinvertebrate biomass and wildfires: evidence for enrichment of boreal subarctic lakes. *Freshwater Biology* 46:367-378.

Shakesby, R. A. e Doerr, S. H. 2006. Wildfire as a hydrological and geomorphological agent. *Earth-Science Reviews* 74:269-307.

Shakesby, R. A. 2011. Post-wildfire soil erosion in the Mediterranean: Review and future research directions. *Earth-Science Reviews* 105:71-100.

Shen, K., Shen, C. e Lu, Y. 2009. Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure. *Biological Research* 42:183-187.

Smith, H. G., Sheridan, G. J., Lane, P. N. J., Nyman, P. e Haydon, S. 2011. Wildfire effects on water quality in forest catchments: A review with implications for water supply. *Journal of Hydrology* 396: 170-192.

Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B. e Mattiasson, B. 2005. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:719-725.

Spencer, C. N. e Hauer, F. R. 1991. Phosphorus and nitrogen dynamics in streams during a wildfire. *Journal of the North American Benthological Society* 10:24-30.

Spencer, C. N., Gabel, K. O. e Hauer, F. R. 2003. Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. *Forest Ecology and Management* 178:141-153.

Stone, M. K. e Wallace, J. B. 1998. Long-term recovery of a mountain stream from clear-cut logging: the effects of forest succession on benthic invertebrate community structure. *Freshwater Biology* 39:151-169.

Suberkropp, K. e Chauvet, E. 1995. Regulation of leaf breakdown by fungi in streams: influences of water chemistry. *Ecology* 76:1433-1445.

Suberkropp, K. e Weyers, H. 1996. Application of fungal and bacterial production methodologies to decomposing leaves in streams. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1610-1615.

Suberkropp, K. 1998. Microorganisms and organic matter decomposition. *River ecology and management: Lessons from the Pacific coastal ecoregion* 120-143.

Terrazas-Siles, E., Alvarez, T., Guieysse, B. e Mattiasson, B. 2005. Isolation and characterization of a white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain capable of oxidizing phenanthrene. *Biotechnology Letters* 27:845-851.

Varandas, S. e Cortes, R. 2010. Evaluating macroinvertebrate biological metrics for ecological assessment of streams in northern Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment* 166:201-221.

Vila-Escalé, M., Vegas-Vilarrúbia, T. e Prat, N. 2007. Release of polycyclic aromatic compounds into a Mediterranean creek (Catalonia, NE Spain) after a forest fire. *Water Research* 41:2171-2179.

Walker, C. M., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. e Peakall, D. B. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor and Francis.

Webster, J. R., Benfield, E. F., Ehrman, T. P., Schaeffer, M. A., Tank, J. L., Hutchens, J. J. e D'Angelo, D. J. 1999. What happens to allochthonous material that falls into streams? A synthesis of new and published information from Coweeta. *Freshwater Biology* 41: 687-705.

Xue, W. e Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206:73-93.

Zar, J. H. 2009. *Biostatistical analysis*. 5th edition, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, USA, 944 pages.