

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Flávia Sofia Gomes Sousa

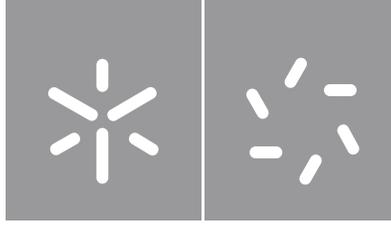
Impactos de fungicidas seleccionados em sistemas decompositores-detritívoros ribeirinhos

Impactos de fungicidas seleccionados em sistemas decompositores-detritívoros ribeirinhos

Flávia Sousa

UMinho | 2019

janeiro 2019



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Flávia Sofia Gomes Sousa

**Impactos de fungicidas selecionados em
sistemas decompositores-detrítívoros
ribeirinhos**

Tese de Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação do

Orientador: Professor Doutor Bruno Branco Castro

Co-orientador: Doutor Arunava Pradhan

Agradecimentos

Ao DB (Departamento de Biologia), ao CBMA (Centro de Biologia Molecular e Ambiental), ao IB-S (Instituto de Bio-Sustentabilidade) por me receberem, por me darem a oportunidade de pertencer às vossas equipas e por me fazerem sentir em casa.

Ao Prof. Dr. Bruno Castro por ser o orientador que toda a gente merece ter, sempre presente e disponível. Ao Dr. Arunava Pradhan por me ter ajudado no desenho das experiências, em todo o trabalho prático e por me explicar tudo vezes sem conta. Às Prof. Dras. Fernanda Cássio e Cláudia Pascoal por serem líderes do grupo e permitirem que o trabalho de todos seja possível.

A todos os meus colegas de laboratório e dos laboratórios vizinhos, por serem sempre prestáveis e disponíveis. Por me ajudarem tanto e tornarem tudo mais fácil.

À Vânia, à Cláudia e à Mariana por serem as minhas *lab mates*, por toda a paciência e carinho, por todas as gargalhadas e bons momentos que partilhámos durante este longo percurso. Nunca teria chegado aqui sem vocês!

Aos meus colegas e amigos da 424 que estão sempre prontos para me fazer rir e por me ajudarem a desanuviar nos dias que mais precisava.

Às minhas amigas, às de sempre: Cristiana e Joana e às que a universidade me deu: Márcia, Flávia e Luísa. Obrigada por tudo, as nossas vidas nem sempre nos permitem partilhar tudo o que gostávamos juntas, mas sei que vos tenho para o que der e vier.

À minha família por me apoiar sempre, por serem o meu porto seguro. Em especial à minha mãe, por todo o amor, por nunca me deixar desistir de nada e me ajudar sempre a descobrir o caminho.

Ao Valentim, por ser o amor da madrinha e a minha maior motivação.

Ao Zé por ser incondicional, por me dar sempre força, por estar sempre comigo.

O presente trabalho de investigação foi realizado no âmbito dos projetos FunG-Eye (POCI-01-0145-FEDER-029505) e EcoAgriFood (NORTE-01-0145-FEDER-000009), co-financiados por fundos nacionais (através da FCT, I.P.) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (através do COMPETE2020 e PT2020). Adicionalmente, esta tese teve o apoio técnico, logístico e financeiro do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (programa estratégico UID/BIA/04050/2013 e UID/BIA/04050/2019), incluindo o financiamento de um mini-projeto interno (Pestisense).

Impactos de fungicidas selecionados em sistemas decompositores-detritívoros ribeirinhos

Resumo

Os detritos vegetais são a principal fonte de nutrientes e energia em ecossistemas ribeirinhos, sendo que os microrganismos – em particular os hifomicetos aquáticos – desempenham um papel fundamental na reciclagem destes nutrientes. Estes fungos dão início ao processo de decomposição e aumentam a palatabilidade dos detritos vegetais para os níveis tróficos seguintes. A presença de poluentes nos ecossistemas de água doce, que resultam de várias atividades humanas, pode interferir no processo de decomposição. Um caso paradigmático são os pesticidas usados na agricultura. O uso generalizado e extensivo de compostos antifúngicos pode afetar comunidades de fungos não-alvo e, por arrasto, os níveis tróficos superiores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do cimoxanil, metalaxil e miclobutanil na decomposição da folhada usando um modelo decompositor-detritívoro.

Numa primeira fase experimental, os efeitos diretos dos fungicidas foram avaliados na decomposição foliar, na reprodução (esporulação) dos fungos aquáticos, e na riqueza e equitabilidade da comunidade de hifomicetos. Para tal, submergiram-se discos de folhas de carvalho num ribeiro não poluído, durante 15 dias, de forma a permitir a colonização pelos microrganismos nativos. Após a colonização, os discos de folhas foram expostos em laboratório a 8 concentrações de cada fungicida (2,46 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Verificaram-se efeitos subtis e transientes na comunidade microbiana, principalmente provocados pelo miclobutanil. O cimoxanil e o metalaxil causaram efeitos negligenciáveis na comunidade. Nenhum dos fungicidas testados afetou a taxa de decomposição da folhada.

Numa segunda experiência, os efeitos indiretos dos fungicidas foram avaliados no nível trófico seguinte (invertebrados detritívoros), avaliando a taxa de consumo da folhada pelo triturador *Allogamus* sp.. Os discos de folhas pré-expostos aos fungicidas foram fornecidos aos invertebrados em duas diferentes combinações, num ensaio de preferência alimentar com (i) concentrações diferentes do mesmo fungicida ou (ii) combinações iguais de fungicidas diferentes. Os indivíduos alimentaram-se menos das folhas expostas aos fungicidas em comparação com o controlo, de forma independente da concentração (embora com pequenas nuances entre tratamentos).

Os resultados indicam que os fungicidas selecionados podem ter efeitos negativos, ainda que subtis, sobre os decompositores microbianos e que esses efeitos se repercutem indiretamente em níveis tróficos superiores, alterando o funcionamento do ecossistema.

Impact of selected fungicides on riparian decomposer- detritivore systems

Abstract

Plant detritus are the main source of nutrients and energy in low-order forested streams, being that microorganisms, particularly fungi, play a key-role in the nutrient recycle. These fungi initiate the decomposition process and, with this activity, increase the palatability of plant detritus to the following trophic levels, in particular detritivore invertebrates. The presence of chemical agents in the aquatic systems, that result from variable human activities, may interfere on the decomposition process. A paradigmatic case is the pesticides used in agriculture. Extensive and widespread use of antifungal compounds can affect communities of non-target fungi and, by trawl, higher trophic levels. The objective of the present work was to evaluate the effects of cymoxanil, metalaxyl and mylobutanil on litter decomposition using a decomposer-detritivore model. In a first experimental phase, the direct effects of fungicides on the microbial communities were evaluated in the decomposition, as well in the reproduction, richness and equitability of the hyphomycete community. For this purpose, we submerged oak leaf disks on a non-polluted river, for 15 days, to allow the colonization of the microorganisms. After the colonization, the leaf disks were exposed in the lab to 8 concentrations of each fungicide (2,46 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Subtle and transient effects on the microbial community were observed, mainly caused by myclobutanil. Cymoxanil and metalaxyl caused negligible effects on the community. None of the tested fungicides affected the leaf litter decomposition rate.

In a second experiment, the indirect effects of the fungicides were evaluated in the upper trophic level (detritivore invertebrates), assessing leaf litter consumption rate by the shredder *Allogamus* sp.. The leaf discs pre-exposed to the fungicides were provided to the invertebrates in two different combinations, in a food preference assay with (i) different concentrations of the same fungicide or (ii) equal concentrations of different fungicides. Consumption of fungicide-exposed leaf disks was significantly lower than control (i.e. non-exposed) leaf disks, regardless of fungicide concentration (albeit small nuances between treatments).

Results indicate that the selected fungicides may have negative effects, albeit subtle, on the microbial decomposers; moreover, those effects can have indirect repercussions on higher trophic levels, altering the functioning of the ecosystem.

Índice de Conteúdo

1. Introdução	1
1.1 Pesticidas em ecossistemas de água doce.....	1
1.2 Fungicidas e o risco para organismos não-alvo	2
1.3 Os fungos aquáticos e a decomposição da folhada em sistemas ribeirinhos	4
1.4 Fungicidas com potencial tóxico para os fungos aquáticos	6
1.5 Impactos diretos e indiretos de fungicidas em teias detritívoras.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Materiais e métodos.....	10
3.1 Efeitos diretos dos fungicidas em decompositores microbianos.....	10
3.1.1 Condicionamento das folhas no rio.....	10
3.1.2 Experiência em microcosmos.....	12
3.1.3 Perda de massa foliar.....	13
3.1.4 Esporulação dos fungos.....	13
3.1.5 Análise da estrutura da comunidade de fungos aquáticos.....	14
3.2 Efeitos indiretos de fungicidas – preferência alimentar de invertebrados detritívoros	14
3.2.1 Organismos em teste	14
3.2.2 Experiência de preferência alimentar	15
3.3 Análise estatística.....	17
4. Resultados	18
4.1 Efeitos diretos dos fungicidas selecionados na atividade de decompositores microbianos	18
4.1.1. Cimoxanil	18
4.1.2. Metalaxil.....	21
4.1.3. Miclobutanil.....	24
4.2 Efeitos indiretos dos fungicidas selecionados na preferência alimentar de invertebrados trituradores.....	27
5. Discussão	30

Lista de Figuras

- Figura 1** – Teia alimentar em rios de baixa ordem.....5
- Figura 2** - Estrutura química dos fungicidas miclobutanil (a), metalaxil (b) e cimoxanil (c).....8
- Figura 3** - Rio Oliveira (à esquerda), local onde foram submergidos os sacos com discos de folhas (à direita) para colonização de fungos aquáticos11
- Figura 4** – Desenho experimental utilizado na experiência de preferência alimentar: a) Microcosmos com 4 concentrações diferentes do mesmo fungicida, perfazendo um total de 16 discos de folhas por microcosmos; b) Microcosmos com as mesmas concentrações dos 3 fungicidas em teste, perfazendo um total de 12 discos de folhas por microcosmos; c) grupos controlo (sem fungicida)...16
- Figura 5** – Configuração da experiência de preferência alimentar17
- Figura 6** – Efeito do cimoxanil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias)...20
- Figura 7** - Efeito do cimoxanil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A percentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.....20
- Figura 8** – Efeito do metalaxil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias).23
- Figura 9** - Efeito do metalaxil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A percentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.23
- Figura 10** – Efeito do miclobutanil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias).26
- Figura 11** - Efeito do miclobutanil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A percentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.26
- Figura 12** – Decomposição mediada pelo triturador *Allogamus* sp. em ensaios de preferência alimentar. Para cada fungicida (cimoxanil, metalaxil, miclobutanil e controlo) são apresentadas as quatro concentrações (fator dentro dos sujeitos: 2,46; 38,4; 240; 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$; no caso do controlo os tratamentos representam apenas réplicas distintas)..28
- Figura 13** – Decomposição mediada pelo triturador *Allogamus* sp. em ensaios de preferência alimentar. Para cada concentração (controlo e 2,46; 38,4; 240; 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) são apresentados os três fungicidas (fator dentro dos sujeitos: cimoxanil, metalaxil, miclobutanil; no caso do controlo os tratamentos representam apenas réplicas distintas)..29

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da água mineral natural usada nos microcosmos (água natural de nascente comercializada pelas Águas do Fastio S.A.). Dados publicitados pelo fornecedor.....12

Tabela 2 - Propriedades dos fungicidas miclobutanil, metalaxil e cimoxanil (informação obtida em: <http://www.sigmaaldrich.com/portugal>)8

Tabela 3 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do cimoxanil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de cimoxanil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).19

Tabela 4 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do metalaxil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de metalaxil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).22

Tabela 5 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do miclobutanil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de miclobutanil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).25

Tabela 6 – Sumário dos testes estatísticos e significância relativos à avaliação dos efeitos dos fungicidas e sua concentração (Conc.) na taxa de decomposição mediada por invertebrados (ANOVA de medições repetidas). É apresentada a partição da variância entre e dentro unidades experimentais (sujeitos), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).27

1.Introdução

1.1Pesticidas em ecossistemas de água doce

Os ecossistemas de água doce fornecem uma quantidade de recursos essenciais para todos os seres vivos (aquáticos e terrestres), incluindo humanos. Providenciam serviços ecológicos, albergando uma grande diversidade de espécies e asseguram também inúmeros serviços para a espécie humana como alimentação, hidratação, diversos usos domésticos, irrigação, produção de energia e transporte (Postel, S., Richter 2003). O uso insustentável dos ecossistemas de água doce tem trazido consequências para os ambientes aquáticos, sendo a poluição considerada uma das maiores causas de perda de biodiversidade (Vörösmarty et al. 2010). Muitos estudos têm sido realizados para identificar as principais fontes de poluição, que incluem a descarga de efluentes não tratados, tanto domésticos como industriais, e a libertação de pesticidas devido à intensa agricultura (Hooper 2005). A produção de alimentos é particularmente dependente da aplicação de pesticidas. Estes compostos sintéticos e tóxicos são legalmente lançados para o ambiente. A diretiva 2009/128/CE do Parlamento Europeu define como objetivo uma utilização sustentável de pesticidas, aconselhando a redução do uso dos mesmos e apelando à preferência por pesticidas classificados como não perigosos, particularmente para meios aquáticos.

Os pesticidas são compostos químicos concebidos para prevenir, destruir ou mitigar qualquer tipo de praga e são catalogados de acordo com as espécies-alvo que atingem (ex.: inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas). O uso de pesticidas é fundamental para combater pestes e doenças na agricultura e para aumentar a qualidade e quantidade da produção agrícola, contribuindo assim para uma melhoria da segurança alimentar humana, para a saúde humana e para a economia dos países que dependem de uma indústria agrícola bem-sucedida (Hakeem et al. 2016). Contudo, a sua utilização massiva criou um problema ambiental (contaminação de solos, águas subterrâneas e superficiais) e de segurança alimentar (contaminação de alimentos de produção agrícola e pecuária), que é heterogêneo à escala mundial (ver perspectiva histórica por Li et al. 2015). Em 2014, e apenas na União Europeia, foram vendidas 400 000 toneladas de pesticidas (Eurostat, 2016).

Embora os pesticidas não sejam destinados nem legalmente autorizados para ser aplicados em sistemas aquáticos, diversos estudos detetaram a presença de uma grande variedade de inseticidas, herbicidas e fungicidas em águas doces (Dijksterhuis et al. 2011; Fernández et al. 2015; Zubrod et al. 2015). Quando aplicados, os pesticidas são absorvidos pelo solo ou por plantas e animais, mas grande parte acaba por atingir ambientes aquáticos, por escorrência superficial (lixiviação das substâncias

presentes no solo) ou por erosão (transporte de partículas de solo e contaminantes associados), principalmente em períodos de grande precipitação e enchentes, ou também por via aérea devido ao vento. Dado que os pesticidas são capazes de entrar nos sistemas aquáticos, a questão relevante é se e como afetam as espécies nestes sistemas (Relyea & Hoverman 2006).

Entre todos os pesticidas utilizados, os fungicidas figuram entre os mais vendidos, globalmente. Em 2014, os fungicidas e bactericidas representavam 43,8% do total de vendas de pesticidas na Europa (Eurostat, 2016). Em Portugal verifica-se a mesma tendência, com os fungicidas a representar 40% do total de vendas (DGAV 2013). As doenças com fungos são uma das principais ameaças às produções agrícolas, atacando as folhas, o lenho e os frutos, quer na fase de produção quer na fase pós-colheita. Por isso, são aplicados fungicidas com frequência, recorrentemente e nas diversas fases, e estes são comumente encontrados nos agroecossistemas (McGrath 2004). O uso de fungicidas não serve apenas para controlar doenças, mas também para aumentar a produtividade de culturas, aumentar o seu tempo de vida e qualidade da colheita (McGrath 2004). A agricultura moderna está ainda mais dependente da aplicação de fungicidas devido às enormes produções em monocultura, que reduzem a variedade de genes das culturas e aumentam a propagação de doenças fúngicas. A dispersão de doenças provocadas por fungos pode também ser acelerada devido às alterações climáticas (Knäbel et al. 2014).

1.2 Fungicidas e o risco para organismos não-alvo

Os fungicidas atuam sobre os fungos ou organismos próximos dos fungos (ex.: oomicetos) (Dean et al. 2012) que provocam a doença, podendo inibir o seu crescimento ou causar a sua morte (Poole, 2014). Podem ter diferentes mecanismos de ação, incluindo a ação inibitória sobre a biossíntese de compostos orgânicos importantes (ergosterol, aminoácidos), a produção de energia e a divisão celular, ou atuar através de múltiplos mecanismos (Bartlett et al. 2002). Alguns destes mecanismos são específicos para os fungos, outros são mecanismos genéricos que podem atuar sobre outros microrganismos. Um bom exemplo de uma família de fungicidas com algum grau de especificidade são os azoles (Kahle et al. 2008), compostos que inibem a síntese de ergosterol, um componente fundamental das membranas dos fungos (Hof 2001). Contudo, os oomicetos (ex.: alguns oídios, mildios) são afetados também por compostos inibidores da biossíntese deste esterol, pois também contêm ergosterol na composição da sua membrana plasmática (Raymond S. et al. 1989). Quando os fungicidas atingem os ecossistemas aquáticos, podem provocar danos em organismos não-alvo, principalmente em fungos aquáticos, que são biologicamente próximos dos fungos que causam doenças nas culturas

agrícolas. Deste modo, os fungos aquáticos sofrem um efeito direto e imediato da contaminação por fungicidas, o que pode trazer consequências para a dinâmica das comunidades naturais de fungos aquáticos e o funcionamento do ecossistema (Dijksterhuis et al. 2011; Fernández et al. 2015).

Os fungos aquáticos são heterotróficos, dependendo da matéria orgânica externa que tanto pode estar viva como morta. São omnipresentes, associando-se a quase todos os outros organismos como decompositores, como parasitas ou até como simbioses (Wurzbacher et al. 2011). Tal como os fungos terrestres, os fungos decompositores aquáticos atuam majoritariamente como decompositores de matéria orgânica tanto de detritos vegetais como animais, sendo o processo de decomposição da folhada um dos mais estudados (ver abaixo) (Graça et al. 2001; Pradhan et al. 2011; Duarte et al. 2012). Alguns fungos aquáticos também atuam como parasitas que, ao contrário dos fungos saprófitos, atacam células hospedeiras vivas. Por exemplo, o fungo parasita *Batrachochytrium dendrobatidis* tem sido muito estudado: este parasita coloniza as células da pele dos anfíbios, causando uma infeção que provoca a mortalidade em massa e leva ao declínio de populações de anfíbios (Johnson et al. 2007). Como simbioses, alguns fungos aquáticos formam micorrizas com as macrófitas aquáticas, trazendo benefícios para a planta (Wurzbacher et al. 2011). Os fungos aquáticos, principalmente os hifomicetos aquáticos¹, desempenham também um papel importante na decomposição da folhada e no aumento da palatabilidade desta para invertebrados. Quando a diversidade da comunidade de fungos é afetada pela presença de fungicidas, pode haver um efeito cumulativo para níveis tróficos superiores (Bundschuh et al. 2011).

Percebe-se que os fungos aquáticos desempenham funções-chave nos ecossistemas, mantendo interações e funções cruciais com outros organismos aquáticos. Por este motivo, a presença de fungicidas nos ecossistemas aquáticos é extremamente alarmante e os efeitos em organismos não-alvo provocados estão a tornar-se uma preocupação crescente (Dijksterhuis et al. 2011; Schaeffer et al. 2017). Frequentemente, os efeitos não-alvo provocados por fungicidas não são tidos em consideração na avaliação de risco subjacente à autorização destes produtos químicos (Dijksterhuis et al. 2011). Existe uma carência de dados acerca dos impactos ecológicos dos fungicidas nas teias tróficas aquáticas, e muito concretamente naquelas onde os fungos não-alvo desempenham um papel importante. Consequentemente, os modelos usados na avaliação de riscos ambientais pela União Europeia para calcular as concentrações de pesticidas em águas superficiais parecem subestimar as concentrações

¹ Hifomicetos aquáticos – grupo de fungos que produzem micélio e que se reproduzem assexuadamente através da formação de conídios (esporos assexuados que funcionam como estruturas de dispersão); desempenham um papel ecológico vital na colonização e decomposição da folhada.

reais e os efeitos em organismos aquáticos chave, como os hifomicetos aquáticos (Knäbel et al. 2014; Fernández et al. 2015).

1.3 Os fungos aquáticos e a decomposição da folhada em sistemas ribeirinhos

Nas zonas mais a montante dos ribeiros, a florestação é abundante, o que limita a penetração da luz solar; por isso, a principal fonte de nutrientes para os organismos aquáticos provém da folhada e outros detritos (sobretudo vegetais) que entram nos cursos de água. Assim, a origem dos nutrientes diz-se alóctone e o processo de decomposição destes detritos é essencial para garantir o fluxo de nutrientes e energia ao longo do rio (Grattan & Suberkropp 2001). Alguns microrganismos, como fungos e bactérias, a par dos macroinvertebrados, são fundamentais para o processo de decomposição de detritos vegetais (Graça e Canhoto 2006).

A decomposição da folhada decorre em três diferentes fases: a lixiviação, o condicionamento e a fragmentação. Todas estas fases são moduladas e afetadas por fatores bióticos e abióticos. A lixiviação envolve a libertação dos compostos solúveis da folha devido à ação da água, incluindo compostos fenólicos, alguns aminoácidos e carboidratos. Na fase de condicionamento, a folha é colonizada por fungos e bactérias (Pascoal & Cassio 2004). A fase de fragmentação foliar ocorre como consequência da ação dos organismos e da abrasão física resultante do fluxo da água que provocam a quebra mecânica da folhada.

Durante a fase de condicionamento, os microrganismos degradam os polímeros das células das plantas através de enzimas extracelulares, como pectinases, hemicelulases e celulases. A contribuição da atividade dos microrganismos no processo de decomposição da folhada, principalmente fungos e bactérias, é essencial (Figura 1) (Pascoal & Cassio 2004). Os hifomicetos aquáticos são cruciais no processo de decomposição (Pascoal & Cassio 2004), na medida em que apresentam características fisiológicas e morfológicas que permitem uma fácil colonização e decomposição da folhada. Morfologicamente, conseguem fácil contacto e aderência aos substratos devido à forma tetrarradiada e sigmoide dos esporos (conidia) e à produção de mucilagens pelos seus braços conidiais que permite uma dispersão eficiente (Suberkropp 1998; Cotrufo et al. 2010a). Do ponto de vista fisiológico, as células fúngicas são capazes de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar algumas das substâncias mais recalcitrantes do material vegetal (como por exemplo polifenóis, lenhina e celulose) (Chamier 2008)(Balibrea et al. 2017), modificando o micro-ambiente que as rodeia e alimentando-se das substâncias mais simples que resultam deste processo de digestão extracelular. As bactérias também

participam na decomposição foliar, mas o seu papel é considerado menor do que o dos fungos; estes procariontas detêm pouca capacidade invasiva e têm mais dificuldade de adesão e colonização das folhas, embora sejam capazes de produzir enzimas extracelulares que degradam os polissacarídeos da folha (Pascoal & Cassio 2004).

Depois de colonizada por fungos e bactérias, a folha torna-se mais palatável para os níveis tróficos seguintes, pois estes micróbios eliminam as propriedades recalcitrantes características da folhada e tornam-na ainda mais nutritiva devido à sua presença como fonte de alimento (Chung et al. 2008). Os invertebrados trituradores são capazes de se alimentar da folhada previamente condicionada pelos microrganismos. Os trituradores convertem a matéria orgânica particulada grosseira (CPOM) em matéria orgânica particulada fina (FPOM) (Graça et al. 2001), pois possuem peças bucais que auxiliam a trituração dos detritos vegetais. Este grupo de invertebrados detritívoros especializados tem uma contribuição maioritária na decomposição dos detritos (Graça et al. 2002). Os trituradores são responsáveis por disponibilizar FPOM para os macroinvertebrados coletores, quer filtradores ou de depósito, por degradação mecânica da própria folha ou pela produção de partículas fecais por digestão (Cotrufo et al. 2010b).

O processo de decomposição da folhada é um processo que tem sido avaliado em diversos estudos sobre integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos, principalmente quando contaminados por algum produto químico (Pascoal et al. 2001; Gessner 2007).

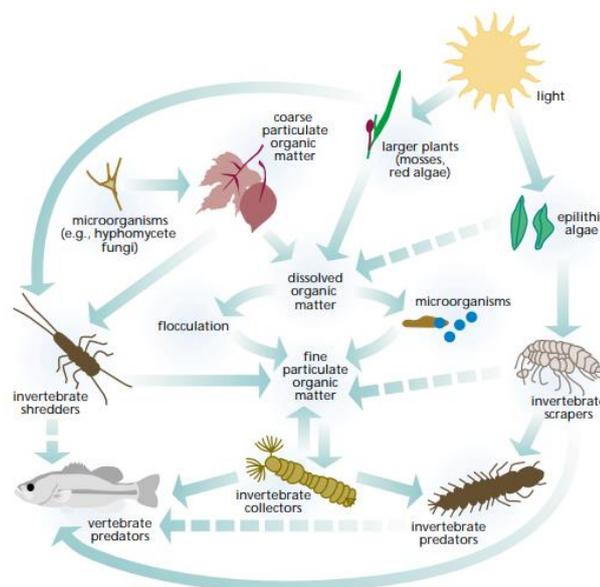


Figura 1 – Teia alimentar em rios de baixa ordem² (adaptado de: (FISRWG 1998)).

² Rio de baixa ordem - rio na zona montante da bacia hidrográfica, próximo do local de nascente, onde o volume de água é baixo. Devido à insuficiência de luz solar, nestes rios a matéria orgânica é maioritariamente alóctone, e provém da vegetação ripária e da floresta adjacente.

Os fungos desempenham um papel crucial e insubstituível no processo de decomposição da matéria orgânica e a presença de um fungicida pode afetar as funções do ecossistema que deles dependem. Adicionalmente, quando ocorrem perdas de biodiversidade ao nível dos fungos aquáticos, o nível trófico seguinte (invertebrados aquáticos) também será indiretamente afetado, e de seguida todos os níveis tróficos superiores (Bundschuh et al. 2011). Assim, a alteração das comunidades microbianas colonizadoras das folhas por ação de fungicidas pode resultar em alterações no ciclo de nutrientes e no fluxo de energia ao longo da teia alimentar (Bundschuh et al. 2011; Newton et al. 2018). Não obstante os fungos serem os alvos preferenciais destes agroquímicos, os fungicidas também podem provocar efeitos tóxicos diretos sobre invertebrados (Zubrod et al. 2011) – ver abaixo.

1.4 Fungicidas com potencial tóxico para os fungos aquáticos

Em Portugal, existem culturas-chave com enorme importância na economia e agricultura, algumas das quais extremamente dependentes de esquemas de aplicação de fungicidas. No norte de Portugal, culturas como o castanheiro (*Castanea sativa*), a oliveira (*Olea europaea*) e a videira (*Vitis vinifera*) têm particular importância (NICIF 2006); dentre estas, a videira é a que depende mais de esquemas de pulverização de pesticidas, e fungicidas em particular. Portugal é um país com grande potencialidade para a produção de videira (*Vitis vinifera*) devido às boas condições climáticas e geológicas e à detenção de castas únicas. Em 2016, a área total de vinha em Portugal era de 190467 hectares, sendo que 41% desta área se encontra no Norte do país (I.V.V. 2016). Assim, o setor vitivinícola português tem grande valor económico, e também social, devido à tradição que envolve este setor. Contudo, a videira está sujeita ao ataque de inúmeras doenças e pragas, desde fungos, vírus, bactérias, vermes ou ácaros. A infeção por fungos e oomicetos é bastante frequente e existem algumas doenças bastante conhecidas como a escoriose (causada pelo fungo *Phomopsis viticola*), o oídio (causada pelo oomiceto *Uncinula necator*) ou a podridão cinzenta (causada pelo fungo *Botrytis cinerea*) (DRABL 2008).

A poluição por fungicidas em áreas vinícolas é uma área de pesquisa que tem ganho importância nos últimos anos, uma vez que os fungicidas são intensamente utilizados em vinhas, representando 96% de todas as aplicações de pesticidas nesta cultura (Fernández et al. 2015). A lista de fungicidas aplicados à videira é extremamente extensa, estando atualmente disponíveis 99 formulações fungicidas diferentes (envolvendo 57 substâncias ativas diferentes) autorizadas para a aplicação na vinha (DGAV 2017). Destes fungicidas, alguns foram reconhecidos pelas autoridades portuguesas e europeias como potencialmente perturbadores da integridade ecológica, e integrados na lista de poluentes específicos no âmbito da Diretiva-Quadro da Água (Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de

23 de outubro de 2000), a saber: cimoxanil, mancozebe, metalaxil, pirimetanil e tebuconazol. Contudo, a falta de informação toxicológica levou a que ainda não exista norma de qualidade, ou seja, um valor de concentração máximo para um bom estado da água (Instituto da água 2009).

O miclobutanil (figura 2a) é um triazol, pertence ao grupo dos compostos azol e atua numa vasta gama de fungos, provocando a inibição da enzima lanosterol-14 α -demetilase (Kahle et al. 2008; Stensvold et al. 2012). Esta enzima é responsável por transformar o lanosterol em ergosterol, que é um componente essencial da membrana citoplasmática de fungos (como hifomicetos aquáticos) e oomicetos (Zarn et al. 2003). A interferência com a síntese deste esteroide compromete a integridade da membrana e altera a sua permeabilidade (Sheehan et al. 1999). Este fungicida é usado para combater várias doenças fúngicas em cereais, frutas e hortaliças (Li et al. 2015) e os compostos azol, no geral, são amplamente utilizados para combater pragas comuns de fungos em vinhas (Komárek et al. 2010). É um fungicida persistente (DT50 em água de 526 dias) e com alguma mobilidade (Tabela 1). Um estudo realizado numa zona de vinhas detetou a presença de miclobutanil em águas superficiais numa concentração de 0,74 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Bereswill et al. 2012). Este composto é considerado ligeiramente tóxico para invertebrados e moderadamente tóxico para peixes (Elskus 2011). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA não há dados sobre a toxicidade do miclobutanil em invertebrados de água doce (Elskus 2011). Outros compostos azol, como o tebuconazol, mostraram ter potencial tóxico sobre a comunidade de hifomicetos aquáticos (Zubrod et al. 2011; Pimentão 2017).

O metalaxil (figura 2b) pertence ao grupo das fenilaminas e é altamente fungitóxico (Pose-Juan et al. 2010). O seu modo de ação e o seu alvo celular são bem conhecidos, sendo que este composto atua inibindo a biossíntese de RNA e, conseqüentemente, impede a mitose celular e o crescimento do fungo (Fisher e Hayes 1982). O metalaxil é rapidamente absorvido pela planta e garante proteção contra um novo crescimento (Örnek 2018). Devido a estas características, é usado frequentemente, por exemplo, para combater o mildio da videira (Fourie 2004). Como tem alguma persistência (DT50 em água de 56 dias) e alta mobilidade (Tabela 1), o metalaxil é facilmente lixiviado do solo e pode contaminar águas superficiais e subterrâneas, por isso os seus resíduos são uma ameaça para as comunidades naturais. Foram encontrados resíduos de metalaxil em águas subterrâneas com concentração de 0,49 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que excede o limite genérico (para pesticidas) imposto pela União Europeia de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Martins et al. 2013a). Este composto é considerado como não-tóxico para artrópodes e espécies de vertebrados, mas alguns estudos demonstram que pode ter efeitos genotóxicos e mutagénicos (Hrelia et al. 2009).

O cimoxanil (figura 2c) pertence ao grupo das acetamidas, sendo altamente solúvel em água e bastante volátil, tendo mobilidade média-alta (Tabela 1), mas não é persistente no solo nem em sistemas

aquáticos (DT50 de 0,3 dias) (Mercan & Inam 2010). Este composto é usado como fungicida curativo foliar e de prevenção há mais de 25 anos e é atualmente permitido em mais de 50 países, sendo usado em mais de 10 milhões de hectares em todo mundo em 17 culturas diferentes, incluindo batata, tomate, beterraba e vinha (Morrica et al. 2004). É considerado como moderadamente tóxico para a maioria dos organismos aquáticos. Estudos demonstram que o seu modo de ação afeta a síntese de DNA e RNA como efeito secundário, sendo que o seu principal modo de ação ainda não é totalmente conhecido. Há pouca literatura disponível sobre as características ambientais do cimoxanil, o que impede a completa compreensão acerca do seu destino ambiental e possíveis influências na decomposição e na comunidade microbiana (Toffolatti et al. 2015).

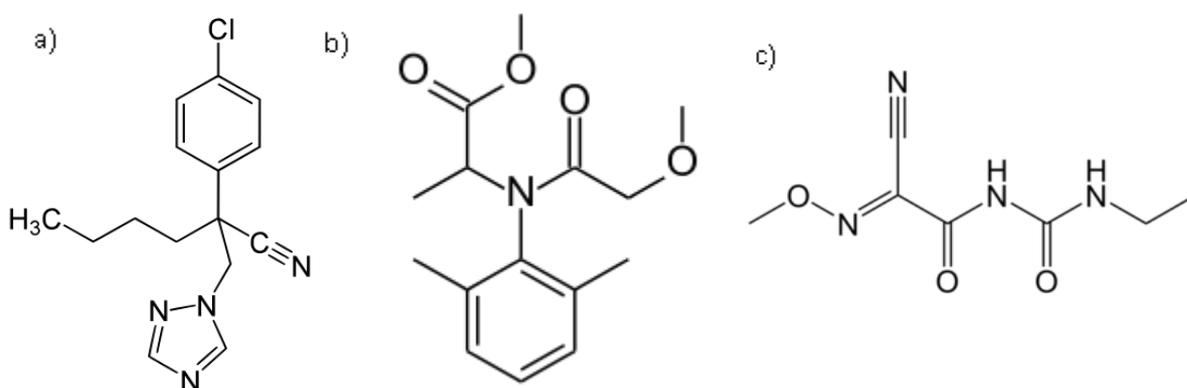


Figura 2 - Estrutura química dos fungicidas miclobutanil (a), metalaxil (b) e cimoxanil (c).

Tabela 1- Propriedades dos fungicidas miclobutanil, metalaxil e cimoxanil (informação obtida <http://www.sigmaaldrich.com/portugal>).

Fungicida	Nº CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	K _{ow} (Coeficiente de partição do carbono orgânico)
Cimoxanil	57966-95-7	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	198,18	890 (20°C)	39
Metalaxil	57837-19-1	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279,33	8400 (22°C)	162
Miclobutanil	88671-89-0	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288,78	142 (25°C)	517

1.5 Impactos diretos e indiretos de fungicidas em teias detritívoras

Estudos anteriores reuniram esforços para entender os efeitos diretos de alguns fungicidas na comunidade de fungos aquáticos, entre os quais: tebuconazol (Bundschuh et al. 2011; Zubrod et al.

2011; Artigas et al. 2012a; Dimitrov et al. 2014; Pesce et al. 2016a; Donnadieu et al. 2016; Pimentão 2017), pirimetanil (Abelho et al. 2016), imazalil (Flores et al. 2014), pentaclorofenol (Bärlocher e Premdas 1988), metiram (Lin et al. 2012), carbendazim (Cuppen et al. 2000), tolyfluanid (Heimbach, 2002), triphenytin (Roessink et al. 2006), fluazinam (van Wijngaarden et al. 2010) e azoxistrobina (Gustafsson et al. 2010). Todos os fungicidas mostraram efeitos diretos e imediatos sobre a taxa de decomposição da folhada, sendo que alguns impactaram a comunidade de fungos aquáticos, afetando o seu crescimento/biomassa (tebuconazol, pirimetanil e metiram), reprodução/esporeação (tebuconazol, imazalil e pentaclorofenol) e diversidade de espécies (tebuconazol, imazalil, metiram).

Estudos recentes testaram também os efeitos indiretos de alguns fungicidas em experiências de preferência alimentar com invertebrados aquáticos aos quais foram fornecidas folhas previamente condicionadas com fungicida: tebuconazol foi testado em *Gammarus* sp. (Bundsuh et al. 2011; Zubrod et al. 2011; Dimitrov et al. 2014), assim como em *Chironomus riparius* e *Allogamus* sp. (Pimentão 2017); os efeitos do miclobutanil foram testados também em *Gammarus* sp. (Vu et al. 2017); a piraclostrobina foi testada em *Hyalella azteca* por via direta (pela água) e por via indireta (pelo alimento), avaliando os efeitos diretos e indiretos (Willming e Maul 2016). A presença dos fungicidas afetou os invertebrados estudados, alterando o seu crescimento (miclobutanil), a sua reprodução (miclobutanil) e até a sua sobrevivência (piraclostrobina, miclobutanil).

Embora já existam alguns estudos sobre os efeitos dos fungicidas sobre a comunidade de fungos aquáticos e invertebrados de água doce, ainda existe uma grande lista de fungicidas cujos efeitos – tanto diretos como indiretos – ainda se desconhecem ou existe pouca informação disponível. É o caso dos fungicidas analisados neste estudo (cimoxanil, metalaxil e miclobutanil), o que traz um propósito ainda maior a este trabalho.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos diretos e indiretos dos fungicidas cimoxanil, metalaxil e miclobutanil na comunidade de fungos aquáticos e em invertebrados de água doce, bem como na decomposição da folhada. Os agentes antifúngicos podem provocar consequências diretas e imediatas na comunidade de fungos não-alvo e na decomposição por eles mediada (efeitos diretos), o que pode repercutir-se nos restantes níveis tróficos da teia alimentar (efeitos indiretos). Os fungos aquáticos contribuem para a palatabilidade da folhada e melhoram também o seu nível nutricional, logo se estes forem afetados pelo fungicida, é possível que tal acarrete um efeito indireto do fungicida para o

nível seguinte da teia trófica, os invertebrados trituradores. De forma a testar estes dois níveis de ação do fungicida, foram levadas a cabo duas fases experimentais.

Numa primeira fase experimental, usámos uma abordagem de microcosmos laboratoriais, testando concentrações crescentes de cimoxanil, metalaxil e miclobutanil na comunidade de fungos aquáticos associada à folhada (efeitos diretos). O objetivo específico desta fase foi avaliar o efeito de cada fungicida sobre a taxa de decomposição da folhada, a taxa de esporulação dos fungos presentes nas folhas e a estrutura e diversidade da comunidade de fungos aquáticos (com base na identificação morfológica de esporos).

Numa segunda fase experimental, as folhas (e a comunidade microbiana associada) contaminadas com fungicida na primeira fase experimental foram usadas num ensaio laboratorial de preferência alimentar de invertebrados. O objetivo específico desta fase foi determinar se a pré-exposição das folhas e comunidade microbiana aos fungicidas tinha impacto na decomposição da folhada mediada pelos invertebrados trituradores ou afetava as escolhas alimentares deste animais (efeitos indiretos). Para tal, foram fornecidas aos indivíduos em cada unidade experimental discos de folhas previamente expostas a (i) diferentes concentrações do mesmo fungicida ou (ii) concentrações iguais de fungicidas diferentes.

3. Materiais e métodos

3.1 Efeitos diretos dos fungicidas em decompositores microbianos

Para avaliar os efeitos que os fungicidas exercem diretamente sobre os decompositores microbianos foi determinada a perda de massa foliar e a reprodução de fungos aquáticos (esporulação). Foram utilizadas folhas senescentes de carvalho como substrato para a colonização da comunidade microbiana decompositora (predominantemente fungos) e os efeitos dos fungicidas foram testados nessas folhas colonizadas numa experiência de microcosmos, conforme se descreve abaixo.

3.1.1 Condicionamento das folhas no rio

O local escolhido para a condicionamento da folhada foi num rio de baixa ordem no NW de Portugal (rio Oliveira, 41°35'11.3"N 8°13'31.1"W). No local de amostragem o rio tinha cerca de 0,4 a 0,6 m de profundidade e cerca de 3 a 4 m de largura. A vegetação ripária envolvente era

maioritariamente composta por amieiro (*A. glutinosa* Gaertn.), carvalho-alvarinho (*Quercus robur* L.) e castanheiro (*Castanea sativa* Miller), e o leito do rio era composto por pedras, seixos e areia.

No outono de 2010, imediatamente antes a abscisão, foram recolhidas folhas de carvalho-alvarinho (*Quercus robur* L.), que foram secas à temperatura ambiente e posteriormente armazenadas em local seco.

As folhas de carvalho foram lixiviadas em água desionizada durante 12 h e cortadas em discos com diâmetro de 12 mm. Foram colocados conjuntos de 80 discos de folhas em sacos de malha fina (0,5 mm de poro) para permitir a entrada dos microrganismos decompositores e evitar o acesso de invertebrados detritívoros. Posteriormente, os sacos foram submersos no rio para permitir a colonização microbiana (figura 3). Um conjunto de 4 sacos foi retirado do rio após 15 minutos submerso para determinar a massa seca inicial dos discos de folhas (M_0). Durante o condicionamento dos discos de folhas no campo, a condutividade ($38 \mu\text{S cm}^{-1}$), o pH (6,97) e a concentração de oxigénio dissolvido ($13,5 \text{ mg L}^{-1}$) foram medidos *in situ* usando uma sonda multiparâmetros WTW Multiline F/set 3 no. 400327. Foram recolhidas e transportadas amostras de água do rio para o laboratório numa caixa térmica em ambiente escuro, que foram depois analisadas (HACH DR/2000 spectrophotometer, Loveland, CO) para determinar as concentrações de nitratos ($0,33 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$), nitritos ($0,008 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$), amónia ($0,003 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$) e fosfatos ($0,10 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$). Após 15 dias, os sacos foram recolhidos e transportados para o laboratório numa caixa térmica em ambiente escuro para dar início à experiência em microcosmos com os discos de folhas colonizados pela microbiota local.



Figura 3 - Rio Oliveira (à esquerda), local onde foram submergidos os sacos com discos de folhas (à direita) para colonização por fungos aquáticos.

3.1.2 Experiência em microcosmos

Os discos de folhas de cada saco foram enxaguados em água desionizada antes de serem colocados em erlenmeyers de polipropileno de 250 mL contendo 90 mL de água mineral natural esterilizada (Água do Fastio, Tabela 2). Em cada microcosmo foi colocado um dos três fungicidas selecionados: cimoxanil (Cymoxanil PESTANAL®), metalaxil (Metalaxyl PESTANAL®), miclobutanil (Myclobutanil PESTANAL®). Estes fungicidas foram adquiridos à Sigma Aldrich (Munique, Alemanha).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da água mineral natural usada nos microcosmos (água natural de nascente comercializada pelas Águas do Fastio S.A.). Dados publicitados pelo fornecedor.

Parâmetro	Média ± Desvio padrão
Resíduo seco (a 180°C) (mg L ⁻¹)	34,0 ± 4
Silica (mg L ⁻¹)	9,6 ± 2
pH (a 180°C)	6,0
HCO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	8,0 ± 0,8
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	4,2 ± 0,4
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	1,0 ± 0,2
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	4,1 ± 0,4
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	1,3 ± 0,3
K ⁺ (mg L ⁻¹)	0,6 ± 0,1

Com base numa revisão da literatura, foram selecionadas oito concentrações para cada um dos fungicidas usando uma série geométrica entre 2,46 a 1500 µg L⁻¹ (fator 2,5×), garantindo uma gama que inclui cenários ecologicamente relevantes e concentrações que podem ocorrer em casos extremos. Adicionalmente, e como referência comparativa, foi também usado um controlo negativo (sem fungicida). Para cada tratamento usaram-se 4 réplicas. As substâncias fungicidas foram dissolvidas em água esterilizada, após agitação e sonicação (cerca de 30 min), de forma a garantir a dissolução completa dos compostos; este procedimento foi particularmente importante para o miclobutanil dada a sua limitada solubilidade (Tabela 1). Para todos os fungicidas, foi preparada uma solução-mãe com a concentração mais alta (1500 µg L⁻¹), e a partir dessa foram obtidas as restantes concentrações através de diluições sucessivas.

Os microcosmos foram incubados num agitador orbital (Infors HT, Orbitron, Suíça; 140 rpm), a 16°C, mantidos em ambiente escuro. As soluções teste foram mudadas a cada 7 dias, de forma manter uma exposição crónica considerando o tempo de meia vida dos fungicidas selecionados (Artigas, 2012). A experiência em laboratório decorreu durante 70 dias, até ca. 50% da decomposição dos discos de folhas no tratamento controlo ser atingida. As soluções retiradas de cada microcosmo, a cada mudança,

foram armazenadas em recipientes de plástico para avaliar a reprodução dos fungos (produção de conidia). Devido à morosidade e rigor do processo de avaliação da produção de conidia e à longa duração da exposição em laboratório optou-se por juntar as soluções retiradas dos microcosmos em períodos de 14 dias. No fim do ensaio, os discos de folhas foram guardados a -20°C e foi depois calculada a perda de massa foliar (ver procedimentos abaixo).

3.1.3 Perda de massa foliar

No final da experiência, os discos de folhas (à exceção de um set de 24 discos) de cada microcosmo foram liofilizados durante 48 h e depois pesado com aproximação de 0,0001 g. O set de 24 discos foi preservado para quantificar outras variáveis mas esses resultados não são apresentados nesta dissertação.

A taxa de decomposição dos discos de folhas foi determinada usando o modelo exponencial negativo (Webster & Benfield 1986):

$$M_t = M_0 \times e^{-kt}$$

em que M_t é a massa foliar no final da primeira fase experimental, M_0 é a massa foliar inicial, k é taxa de decomposição foliar (dia^{-1}) e t é o intervalo de tempo total do ensaio (84 dias).

3.1.4 Esporulação dos fungos

As amostras de água com conidia (180 ml) libertados pelos fungos presentes nos discos de folhas em decomposição foram fixadas com 1 mL de formaldeído a 37% e 40 μL de 15 % Triton X-100, para evitar a germinação e aderência dos esporos às paredes das garrafas de armazenamento. Para a identificação e contagem de conidia, um volume apropriado da amostra foi filtrado (através de membrada com 0,45 μm de poro, Millipore, Billerica, MA) e corado com “cotton blue” em ácido láctico (concentração final = 0,05 %). Os conidia das espécies de hifomicetos aquáticos foram identificados (com o recurso ao guia de Gullis et al. 2005) e enumerados (no mínimo foram contados 300 conidia por amostra) ao microscópio (ampliação 400x, Leica Biomed, Heerbrugg, Suíça). A esporulação dos fungos foi avaliada numa dinâmica temporal, tendo para tal sido selecionadas as amostras aos dias 28, 56 e 70 (em termos de período de exposição em microcosmos) em apenas 4 concentrações (2,46; 38,4; 240 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$). A opção de não processar as amostras de todos os tempos de amostragem e concentrações foi de natureza logística, dada a morosidade do processo de contagem.

3.1.5 Análise da estrutura da comunidade de fungos aquáticos

Foram calculadas medidas de diversidade, como o número de taxa presentes em cada amostra (riqueza, S) e o índice de Equitabilidade de Pielou (J) (Legendre, P. & Legendre 1998), de acordo com a seguinte equação:

$$J' = \frac{H'}{\ln S}$$

em que H' se refere ao índice de diversidade de Shannon:

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i (\ln P_i)$$

em que P_i se refere à abundância relativa do taxon i .

De forma a entender a contribuição relativa de cada espécie, foi feita uma enumeração dos tipos de esporos presentes em cada amostra (baseada na morfologia) que permitiu a análise da estrutura da comunidade.

A análise das comunidades também foi avaliada em termos da sua dinâmica temporal, à semelhança do operado para a taxa de esporulação (Ver 2.1.4).

3.2 Efeitos indiretos de fungicidas – preferência alimentar de invertebrados detritívoros

Os efeitos indiretos dos fungicidas no nível trófico seguinte (invertebrados detritívoros) foram avaliados através da taxa de consumo dos discos de folhas pelos invertebrados. Em cada microcosmo, foram fornecidos aos invertebrados discos de folhas previamente expostos a (i) diferentes concentrações do mesmo fungicida ou (ii) concentrações iguais de fungicidas diferentes. Avaliando a perda de massa do alimento cedido aos invertebrados pretendeu-se entender se havia algum tipo de preferência devido à pré-exposição das folhas e da comunidade microbiana associada aos fungicidas selecionados, bem como às diferentes concentrações.

3.2.1 Organismos em teste

A experiência foi realizada com invertebrados trituradores do género *Allogamus* sp., que são detritívoros da família Limnephilidae. Este invertebrado é endémico do sudoeste da Europa (Bonada et al. 2008) e é comum nos rios de baixa ordem no nordeste de Portugal (Varandas & Cortes 2010). Em geral, a família Limnephilidae é dominante no processo de decomposição (Creed et al. 2009). Estes detritívoros têm um ciclo de vida relativamente longo, com diferentes estágios aquáticos (ovos, larvas e

pupa) e uma fase aérea (adulto). Tal como outros tricópteros, as larvas de *Allogamus* sp. constroem um casulo de areias e detritos de plantas, que serve como proteção.

Larvas em estágio inicial de *Allogamus* sp. foram recolhidos num local não poluído do Rio Cávado e depois foram aclimatizados em laboratório, durante aproximadamente duas semanas, em água do local filtrada, com arejamento, numa sala de temperatura climatizada a 16°C.

3.2.2 Experiência de preferência alimentar

Antes da experiência, os indivíduos foram sujeitos a um período em jejum durante 24 h de forma a garantir que todos se encontravam no mesmo estado metabólico. Depois do jejum, os indivíduos foram transferidos para recipientes de plástico (diâmetro = 15 cm) com 300 mL de água mineral natural (ver Tabela 2), onde foram colocados conjuntos de discos de folhas provenientes da primeira fase experimental (contaminados com diferentes concentrações do mesmo fungicida (exp.A) ou concentrações iguais de fungicidas diferentes (exp.B), proporcionando diferentes opções alimentares ao invertebrado. Foram selecionadas 4 concentrações considerando os resultados obtidos na experiência anterior: 2,45; 38,4; 240 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (figura 4). Foram usadas 10 réplicas, e em cada réplica foi colocado 1 indivíduo. Nas réplicas com diferentes concentrações do mesmo fungicida (figura 4a) foram colocados 16 discos de folhas (4 discos por cada uma das quatro concentrações); nas réplicas com concentrações iguais de fungicidas diferentes foram colocados 12 discos de folhas (4 discos por cada um dos três fungicidas) (figura 4b). Por esta razão, foram necessários 2 diferentes tipos de controlo, um com 16 discos e outro com 12 discos (figura 4c). Os discos de folha de cada microcosmo foram colocados de forma equidistante, ficando fixos com auxílio de um piónés numa rede de malha fina colocada no fundo do recipiente, e o indivíduo foi colocado no centro do recipiente, dando início ao ensaio. Todos os microcosmos tinham arejamento constante, e foram mantidos a 16°C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro (ver figura 5).

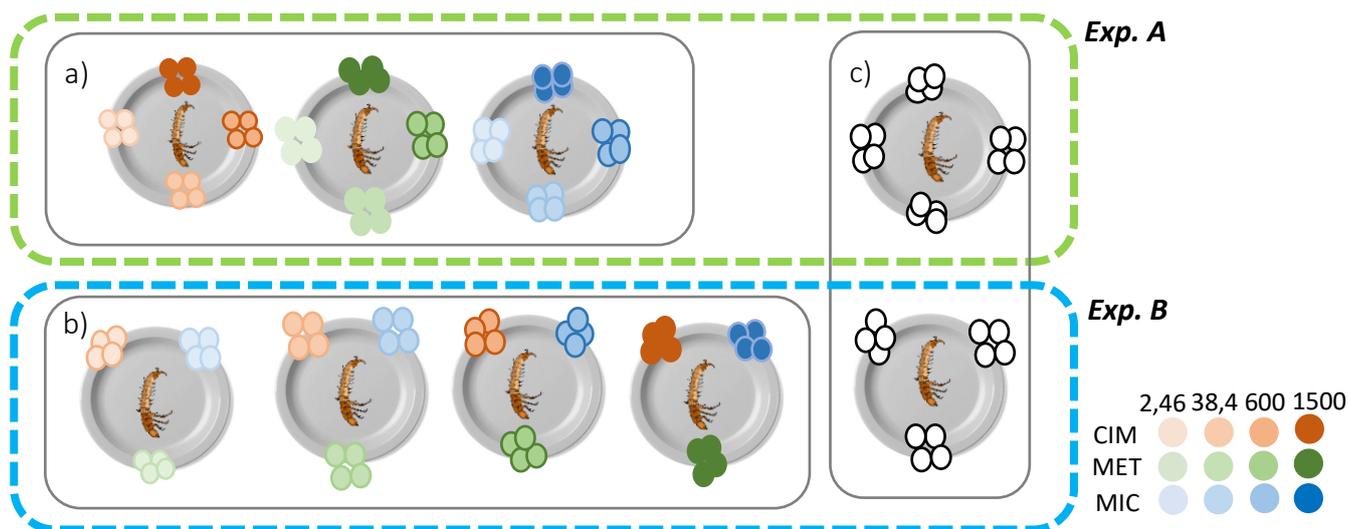


Figura 4 – Desenho experimental utilizado na experiência de preferência alimentar: a) Microcosmos com 4 concentrações diferentes do mesmo fungicida, perfazendo um total de 16 discos de folhas por microcosmos; b) Microcosmos com as mesmas concentrações dos 3 fungicidas em teste, perfazendo um total de 12 discos de folhas por microcosmos; c) grupos controle (sem fungicida), um com 16 discos de folhas, outro com 12. Dentro da secção tracejada verde encontra-se a experiência A (exp. A) onde os indivíduos tem acesso a concentrações diferentes do mesmo fungicida. Dentro da secção tracejada azul encontra-se a experiência B (exp. B) onde os indivíduos tenham acesso a concentrações iguais de fungicidas diferentes. A legenda da figura indica o código de cores utilizado para os fungicidas (CIM – cimoxanil; MET – metalaxil; MIC – miclobutanil) e respectivas concentrações (2,46; 38,4; 240 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A experiência decorreu durante 5 dias. O material foliar que restou da experiência de preferência alimentar foi congelado, liofilizado e depois pesado (massa final, M_f). O consumo de massa foliar foi calculado pela diferença entre a massa inicial (M_i) e final (M_f) dos discos liofilizados, e foi depois normalizado à massa seca de cada indivíduo. Este consumo de massa foliar foi quantificado por cada grupo de 4 discos de folhas, ou seja, cada uma das opções de alimento cedida em cada microcosmo corresponde a uma pesagem, isto permite-nos perceber quanto é que cada indivíduo consumiu de cada fungicida/concentração individualmente. Para determinar a massa seca dos invertebrados, foi medida a largura de cada casulo com auxílio de uma lupa LEICA s8 APO, e a massa seca individual foi estimada de acordo com o modelo de regressão linear $MS = 0,0064C - 0,0181$ ($r^2=0,65$; $P<0,001$; $n=40$), onde MS é a massa seca (g) e C é a largura do casulo em mm (Pradhan et al. 2012).



Figura 5 – Configuração da experiência de preferência alimentar.

3.3 Análise estatística

Para avaliar os efeitos diretos da concentração dos fungicidas na decomposição microbiana da folhada, na taxa de esporulação dos fungos que colonizaram a folhada, e na riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos foi usada uma análise de variância (ANOVA) unifatorial. Quando aplicável, foi usado um *post-hoc* teste de Dunnett para averiguar diferenças entre as concentrações de fungicida e o controlo.

Para avaliar os efeitos indiretos dos fungicidas e da sua concentração na decomposição da folhada mediada por invertebrados foi usada uma análise de variância (ANOVA) de medições repetidas (desenho *split-plot*). Como foram usados dois tipos de desenho experimental (diferentes concentrações do mesmo fungicida vs. concentrações iguais de fungicidas diferentes), estas foram analisadas de forma independente. No primeiro caso, o efeito do fungicida (controlo, miclobutanil, cimoxanil ou metalaxil) foi analisado entre unidades experimentais (recipiente), e os 4 conjuntos de 4 discos (representando diferentes concentrações, exceto no caso do controlo) constituíram fontes de variação dentro das unidades experimentais. No segundo caso, o efeito da concentração (controlo; 2,46; 38,4; 240; 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi analisado entre unidades experimentais (recipiente), e os 3 conjuntos de 4 discos (representando diferentes fungicidas, exceto no caso do controlo) constituíram fontes de variação dentro das unidades experimentais. Em ambos os casos, foi usado um teste de Dunnett para averiguar diferenças relativamente ao(s) controlo(s), quando aplicável.

Todas as análises foram efetuadas no *software R*, versão 3.4.4 (R Core Team, 2018), usando a interface IDE *R Studio* versão 1.1.442 (R Studio Team, 2016). Foram consideradas diferenças significativas quando $P \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1 Efeitos diretos dos fungicidas selecionados na atividade de decompositores microbianos

A comunidade de hifomicetos que colonizou as folhas foi claramente dominada por *Dimorphospora foliicola*, um fungo não identificado (conidium sigmóide), e *Articulospora tetracladia* (em menor proporção). Várias outras espécies contribuíram em menor quantidade numa comunidade globalmente pouco diversificada (4 a 8 taxa). Este padrão não se alterou ao longo do tempo, embora a contribuição de *Lemonniera aquatica*, *Heliscus ludgunensis* e *Goniopila monticola* tenha flutuado (particularmente notório aos 56 dias). Abaixo são descritos e apresentados os efeitos de cada tóxico na composição e diversidade da comunidade, na taxa de esporulação global, bem como na decomposição dos discos de folhas.

4.1.1. Cimoxanil

O cimoxanil não apresentou quaisquer efeitos significativos na taxa de decomposição dos discos de folhas ao fim de 84 dias de experiência (Tabela 3). Nas concentrações mais baixas (2,46 e 38,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) verificou-se um decréscimo subtil da decomposição, embora não significativo (Figura 6a). Após 28 dias de exposição em microcosmos, o cimoxanil afetou subtilmente a taxa de esporulação, mas não de forma significativa (Tabela 3). Pelo contrário, aos 56 dias de exposição observou-se um aumento significativo da esporulação dos hifomicetos aquáticos. Ao fim de 70 dias de exposição não se verificou nenhum efeito do fungicida na taxa de esporulação (Figura 6b).

O número de taxa presentes (riqueza) decresceu significativamente de forma dependente da concentração de cimoxanil, numa fase inicial (28 dias de exposição; Tabela 3; Figura 6c). A riqueza nas concentrações superiores ou iguais a 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi significativamente inferior à observada no controlo (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). Em média, houve uma perda de dois taxa na concentração mais alta (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) relativamente ao controlo (representando uma perda ca. 30%). Esse efeito não foi observável nos restantes períodos avaliados (56 e 70 dias de exposição; Tabela 3 e Figura 6c). O índice de Equitabilidade de Pielou não sofreu qualquer alteração pela exposição ao cimoxanil (Tabela 3; Figura 6d). O cimoxanil não afetou a contribuição relativa das espécies ao longo das concentrações em nenhum dos períodos de exposição (Figura 7). Nessa análise não é perceptível o motivo pelo qual a riqueza diminuiu em todos os tempos de exposição (28, 56 e 74 dias) a partir da concentração 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ver Figura 6c).

Tabela 2 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do cimoxanil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de cimoxanil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).

Variável de resposta	Exposição (dias)	Fonte de variação	g.l	Variância	F	P
Taxa de decomposição	84	Conc.	4	$4,3 \times 10^{-6}$	0,823	0,526
		Residual	19	$5,26 \times 10^{-6}$		
Taxa de esporulação	28	Conc.	4	1,1	1,49	0,245
		Residual	19	0,74		
	56	Conc.	4	0,75	8,02	<0,001
		Residual	19	0,094		
	70	Conc.	4	0,91	1,64	0,206
		Residual	19	0,55		
Riqueza de espécies	28	Conc.	4	2,62	33,3	<0,001
		Residual	19	0,079		
	56	Conc.	4	0,80	2,49	0,078
		Residual	19	0,32		
	70	Conc.	4	0,33	0,239	0,913
		Residual	19	1,43		
Equitabilidade de Pielou (J')	28	Conc.	4	0,026	1,71	0,189
		Residual	19	0,015		
	56	Conc.	4	0,021	1,54	0,231
		Residual	19	0,014		
	70	Conc.	4	0,017	0,062	0,650
		Residual	19	0,027		

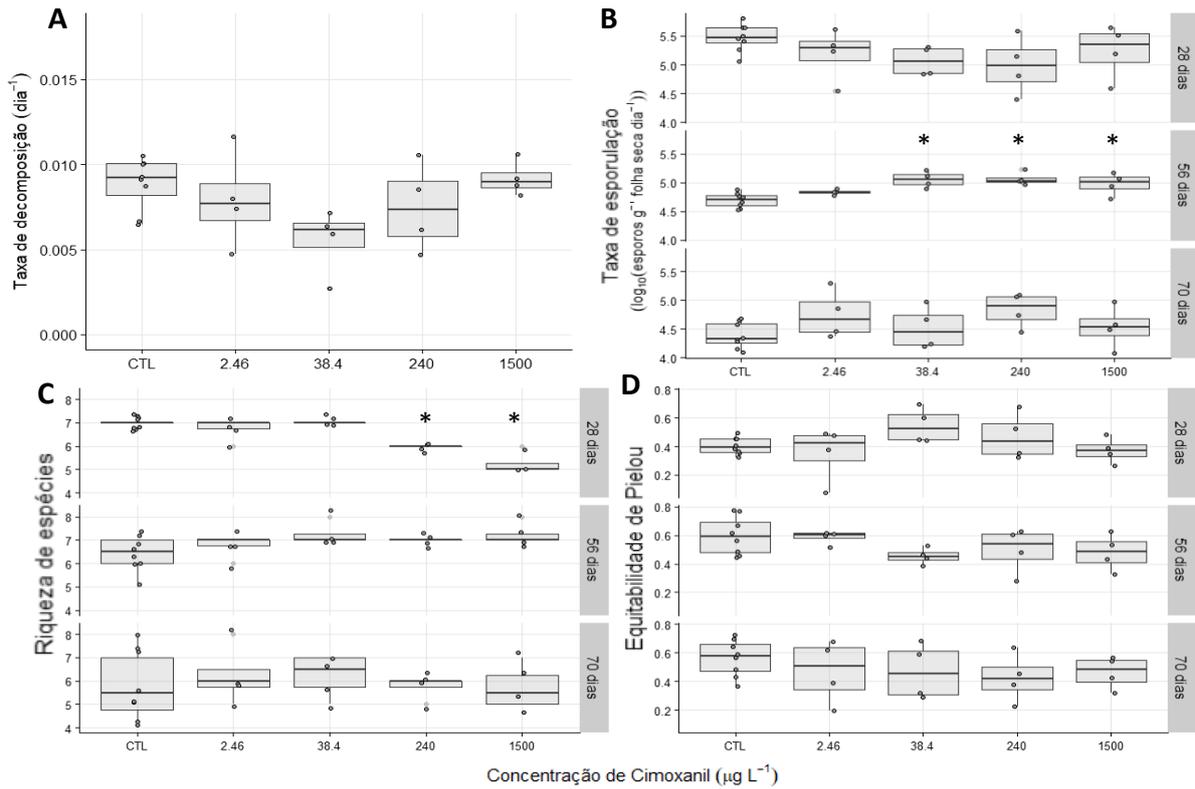


Figura 6 – Efeito do cimoxanil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias). Os asteriscos (*) representam tratamentos que diferem significativamente do controle (ANOVA unifatorial seguida de teste de Dunnett, $P \leq 0,05$).

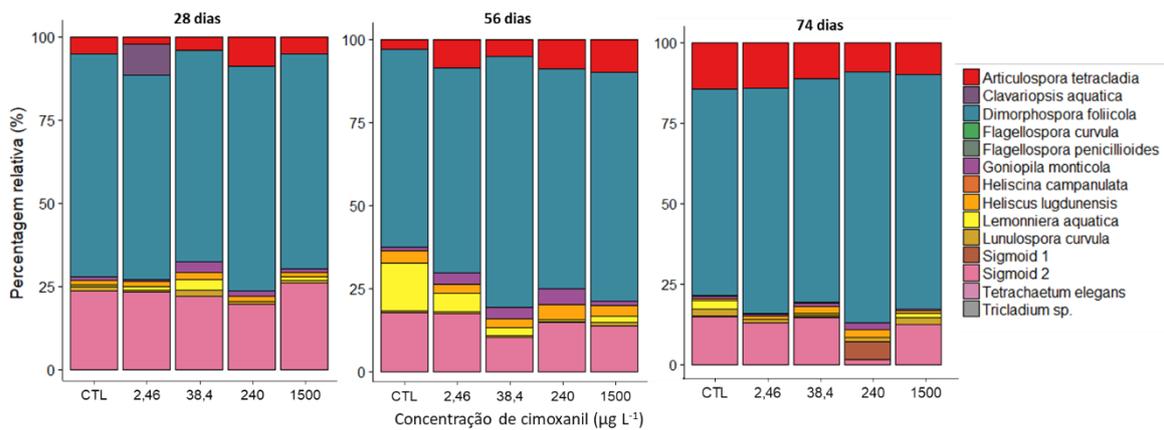


Figura 7 - Efeito do cimoxanil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A percentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.

4.1.2. Metalaxil

Verificou-se que o metalaxil não causou efeitos significativo na taxa de decomposição microbiana da folhada (Tabela 4), embora se possa identificar uma tendência decrescente subtil da decomposição da folhada ao longo das concentrações (Figura 8a). Depois de 28 dias de exposição observou-se uma redução da reprodução de hifomicetos aquáticos na presença de metalaxil (Tabela 4). A taxa de esporulação mais baixa registou-se aos 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$), havendo um decréscimo de ca. 70% em relação à média obtida no grupo controlo. Aos 56 dias de exposição, verificou-se uma estimulação significativa da reprodução de hifomicetos relativamente ao grupo controlo. No último período analisado (70 dias) não se registou qualquer influência do fungicida (Figura 8b).

Durante a exposição do metalaxil verificou-se um efeito subtil sobre a riqueza de espécies ao longo de todos os períodos, mas apenas se observaram efeitos significativos aos 28 e 56 dias de exposição (Tabela 4; Figura 8c). Aos 28 dias de amostragem, o número de taxa presentes na concentração de 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ decresceu ca. 60% em relação grupo controlo (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). A exposição ao metalaxil não causou nenhum efeito na equitabilidade de espécies (Tabela 4; Figura 8d). O metalaxil não afetou a composição específica da comunidade de hifomicetos nos diferentes períodos de amostragem (Figura 9). Apesar disso, verificaram-se algumas flutuações entre a importância do hifomiceto não identificado (conidium sigmóide) e *Dimorphospora foliicola*.

Tabela 3 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do metalaxil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de metalaxil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).

Variável de resposta	Exposição (dias)	Fonte de variação	g.l	Variância	F	P
Taxa de decomposição	84	Conc.	4	2,06×10 ⁶	0,83	0,522
		Residual	19	2,48×10 ⁶		
Taxa de esporulação	28	Conc.	4	1,52	3,17	<0,001
		Residual	19	0,48		
	56	Conc.	4	1,27	10,81	<0,001
		Residual	19	0,12		
	70	Conc.	4	0,98	2,86	0,052
		Residual	19	0,34		
Riqueza de espécies	28	Conc.	4	2,88	6,43	<0,001
		Residual	19	0,45		
	56	Conc.	4	3,47	5,44	0,004
		Residual	19	0,64		
	70	Conc.	4	1,46	0,69	0,606
		Residual	19	2,11		
Equitabilidade de Pielou (J')	28	Conc.	4	0,015	3,44	0,028
		Residual	19	0,004		
	56	Conc.	4	0,015	2,14	0,116
		Residual	19	0,009		
	70	Conc.	4	0,016	0,789	0,546
		Residual	19	0,021		

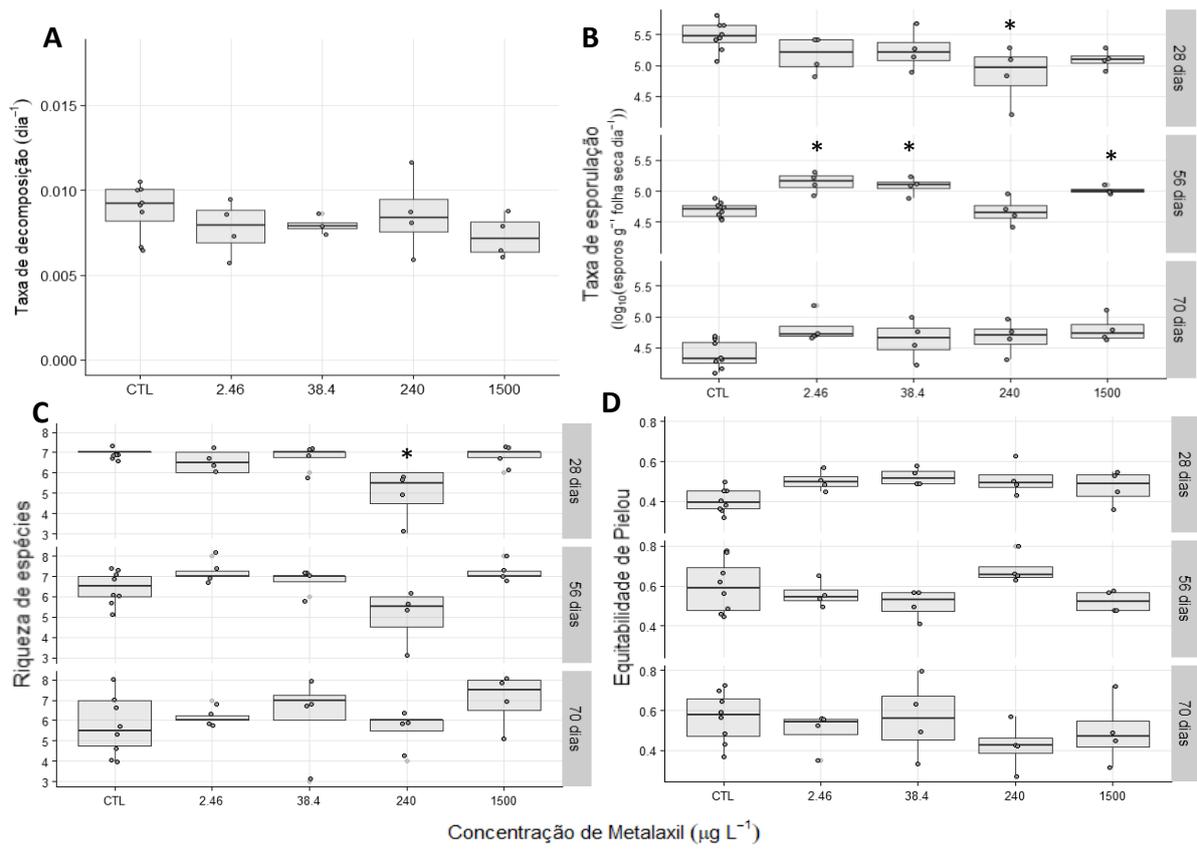


Figura 8 – Efeito do metalaxil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias). Os asteriscos (*) representam tratamentos que diferem significativamente do controle (ANOVA unifatorial seguida de teste de Dunnett, $P \leq 0,05$).

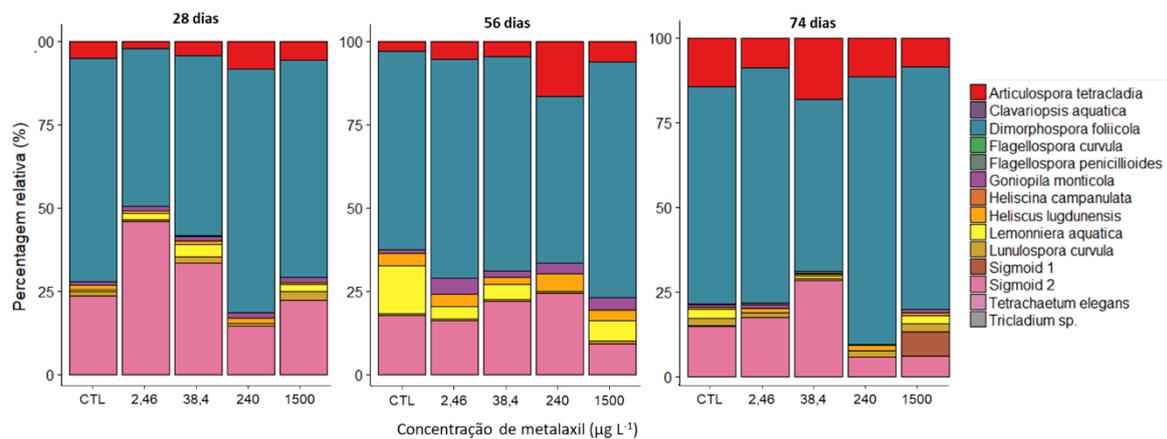


Figura 9 - Efeito do metalaxil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A porcentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.

4.1.3. Miclobutanil

O miclobutanil não afetou a taxa de decomposição da folhada (Tabela 5; Figura 10a). Pelo contrário, o miclobutanil influenciou a taxa de esporulação em todos os períodos avaliados, sendo este efeito mais evidente na concentração mais alta ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 5; Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). Do grupo controlo para a concentração mais alta ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$) a taxa de esporulação decresceu ca. 91, 58 e 66 % para os períodos de 28, 56 e 70 dias, respetivamente (Figura 10b).

Em todos os períodos de exposição ao miclobutanil observou-se uma diminuição significativa na riqueza de espécies presentes (Tabela 5), nos tratamentos com concentrações superiores ou iguais a partir de $240 \mu\text{g L}^{-1}$ (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). Aos 28 dias, do grupo controlo para a concentração mais alta ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$) houve um decréscimo de ca. 39% da riqueza de espécies. (Figura 10c). O miclobutanil não afetou negativamente a equitabilidade ao longo dos períodos amostrados (Figura 10d, Tabela 5).

Não houve alterações claras da contribuição relativa da espécies em função da concentração de miclobutanil, denota-se uma subtil perda de espécies na concentrações mais elevadas ao longo dos períodos de amostragem, principalmente aos 28 dias, o que corrobora com os resultados obtidos na riqueza de espécies (Figura 11).

Tabela 4 – Sumário dos resultados das ANOVA unifatoriais relativamente aos efeitos do miclobutanil na taxa de decomposição, taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade da comunidade de fungos aquáticos. É apresentada a partição da variância entre a componente devida à concentração de miclobutanil (Conc.) e a componente não explicada (Residual), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).

Variável de resposta	Exposição (dias)	Fonte de variação	g.l.	Variância	F	P
Taxa de decomposição	84	Conc.	4	2,55×10 ⁶	0,504	0,733
		Residual	19	5,06×10 ⁶		
Taxa de esporulação	28	Conc.	4	4,299	7,28	<0,001
		Residual	19	0,591		
	56	Conc.	4	1,284	10,1	<0,001
		Residual	19	0,127		
	70	Conc.	4	2,031	5,175	0,005
		Residual	19	0,392		
Riqueza de espécies	28	Conc.	4	7,833	33,07	<0,001
		Residual	19	0,237		
	56	Conc.	4	2,052	5,113	0,005
		Residual	19	0,401		
	70	Conc.	4	4,208	3,017	0,004
		Residual	19	1,395		
Equitabilidade de Pielou (J')	28	Conc.	4	0,067	10,06	<0,001
		Residual	19	0,007		
	56	Conc.	4	0,018	1,542	0,23
		Residual	19	0,012		
	70	Conc.	4	0,033	1,145	0,365
		Residual	19	0,029		

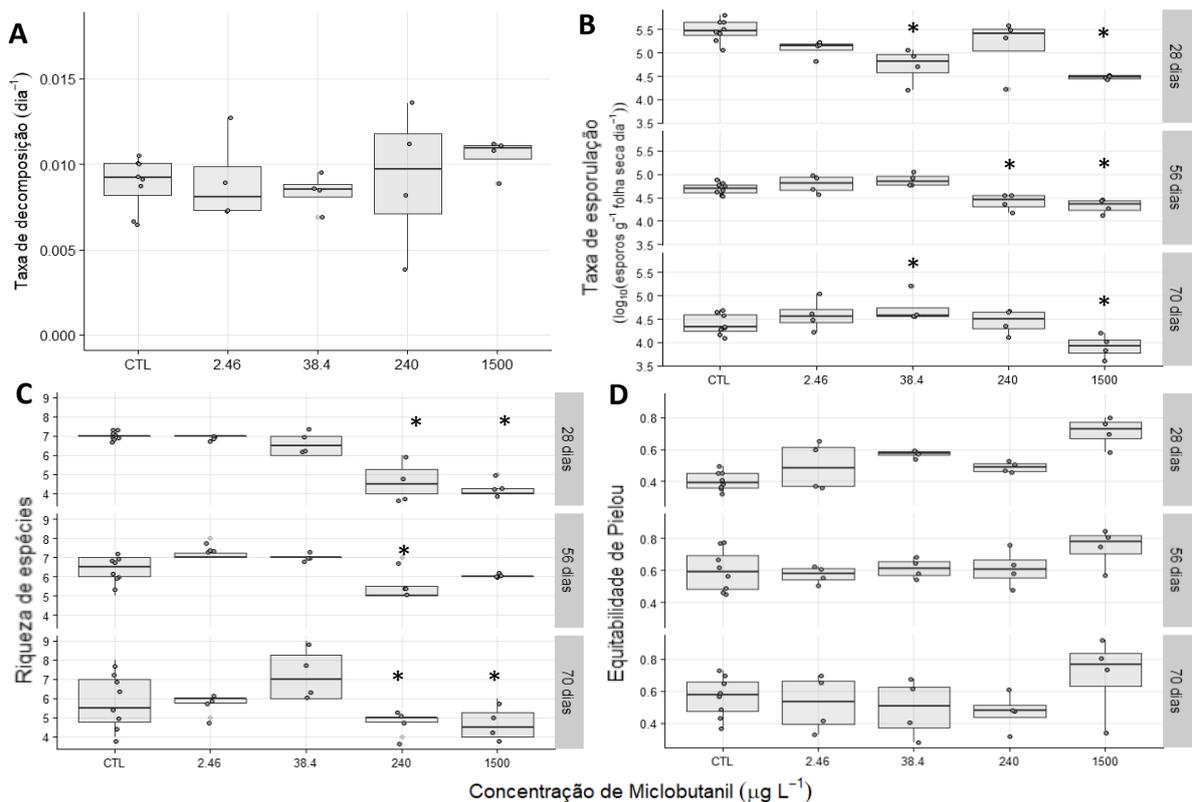


Figura 10 – Efeito do miclobutanil na taxa de decomposição microbiana da folhada ao fim de 84 dias de experiência (A) e efeito na taxa de esporulação (B), riqueza (C) e distribuição da abundância pelos diferentes taxa (equitabilidade) (D) ao longo dos períodos amostrados (28, 56 e 70 dias). Os asteriscos (*) representam tratamentos que diferem significativamente do controle (ANOVA unifatorial seguida de teste de Dunnett, $P \leq 0,05$).

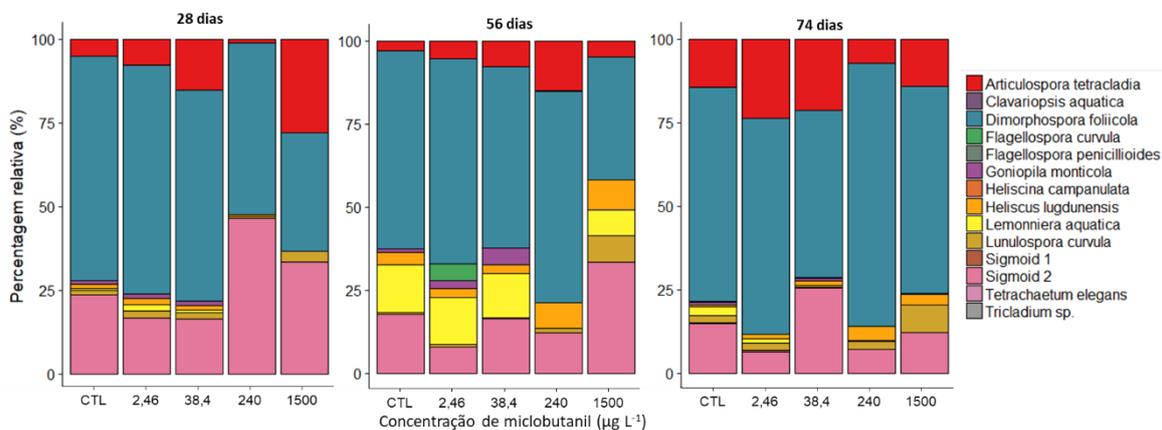


Figura 11 - Efeito do miclobutanil na contribuição relativa de cada espécie no total de conidia produzidos em cada período de exposição (28, 56, 74 dias). A percentagem relativa foi calculada com a média das quatro réplicas.

4.2 Efeitos indiretos dos fungicidas selecionados na preferência alimentar de invertebrados trituradores

Os resultados das duas experiências complementares realizadas foram concordantes. Regra geral, os invertebrados aos quais foram fornecidos discos de folhas que tinham sido expostas aos fungicidas alimentaram-se menos relativamente ao controlo respetivo (Tabela 6). Este efeito foi independente da concentração de fungicida na experiência A e independente do tipo de fungicida na experiência B (ver termos de interação na Tabela 6), como os invertebrados a não revelarem qualquer preferências dentro da mesma unidade experimental. Em suma, a taxa de decomposição média mediada pelos invertebrados foi sempre superior nas folhas não pré-expostas a qualquer concentração dos fungicidas estudados. No entanto, este efeito só foi estatisticamente significativo no caso do cimoxanil para a experiência A (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$); na experiência B, esta diminuição da atividade alimentar foi significativamente inferior ao controlo (Teste de Dunnett, $P \leq 0,05$), exceção feita à concentração mais alta ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 5 – Sumário dos testes estatísticos e significância relativos à avaliação dos efeitos dos fungicidas e sua concentração (Conc.) na taxa de decomposição mediada por invertebrados (ANOVA de medições repetidas). É apresentada a partição da variância entre e dentro unidades experimentais (sujeitos), os respetivos graus de liberdade (g.l.), assim como o teste estatístico (F) e a probabilidade correspondente (P).

Experiência	Fonte de variação	g.l.	Variância	F	P
Diferentes concentrações do mesmo fungicida	Entre sujeitos				
	Fungicida	3	44,3	3,15	0,037
	Dentre sujeitos				
	Conc.	3	13,4	2,02	0,115
	Interação	9	4,39	0,664	0,739
Concentrações iguais de fungicidas diferentes	Entre sujeitos				
	Conc.	4	93,8	4,03	0,007
	Dentre sujeitos				
	Fungicida	2	15,4	2,11	0,127
	Interação	8	3,90	0,54	0,827

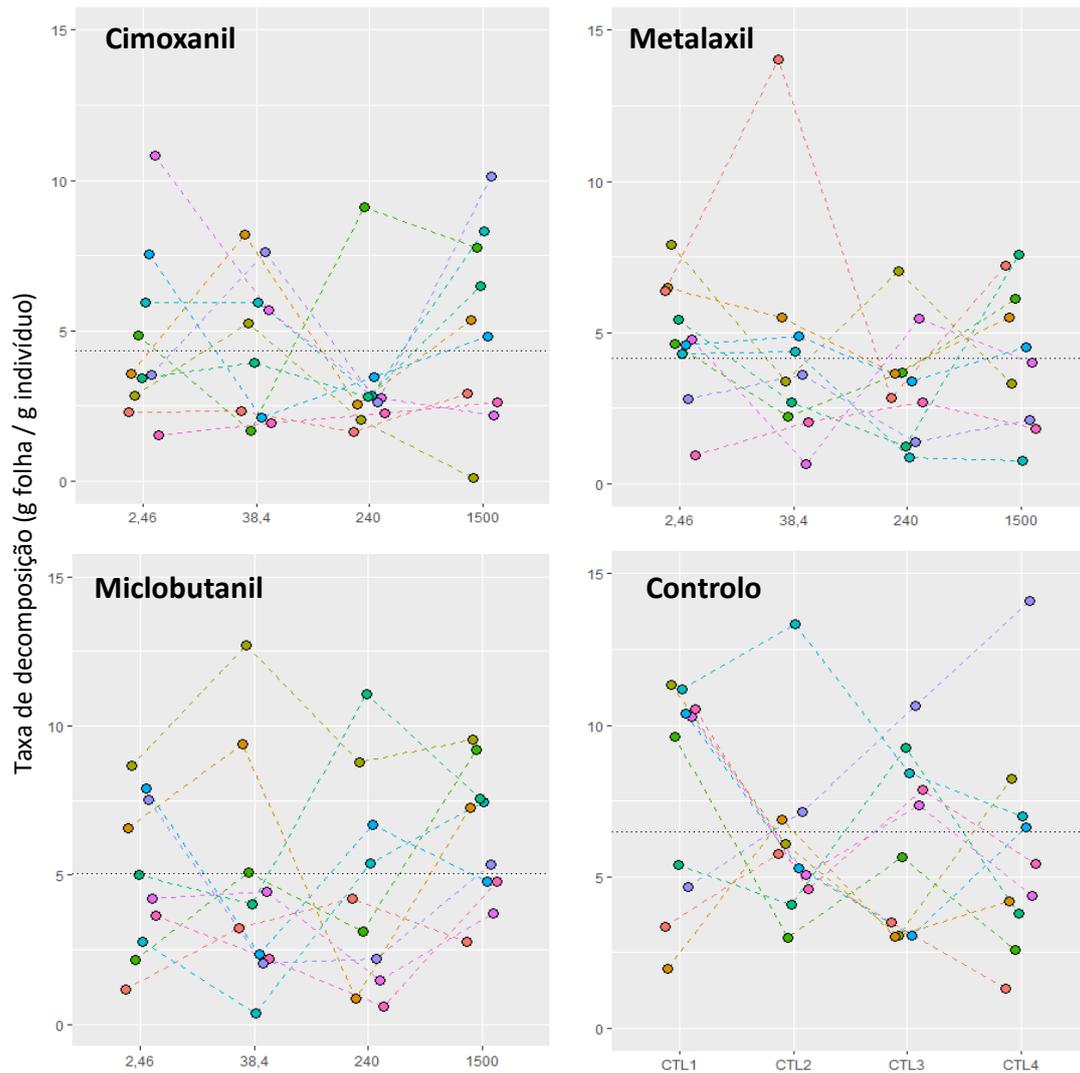


Figura 12 – Decomposição mediada pelo triturador *Allogamus* sp. em ensaios de preferência alimentar. Para cada fungicida (cimoxanil, metalaxil, miclobutanil e controlo) são apresentadas as quatro concentrações (fator dentro dos sujeitos: 2,46; 38,4; 240; 1500 µg L⁻¹; no caso do controlo os tratamentos representam apenas réplicas distintas). Cada cor e linha identifica uma unidade experimental diferente (recipiente). A linha pontilhada é a média global para cada fungicida.

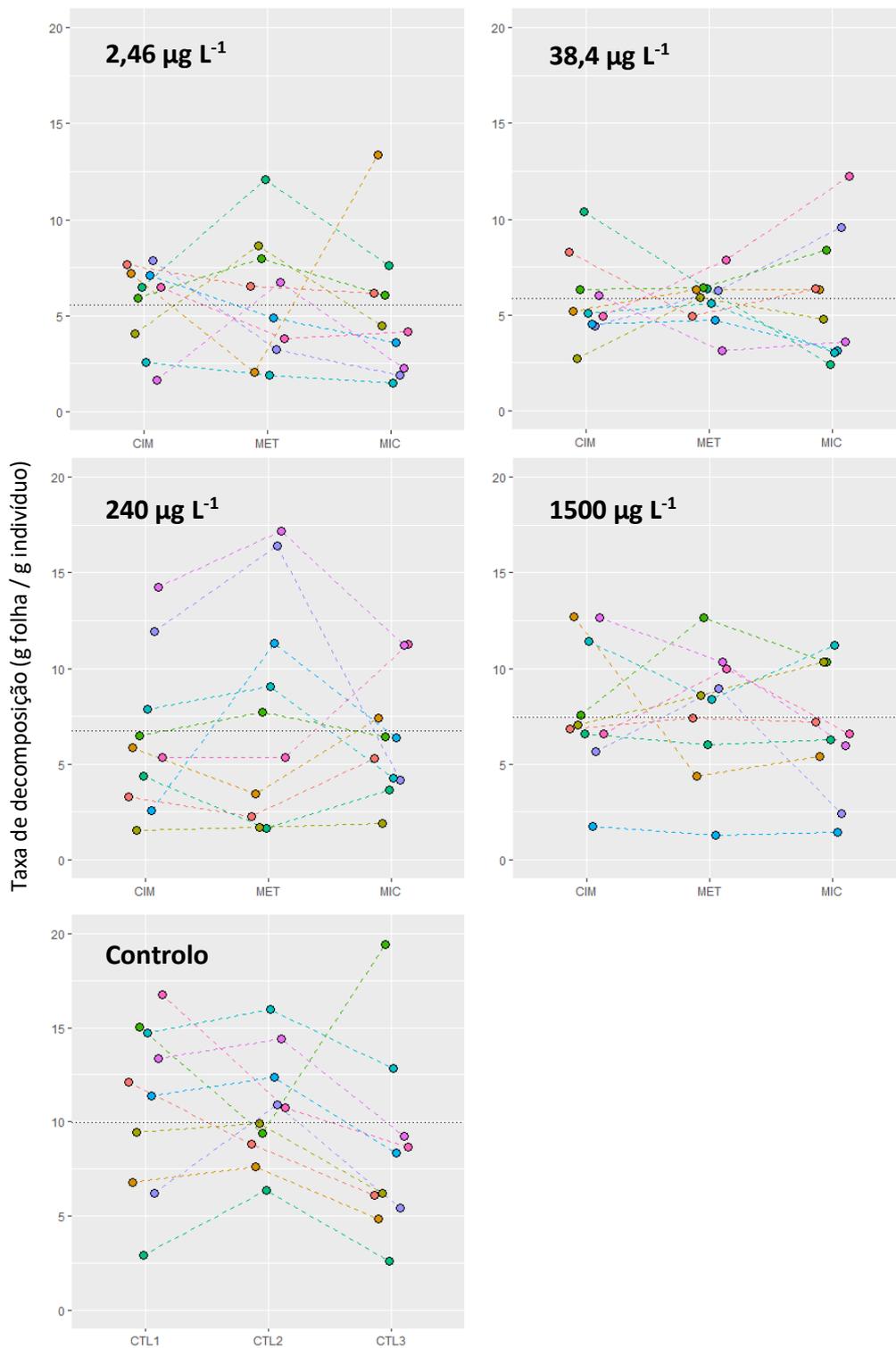


Figura 13 – Decomposição mediada pelo triturador *Allogamus* sp. em ensaios de preferência alimentar. Para cada concentração (controlo e 2,46; 38,4; 240; 1500 µg L⁻¹) são apresentados os três fungicidas (fator dentro dos sujeitos: cimoxanil, metalaxil, miclobutanil; no caso do controlo os tratamentos representam apenas réplicas distintas). Cada cor e linha identifica uma unidade experimental diferente (recipiente). A linha pontilhada é a média global para cada concentração.

5. Discussão

5.1 – Efeitos diretos dos fungicidas na comunidade microbiana e na decomposição da folhada

Nenhum dos fungicidas afetou o processo de decomposição. Pelo contrário, outras variáveis de resposta foram sensíveis à presença dos fungicidas selecionados (ver abaixo), embora a magnitude das respostas tenha sido globalmente subtil. Grande parte dos estudos indicam que a diversidade de fungos e a reprodução são mais afetadas pela presença de fungicidas do que a decomposição foliar (Bundschuh et al. 2011; Zubrod et al. 2011). Lecerf & Chauvet (2008) documentam ainda que dentro de todas as medidas que avaliam o desempenho fúngico (por exemplo, decomposição microbiana das folhas ou a biomassa fúngica) a produção de conidia é o indicador mais sensível do stress antropogénico em rios, incluindo stress causado por pesticidas. Os nossos resultados estão de acordo com esta tendência, a decomposição microbiana das folhas não foi um parâmetro sensível à exposição dos fungicidas, enquanto que a reprodução e riqueza dos hifomicetos apresentou maior sensibilidade.

O nosso estudo foi executado numa dinâmica temporal, de forma a perceber como a comunidade reagia ao longo tempo à exposição aos fungicidas. Este tipo de abordagem já foi usada anteriormente por Artigas et al. (2012) e Feckler (2017). Foi selecionada uma gama de concentrações que envolveu concentrações consideradas ecologicamente relevantes, de acordo com dados ambientais encontrados por outros autores (Bereswill et al. 2012; Martins et al. 2013b), e concentrações de gama alta, que só ocorrem em cenários de carácter extremo. Nas variáveis que avaliam a comunidade de hifomicetos aquáticos, verificaram-se efeitos negligenciáveis na taxa de esporulação, riqueza e equitabilidade de espécies para os fungicidas cimoxanil e metalaxil, enquanto que o miclobutanil causou alguns efeitos subtis e transientes. Regra geral, a riqueza foi o parâmetro mais afetado pela presença dos fungicidas, embora nem em todos os períodos de amostragem. Estudos anteriores também observaram o decréscimo do número de espécies sem observarem alterações na taxa de decomposição da folhada (Pesce et al. 2016). A reprodução dos hifomicetos aquáticos diminuiu na presença de todos os fungicidas na fase inicial, sendo que apenas o miclobutanil manteve esse efeito durante todo o período de exposição. Alguns efeitos observados como o aumento da reprodução sob exposição ao cimoxanil e ao metalaxil aos 56 dias não são explicáveis. Nestes períodos a taxa de esporulação foi estimulada pela presença dos tóxicos. A falta de informação sobre os efeitos ambientais causados por estes compostos em ecossistemas aquáticos não nos permite especular sobre possíveis causas para estes resultados.

O cimoxanil foi o fungicida que menos afetou a estrutura da comunidade. Este fungicida carece de informação ambiental disponível, desconhecendo-se o seu modo de ação (sabe-se que afeta a síntese de DNA e RNA mas como efeito secundário) e toxicidade. Esta falta de informação sobre os efeitos ambientais deste composto nos sistemas aquáticos dificulta a análise comparativa destes resultados. Por norma, este fungicida é sempre aplicado em misturas (DGAV 2017), sendo combinado com outros compostos como mancozebe, tebuconazol, metalaxil, cobre, entre outros. Logo é possível que este composto tenha um efeito sinérgico, potenciando os compostos a que é associado. No futuro seria interessante a realização de mais estudos sobre o cimoxanil uma vez que é um composto muito pouco abordado na literatura ecotoxicológica, e ainda testar o seu efeito em misturas pois é em combinações que é normalmente aplicado na agricultura.

O metalaxil provocou alterações subtis na comunidade de hifomicetos, afetando subtilmente a reprodução e riqueza de hifomicetos. Este fungicida atua inibindo a síntese de RNA, e consequentemente, a mitose celular, o que pode explicar a toxicidade do composto na reprodução dos fungos aquáticos numa fase inicial. O metalaxil têm baixa adsorção (DT50 de 56 dias) e alta mobilidade (K_{oc} de 162), o que indica alto potencial de atingir os sistemas aquáticos. A falta de literatura dos efeitos causados por este composto em ecossistemas aquáticos não nos permite estabelecer comparações.

Por outro lado, o miclobutanil foi o fungicida que causou mais impacto na estrutura da comunidade decompositora, e é também o composto mais persistente (DT50 de 526 dias) e o que possui maior mobilidade (K_{oc} de 517). Este fungicida pertence à família dos compostos azol, para a qual existem bastantes estudos sobre o seu impacto nos sistemas decompositores-detrítivos, sendo grande parte deles sobre o tebuconazol (fungicida com o mesmo modo de ação do miclobutanil). Estudos com o tebuconazol já demonstraram efeitos na comunidade decompositora, no processo de decomposição e também efeitos em níveis tróficos superiores (Artigas et al. 2012a; Dimitrov et al. 2014; Zubrod et al. 2014; Pesce et al. 2016a; Pimentão 2017). No entanto, não existiam ainda estudos sobre o miclobutanil, e este trabalho vem ajudar a preencher essa lacuna. Hof (2001) considera que os compostos azol são agentes fungistáticos, e o seu efeito deve-se sobretudo à incapacidade dos fungos em sintetizarem ergosterol, um componente fundamental da sua membrana plasmática. Dado o historial de impactos no ecossistema que outros estudos já demonstraram para alguns compostos azol, nomeadamente o tebuconazol, seria interessante continuar a estudar outros compostos azol sobre os quais há menos informação disponível, como o penconazol, tetraconazol e fenbuconazol.

Embora haja falta de informação sobre alguns dos fungicidas testados neste estudo, outros estudos com o sistema decompositor testaram compostos da mesma família e com características muito

próximas: Antunes (2013) testou metalaxil-M na decomposição da folhada bem como na comunidade microbiana e obteve efeitos inibitórios significativos tanto na decomposição como na reprodução e riqueza dos hifomicetos associados. Zubrod (2011) e Pimentão (2017) testaram o composto tebuconazol (que pertence ao mesmo grupo do miclobutanil), que atua impedindo a desmetilação do lanosterol em ergosterol, impedindo o crescimento dos fungos. O tebuconazol mostrou anteriormente prejudicar a estrutura e o funcionamento das comunidades microbianas decompositoras (Bundschuh et al. 2011; Dijksterhuis et al. 2011; Zubrod et al. 2011; Pimentão 2017).

Uma das dificuldades na comparação entre resultados com este tipo de modelos experimentais é a variabilidade associada à colonização inicial (e à comunidade microbiana associada aos discos de folhas). Alguns autores documentaram que a comunidade de hifomicetos aquáticos varia sazonalmente (Chauvet and Suberkropp 1998; Nikolcheva and Bärlocher 2004). Para além das flutuações sazonais, podem existir depois dinâmicas transientes à escala local e regional, relacionadas com a envolvente abiótica do sistema ribeirinho. Estas flutuações – sazonais ou episódicas – podem originar diferenças acentuadas na comunidade que coloniza os discos de folhas na fase de condicionamento que antecede a exposição aos contaminantes em estudo. Como resultado das diferenças observadas nos dados de partida (comunidade presente no rio), podem surgir padrões diferentes aquando a contagem e identificação dos conídios presentes em rios, até pelo facto das espécies colonizadoras terem sensibilidades diferentes aos agentes de stress. Neste estudo, obtivemos uma média de 8 espécies presentes nos grupos controlo para os diferentes períodos de amostragem, em que a espécie com maior dominância foi *Dimorphospora foliicola*; estudos anteriores com locais de colonização similares obtiveram 17 espécies no grupo controlo sendo a dominante *Articulospora tetracladia* (Antunes 2013), 8 espécies sendo a dominante *Flagellospora curvula* (Pimentão 2017) e 11 espécies sendo *Articulospora tetracladia* a espécie dominante (Batista 2017). Efetivamente, confirma-se uma substancial variabilidade na riqueza e na composição específica na comunidade microbiana inicial.

A quantificação da comunidade esporulante tem uma importância-chave neste tipo de estudos; isto significa que espécies não-esporulantes não serão detetadas durante a contagem. Com isto, a abundância de conidia pode não refletir verdadeiramente a contribuição das espécies de fungos presentes na degradação do material foliar. Técnicas moleculares como a eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) ou a deteção de polimorfismos genéticos (ex.: T-RFLP) são frequentemente usadas para estudar as comunidades de fungos nos detritos foliares em rios, uma vez que trazem a vantagem de detetar tanto espécies não-esporulantes como esporulantes (Nikolcheva & Bärlocher 2005). Assim, através de técnicas moleculares seria possível obter uma visão mais precisa

sobre a estrutura da comunidade efetiva que coloniza as folhas, bem como uma melhor discriminação dos efeitos dos fungicidas na abundância, riqueza e diversidade da comunidade.

Uma limitação concreta deste estudo prendeu-se com o uso da folha de carvalho como substrato para colonização da comunidade microbiana. Este tipo de folha é nativo da região norte de Portugal, está presente na vegetação ribeirinha de grande parte do rios do NW de Portugal e já foi usado em estudos que envolvem o processo de decomposição da folhada e a comunidade decompositora associada (Batista et al. 2017). Contudo, outros estudos sugerem que este tipo de folhada não é um bom substrato para colonização de microrganismos decompositores, devido à sua baixa concentração em nitrogénio, que torna a sua decomposição muito lenta (Pereira et al. 2016). Este tipo de folha contém também grandes quantidades de substâncias recalcitrantes, como taninos e fenóis, que dificultam a colonização de microrganismos (Sheffer et al. 2015). Outras alternativas como o amieiro são consideradas melhores candidatos para avaliar as funções dos ecossistemas. Diferentes autores verificaram que o amieiro é um melhor indicador do processo de decomposição, a colonização de microrganismos é mais eficiente e por isso é possível obter também respostas mais rápidas da taxa de esporulação e biomassa de fungos (Ferreira et al. 2006; Pozo et al. 2011). Devido à lenta decomposição da folhada a duração da nossa experiência foi mais longa (84 dias) do que noutros estudos (entre 15 a 40 dias) (Artigas et al. 2012a; Antunes 2013; Pimentão 2017), embora a frequência de mudanças de forma a manter uma exposição crónica seja consistente com a literatura (ca. 7 dias) (Zubrod et al. 2011; Artigas et al. 2012; Antunes 2013; Pimentão 2017). Não obstante a dificuldade do processo de decomposição nas folhas de carvalho-alvarinho, a opção aqui tomada é perfeitamente justificada face à abundância desta espécie de árvore nos corredores ripícolas.

5.2 – Efeitos indiretos dos fungicidas na preferência alimentar de invertebrados detritívoros

A toxicidade de fungicidas em invertebrados detritívoros é geralmente testada por via direta, por exposição em água, e não é normalmente considerado o potencial impacto dos fungicidas via alimento. O comportamento alimentar dos invertebrados é uma das ferramentas mais sensíveis em ecotoxicologia para aceder a efeitos sub-letais de contaminantes (Pestana et al. 2008). Os invertebrados de água doce preferem alimentar-se de folhada colonizada por microrganismos, predominantemente fungos, que conseguem com a sua atividade aumentar a palatabilidade da folhada. Como tal, o pressuposto do desenho experimental foi assumir que os fungicidas poderiam interferir na atividade alimentar dos invertebrados via alteração das propriedades da folha, seja pela acumulação do composto na matriz foliar ou pela alteração da comunidade fúngica associada (e consequente modificação do grau de

decomposição das folhas). O desenho experimental utilizado nesta fase, bem como o número de réplicas e o número de indivíduos utilizado é semelhante ao de outros autores, embora a maior parte dos estudos de preferência alimentar não teste compostos antifúngicos (Balibrea et al. 2017; Batista et al. 2017).

Os discos de folhas utilizados no nosso estudo foram pré-colonizados por microrganismos e expostos aos fungicidas, para que a qualidade e palatabilidade da folhagem depois cedida aos invertebrados fosse afetada pelos impactos dos fungicidas na comunidade microbiana, afetando os invertebrados de forma indireta. Considerando os resultados obtidos na primeira fase (ver 5.1) não esperávamos *a priori* obter efeitos indiretos dos fungicidas, uma vez que a comunidade de hifomicetos e a decomposição não mostraram sofrer efeitos diretos dos fungicidas. Pimentão (2017) e Zubrod (2011) obtiveram efeitos diretos dos fungicidas sobre a comunidade decompositora e ainda assim não obtiveram efeitos indiretos na comunidade de invertebrados.

Nesta experiência verificamos que, em suma, os indivíduos não demonstraram preferência alimentar dentro da mesma unidade experimental, mas ainda assim a atividade alimentar foi globalmente inferior na presença dos fungicidas (mais notoriamente no cimoxanil; ver exp. A), independentemente da concentração, quando comparada com o controle (ausência de fungicida). Estatisticamente, há um resultado difícil de explicar (concentração 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$; ver exp. B).

Enquanto os resultados obtidos na comunidade fúngica sugerem que o miclobutanil foi o composto mais tóxico, o cimoxanil foi o composto que mais afetou a alimentação dos invertebrados. Como já anteriormente mencionado, o cimoxanil é um composto que carece de informação disponível e sobre o qual se desconhece o seu modo de ação, o que dificulta a discussão deste resultado. Ainda assim, e olhando para os resultados de ambas as experiências de forma integrada, parece claro que todos os compostos parecem ter o potencial de diminuir a atividade alimentar dos organismos.

Na experiência B, os indivíduos alimentaram-se menos em todas as concentrações comparativamente ao controle, exceto na concentração mais alta. Estudos anteriores reportaram uma relação compensatória entre o nível nutricional da folha e a alimentação do invertebrado, sendo que é possível o invertebrado aumentar o consumo de folhagem para compensar energeticamente a baixa qualidade da mesma (Bärlocher and Premdas 1988; Pesce et al. 2016). Nas unidades experimentais da concentração mais elevada, o invertebrado apenas tinha disponíveis discos pré-expostos a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos fungicidas. Esta concentração foi a que mais causou efeitos na comunidade de fungos, por isso podemos levantar a hipótese de que a qualidade da folha pode ser inferior, levando os indivíduos a alimentarem-se mais na tentativa de compensar energeticamente a má qualidade do

alimento, levando a que todas as concentrações se diferenciem do controlo e a concentração mais tóxica não.

Ainda que sem efeitos tóxicos diretos dos fungicidas na comunidade de fungos colonizadores, efeitos indiretos nutricionais parecem provocar alterações no fluxo de energia para *Allogamus* sp. A presença dos fungicidas durante o processo de condicionamento do material foliar alterou potencialmente a qualidade da folhada, com os invertebrados a reponderem a eventuais alterações subtis no valor nutritivo da folhada ou a presença do tóxico na mesma.

As alterações provocadas pelos fungicidas na comunidade de trituradores podem ter implicações prejudiciais nas teias alimentares associadas aos ecossistemas de rios, podendo reduzir o provisionamento de energia para as comunidades locais e a jusante do rio (Zubrod, 2011). Os invertebrados trituradores são eficientes em transformar matéria particulada grossa, assegurando o fornecimento de energia para os seguintes níveis tróficos, através da produção de matéria orgânica particulada fina, como fezes (Zubrod et al. 2011). As fezes são uma fonte de energia de alta qualidade, constituindo uma grande porção da matéria orgânica fina particulada. A redução da produção de fezes devido à exposição a um poluente pode influenciar a disponibilidade de alimento para espécies coletoras. Para avaliar a continuação dos efeitos indiretos do fungicidas na teia trófica alimentar, como em coletores, teria sido interessante avaliar a produção de fezes dos invertebrados (Newton et al. 2018).

5.3 Considerações finais

No geral, verificámos que todos os fungicidas conseguem afetar a comunidade de hifomicetos aquáticos, ainda que por vezes esses efeitos sejam apenas subtis. O miclobutanil foi o composto mais nocivo para a comunidade de fungos aquáticos, ao passo que o cimoxanil foi o menos nocivo. Efeitos subtis na comunidade decompositora foram capazes de se repercutir em níveis tróficos superiores, embora o mecanismo dessa ligação trófica não tenha ficado claro. Estes efeitos, tanto diretos como indiretos, provocados pelos compostos fungicidas são muitas vezes negligenciados na avaliação do risco ecológico destes agroquímicos.

Normalmente os estudos que abordam os efeitos toxicológicos avaliam os efeitos em fungos aquáticos e em trituradores separadamente, e dessa forma essas avaliações podem ser inadequadas para avaliar de forma confiável os efeitos adversos causados nos ecossistemas de rios.

Estudos ecotoxicológicos com compostos químicos são fundamentais para gerar informação sobre os mesmos, para avaliar o seu risco para os ecossistemas, de forma a ser possível prever e mitigar o seu impacto. A informação obtida neste tipo de estudo é crucial para as autoridades reguladoras e

legisladoras, promovendo também uma escolha mais informada por parte dos consumidores quando adquirem um produto antifúngico. Dados mais detalhados sobre os possíveis efeitos tóxicos de compostos químicos para os ecossistemas aquáticos, podem ajudar a mitigar a enorme pressão antrópica à qual os ecossistemas de água doce estão atualmente sujeitos.

De maneira a complementar este estudo seria interessante a realização de estudos com os fungicidas em misturas, de forma a procurar por possíveis interações de sinergismo ou antagonismo entre fungicidas. Seria também interessante utilizar outro tipo de substrato para colonizar os microrganismos decompositores (como por exemplo, amieiro ou castanheiro) e ainda efetuar a colonização durante diferentes alturas do ano (por exemplo, primavera e outono) de forma a estabelecer comparações com o presente estudo e limitar os possíveis fatores de variabilidade obtidos aquando a colonização da folhada.

6. Referências bibliográficas

- Abelho M, Martins TF, Shinn C, et al (2016) Effects of the fungicide pyrimethanil on biofilm and organic matter processing in outdoor lentic mesocosms. *Ecotoxicology* 25:121–131. doi: 10.1007/s10646-015-1574-x
- Antunes B (2013) Impactos do cobre e do metalaxil-M em cadeias tróficas detritívoras em ribeiros. Tese de mestrado em Ecologia. Escola de ciências, Universidade do minho. 46pp.
- Artigas J, Majerholc J, Foulquier A, et al (2012) Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquat Toxicol* 122–123:197–205. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.06.011
- Balibrea A, Ferreira V, Gonçalves V, Raposeiro PM (2017) Consumption, growth and survival of the endemic stream shredder *Limnephilus atlanticus* (Trichoptera, Limnephilidae) fed with distinct leaf species. *Limnologica* 64:31–37. doi: 10.1016/j.limno.2017.04.002
- Bärlocher F, Premdas PD (1988) Effects of Pentachlorophenol on Aquatic Hyphomycetes. *Mycologia* 80:135–137. doi: 10.1080/00275514.1988.12025513. ISSN:0027-5514
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, A.R., Hall, A.A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *strobilurin Fungic* 58:647–662
- Batista D, Pascoal C, Cássio F (2017) How do physicochemical properties influence the toxicity of silver nanoparticles on freshwater decomposers of plant litter in streams? *Ecotoxicol Environ Saf* 140:148–155. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.039
- Batista DM (2017) Impacts of Silver Nanoparticles in Freshwater Detrital Food-Webs in a Warming Scenario. Tese de doutoramento em Biologia Molecular e Ambiental. Universidade do Minho. 225pp.
- Bereswill R, Golla B, Streloke M, Schulz R (2012) Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agric Ecosyst Environ* 146:81–92. doi: 10.1016/j.agee.2011.10.010
- Bonada N, Zamora-Muñoz C, El Alami M, et al (2008) New records of Trichoptera in reference Mediterranean-climate rivers of the Iberian Peninsula and north of Africa: taxonomical, faunistical and ecological aspects. *Graellsia* 64:188–208. doi: 10.3989/graellsia.2008.v64.i2.32
- Bundschuh M, Zubrod JP, Kosol S, et al (2011) Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquat Toxicol* 104:32–37. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.03.010
- Chamier A-C (2008) Cell-wall-degrading enzymes of aquatic hyphomycetes: a review, *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 91, Issue 1-2, July 1985, Pages 67 - 81, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1985.tb01136.x>
- Chauvet E, Suberkropp K (1998) Temperature and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol* 64:1522–5. PMID: 16349551
- Chung N, Suberkropp K (2008) Influence of shredder feeding and nutrients on fungal activity and community structure in headwater streams. *Fundam Appl Limnol / Arch für Hydrobiol* 173:35–46.

doi: 10.1127/1863-9135/2008/0173-0035

- Cotrufo MF, Del Galdo I, Piermatteo D (2010a) Litter decomposition: Concepts, methods and future perspectives. *Soil Carbon Dyn An Integr Methodol* 76–90. doi: 10.1017/CBO9780511711794.006
- Cotrufo MF, Ngao J, Marzaioli F, Piermatteo D (2010b) Inter-comparison of methods for quantifying above-ground leaf litter decomposition rates. *Plant Soil* 334:365–376. doi: 10.1007/s11104-010-0388-0
- Creed RP, Cherry RP, Pflaum JR, Wood CJ (2009) Dominant species can produce a negative relationship between species diversity and ecosystem function. *Oikos* 118:723–732. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17212.x
- Cuppen JGM, Van Den Brink PJ, Camps E, et al (2000) Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquat Toxicol* 48:233–250. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00036-3
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, et al (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- DGAV (2013) Plano de ação nacional para uso sustentável dos produtos fitofarmacêuticos. In: Contexto nacional da utilização de produtos fitofarmacêuticos. http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=6321372&att_display=n&att_download=y
- DGAV (2017) Inseticidas e fungicidas aplicados na videira. http://www.dgav.pt/fitofarmacêuticos/guia/finalidades_guia/Insec&Fung/Culturas/videira.htm. Accessed 6 Oct 2018
- Dijksterhuis J, Van Doorn T, Samson R, Postma J (2011) Effects of seven fungicides on non-target aquatic fungi. *Water Air Soil Pollut* 222:421–425. doi: 10.1007/s11270-011-0836-3
- Dimitrov MR, Kosol S, Smidt H, et al (2014) Assessing effects of the fungicide tebuconazole to heterotrophic microbes in aquatic microcosms. *Sci Total Environ* 490:1002–1011. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.073
- Donnadieu F, Besse-Hoggan P, Forestier C, Artigas J (2016) Influence of streambed substratum composition on stream microbial communities exposed to the fungicide tebuconazole. *Freshw Biol* 61:2026–2036. doi: 10.1111/fwb.12679
- DRABL (2008) Pragas e doenças da vinha. http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/pragas_doencas_vinha.pdf. Accessed 7 Sep 2018
- Duarte S, Cássio F, Pascoal C (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology—Insights from freshwaters. *Cent Mol Environ Biol* 173–196. doi: 10.5772/38177
- Elskus AA (2011) Toxicity , Sub-lethal Effects and Potential Modes of Action of Select Fungicides on Non-target Aquatic Organisms. DOI: <https://doi.org/10.3133/ofr20121213>
- Feckler A (2017) Chemical stressors influence aquatic ecosystem processes primary consumers. *veriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, 1652-6880 ; 2017:89 ISBN 978-91-7760-068-8
- Fernández D, Voss K, Bundschuh M, et al (2015) Effects of fungicides on decomposer communities and

- litter decomposition in vineyard streams. *Sci Total Environ* 533:40–48. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.090
- Ferreira V, Gulis V, Graça MAS (2006) Whole-stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia* 149:718–729. doi: 10.1007/s00442-006-0478-0
- Fisher DJ, Hayes AL (1982) Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pestic Sci* 13:330–339. doi: 10.1002/ps.2780130316
- FISRWG (1998) Stream Corridor Restoration: Principles, Processes, and Practices. Federal Interagency. Stream Restoration Working Group.
<https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/national/water/manage/restoration/?cid=stelprdb1043244>
- Flores L, Banjac Z, Farré M, et al (2014) Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. *Sci Total Environ* 476–477:532–541. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.059
- Fourie PH (2004) Metalaxyl Sensitivity Status of Downy Mildew Populations in Western Cape Vineyards. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25(1), 19-22. doi:<https://doi.org/10.21548/25-1-2133>
- Gessner (2007) Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. In: *Environmental and Microbial Relationships*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 301–324
- Graça, Cressa, Gessner, et al (2001) Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshw Biol* 46:947–957. doi: 10.1046/j.1365-2427.2001.00729.x
- Graça MA, Pardal MÂ, Marques JC (2002) Aquatic ecology of the Mondego River basin global importance of local experience. doi: 10.14195/978-989-26-0336-0
- Graça MAS, Canhoto C (2006) Leaf litter processing in low order streams is an importante energy source. *Limnetica*, 25(1-2): 1-10 (2006) The ecology of the Iberian inland waters: Homage to Ramon Margalef. Asociación Española de Limnología, Madrid. Spain. ISSN: 0213-8409
- Gustafsson K, Blidberg E, Elfgrén IK, et al (2010) Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. *Ecotoxicology* 19:431–44. doi: 10.1007/s10646-009-0428-9
- Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA (2016) Plant, soil and microbes: Volume 1: Implications in crop science. *Plant, Soil Microbes Vol 1 Implic Crop Sci* 1–366. doi: 10.1007/978-3-319-27455-3
- Heimbach, F., Brock, T., Arts, G., and Deneer J (2002) Effects of multiple applications of Tolyfluanid WG50 on the aquatic community in outdoor microcosm enclosures. Bayer AG Report No.: HBF/Mt 14 GLP
- Hof H (2001) Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 45,11 (2001): 2987-90. doi:10.1128/AAC.45.11.2987-2990.2001
- Hooper DU (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75:3–35. doi: 10.1890/04-0922
- Hrelia P, Maffei F, Fimognari C, et al (2009) Cytogenetic effects of 8-Cl-cAMP on human and animal

- chromosomes. *J BUON* 14:71–77. doi: 10.1016/S0165-1218(96)90051-8
- I.V.V (2016) Dados estatísticos do sector vitivinícola. <http://www.ivv.gov.pt/np4/estatistica/>. Accessed 9 Jul 2017
- Instituto da água IP (2009) Critérios para a classificação do estado das massas de água superficiais rios e albufeiras. Ministério do ambiente, do ordenamento do território e do desenvolvimento regional. <https://www.apambiente.pt/dqa/assets/crit%C3%A9rios-classifica%C3%A7%C3%A3o-rios-e-albufeiras.pdf>
- Johnson PTJ, Chase JM, Dosch KL, et al (2007) Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proc Natl Acad Sci* 104:15781–15786. doi: 10.1073/pnas.0707763104
- Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, et al (2008) Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environ Sci Technol* 42:7193–7200. doi: 10.1021/es8009309
- Knäbel A, Meyer K, Rapp J, Schulz R (2014) Fungicide field concentrations exceed FOCUS surface water predictions: Urgent need of model improvement. *Environ Sci Technol* 48:455–463. doi: 10.1021/es4048329
- Komárek M, Cadková E, Chrastný V, et al (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* 36:138–51. doi: 10.1016/j.envint.2009.10.005
- Lecerf A, Chauvet E (2008) Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshw Biol* 53:1658–1672. doi: 10.1111/j.1365-2427.2008.01986.x
- Legendre, P. & Legendre L (1998) Numerical ecology. Developments in environmental modeling, Elsevier Science. ISBN: 9780080523170
- Li Y, Dong F, Liu X, et al (2015) Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. *Chemosphere* 122:145–153. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.11.031
- Lin R, Buijse L, Dimitrov MR, et al (2012) Effects of the fungicide metiram in outdoor freshwater microcosms: responses of invertebrates, primary producers and microbes. *Ecotoxicology* 21:1550–1569. doi: 10.1007/s10646-012-0909-0
- Martins MR, Pereira P, Lima N, Cruz-Morais J (2013a) Degradation of metalaxyl and folpet by filamentous fungi isolated from portuguese (alentejo) vineyard soils. *Arch Environ Contam Toxicol* 65:67–77. doi: 10.1007/s00244-013-9877-5
- McGrath MT (2004) What are fungicides. In: *The plant health instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01. pp 801–825
- Mercan H, Inam R (2010) Determination of cymoxanil fungicide in commercial formulation and natural water by square-wave stripping voltammetry. *Clean - Soil, Air, Water* 38:558–564. doi: 10.1002/clen.201000038
- Morrice P, Trabue S, Anderson JJ, et al (2004) Kinetics and Mechanism of Cymoxanil Degradation in Buffer Solutions. *J Agric Food Chem* 52:99–104. doi: 10.1021/jf034757w
- Newton K, Zubrod JP, Englert D, et al (2018) The evil within? Systemic fungicide application in trees enhances litter quality for an aquatic decomposer-detritivore system. *Environ Pollut* 241:549–556. doi: 10.1016/j.envpol.2018.05.069

- NICIF (2006) Recuperação do património e da paisagem de socalcos. ISBN: 972-99462-3-X, CEGOT-Ce
- Nikolcheva LG, Bärlocher F (2004) Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol Prog* 3:41–49. doi: 10.1007/s11557-006-0075-y
- Örnek GP (2018) Determination of the changes in the process of degradation of some pesticides applied in mixtures with plant growth regulators , foliar fertilizers and spreader-striker in a vineyard. *Turkish Journal of Entomology*, 42 (3), 185-203. DOI: 10.16970/entoted.410035
- Pascoal C, Cassio F (2004) Contribution of Fungi and Bacteria to Leaf Litter Decomposition in a Polluted River. *Appl Environ Microbiol* 70:5266–5273. doi: 10.1128/AEM.70.9.5266-5273.2004
- Pascoal C, Cássio F, Gomes P (2001) Leaf Breakdown Rates: a Measure of Water Quality? *Int Rev Hydrobiol* 86:407–416. doi: 10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P
- Pereira A, Geraldes P, Lima-Fernandes E, et al (2016) Structural and functional measures of leaf-associated invertebrates and fungi as predictors of stream eutrophication. *Ecol Indic* 69:648–656. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.05.017
- Pesce S, Zoghalmi O, Margoum C, et al (2016) Combined effects of drought and the fungicide tebuconazole on aquatic leaf litter decomposition. *Aquat Toxicol* 173:120–131. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.01.012
- Pestana JLT, Alexander AC, Culp JM, et al (2008) Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environ Pollut* 157:2328–34. doi: 10.1016/j.envpol.2009.03.027
- Pimentão AR (2017) The role of specialists vs . generalists in ecosystem processes under environmental stress. Tese de mestrado em Ecologia. Escola de Ciências da Universidade do Minho.
- Pose-Juan E, Rial-Otero R, Paradelo M, et al (2010) Behaviour of metalaxyl as copper oxychloride-metalaxyl commercial formulation vs. technical grade-metalaxyl in vineyards-devoted soils. *J Hazard Mater* 174:181–187. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.09.034
- Postel, S., Richter B (2003) *Rivers for Life: Managing Water for People and Nature*. Isl Press Washinton, DC. ISBN-10: 1559634448
- Pozo J, Casas J, Menéndez M, et al (2011) Leaf-litter decomposition in headwater streams: a comparison of the process among four climatic regions. *J North Am Benthol Soc* 30:935–950. doi: 10.1899/10-153.1
- Pradhan A, Seena S, Pascoal C, Cassio F (2011) Can increased production ad usage of metal nanoparticles be a threat to freshwater microbial decomposers? *Microbial Ecology*. 62(1):58-68. doi: 10.1007/s00248-011-9861-4
- Pradhan A, Seena S, Pascoal C, Cássio F (2012) Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder *Allogamus ligonifer*. *Chemosphere* 89:1142–1150. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.001
- Raymond S. , Burden .David T. CGAC (1989) Phytochemistry Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi. *Phytochemistry*. Volume 28, Issue 7, 1989, Pages 1791-1804
- Roessink I, Crum SJH, Bransen F, et al (2006) Impact of triphenyltin acetate in microcosms simulating floodplain lakes. I. Influence of sediment quality. *Ecotoxicology* 15:267–293. doi:

10.1007/s10646-006-0058-4

- Schaeffer RN, Vannette RL, Brittain C, et al (2017) Non-target effects of fungicides on nectar-inhabiting fungi of almond flowers. *Environ Microbiol Rep* 9:79–84. doi: 10.1111/1758-2229.12501
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12:40–79; DOI: 10.1128/CMR.12.1.40
- Sheffer E, Canham CD, Kigel J, Perevolotsky A (2015) Countervailing effects on pine and oak leaf litter decomposition in human-altered Mediterranean ecosystems. *Oecologia* 177:1039–1051. doi: 10.1007/s00442-015-3228-3
- Stensvold CR, Jorgensen LN, Arendrup MC (2012) Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Curr Fungal Infect Rep* 6:178–191. doi: 10.1007/s12281-012-0097-7
- Suberkropp K (1998) Effects of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. *Mycol Res* 102: 998–1002.
- Toffolatti SL, Venturini G, Campia P, et al (2015) Sensitivity to cymoxanil in Italian populations of *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Manag Sci* 71:1182–1188. doi: 10.1002/ps.3906
- van Wijngaarden RPA, Arts GHP, Belgers JDM, et al (2010) The species sensitivity distribution approach compared to a microcosm study: a case study with the fungicide fluazinam. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:109–22. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.09.019
- Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, et al (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467:555
- Vu HT, Keough MJ, Long SM, Pettigrove VJ (2017) Effects of two commonly used fungicides on the amphipod *Austrochiltonia subtenuis*. *Environ Toxicol Chem* 36:720–726. doi: 10.1002/etc.3584
- Webster JR, Benfield EF (1986) Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* 17:567–594. doi: 10.1146/annurev.es.17.110186.003031
- Willming MM, Maul JD (2016) Direct and indirect toxicity of the fungicide pyraclostrobin to *Hyalella azteca* and effects on leaf processing under realistic daily temperature regimes. *Environ Pollut* 211:435–442. doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.029
- Wurzbacher C, Kerr J, Grossart H-P (2011) Aquatic Fungi. In: The dynamical processes of biodiversity-case studies of evolution and spatial distribution. pp 227–258 DOI: 10.5772/23029
- Zarn JA, Brüsweiler BJ, Schlatter JR (2003) Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect* 111:255–261. doi: 10.1289/ehp.5785
- Zubrod JP, Baudy P, Schulz R, Bundschuh M (2014) Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquat Toxicol* 150:133–143. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.002
- Zubrod JP, Bundschuh M, Feckler A, et al (2011) Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environ Toxicol Chem* 30:2718–2724. doi: 10.1002/etc.679
- Zubrod JP, Englert D, Wolfram J, et al (2015) Waterborne toxicity and diet-related effects of fungicides in the key leaf shredder *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Aquat Toxicol* 169:105–112.

doi: 10.1016/j.aquatox.2015.10.008