

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Eduardo Joaquim Marinho da Silva

A seca e o enriquecimento em nutrientes
afetam mais a diversidade do que as funções
das comunidades decompositoras nos rios

A seca e o enriquecimento em nutrientes afetam mais a diversidade do
que as funções das comunidades decompositoras nos rios

Eduardo Joaquim Marinho da Silva

UMinho | 2023





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Eduardo Joaquim Marinho da Silva

**A seca e o enriquecimento em nutrientes
afetam mais a diversidade do que as
funções das comunidades decompositoras
nos rios**

Dissertação de Mestrado
Biodiversidade, Ecologia e
Alterações Globais

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)
Dr. Isabel Rodrigues Fernandes
Prof. Dr. Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

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

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

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



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Quero dirigir algumas palavras a todos aqueles que direta e/ou indiretamente me ajudaram durante este período e contribuíram para a realização deste trabalho:

À Prof^a Cláudia Pascoal por todo o conhecimento transmitido e apoio durante não só o mestrado, mas também desde que foi minha professora na licenciatura.

Para a Isabel e a Diana Graça, sinto-me lisonjeado por ter trabalhado com ambas. Desde a minha primeira aparição no laboratório que ambas me acolheram, ajudaram e orientaram, sem dúvida que a vossa presença foi marcante. Não posso deixar de agradecer por todo o apoio e companheirismo que demonstraram nos inúmeros motivos construídos neste último ano, especialmente nos momentos mais difíceis. Não existem palavras suficientes para vos agradecer às duas. E que isto não seja uma despedida, mas sim um até já.

Ao José Trábulo, José Pedro, Paulo, Francisco, Daniel e à Rita por todos os bons momentos no laboratório e por toda a ajuda e companheirismo!

À Mónica e Edgar por todo o apoio que me deram, e ainda dão, para eu alcançar os meus objetivos. E por terem estado ao meu lado nos momentos mais difíceis. Não existem palavras suficientes para vos agradecer.

Ao Christopher por toda ajuda, paciência e apoio nesta etapa da minha vida. E por teres estado ao meu lado nos momentos mais difíceis. Sem ti nada disto teria sido possível. Obrigado por não me deixares desistir!

À minha Mãe e ao meu Pai por, até agora, não me deixarem desistir de perseguir os meus objetivos, por todo o apoio que me deram e por terem feito mais do que podiam, às vezes, para me darem a oportunidade de me formar! Um enorme obrigado!

À minha irmã, que com certeza, é a minha melhor amiga e um enorme apoio em todas as minhas decisões! Obrigado por toda a paciência, que tiveste, e ajuda para concluir esta etapa.

Este trabalho foi apoiado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização na vertente FEDER e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P. (FCT, IP) na vertente OE no âmbito do projeto “STREAMECO – Biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas sob alterações climáticas: do gene até ao rio” (PTDC/CTA-AMB/31245/2017). O estudo teve também o apoio de fundos nacionais da FCT, I.P. através do “Contrato-Programa” UIDB/04050/2020 com o Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), e do projeto LA/P/0069/2020 concedido ao Laboratório Associado ARNET.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

A seca e o enriquecimento em nutrientes afetam mais a diversidade do que as funções das comunidades decompositoras nos rios

Resumo

Os cenários de alterações climáticas preveem um aumento da temperatura global e alterações nos regimes de precipitação, que podem intensificar os períodos de seca e as concentrações de nutrientes nas águas doces. Nos ribeiros, a decomposição da matéria orgânica é um processo chave ao nível do ecossistema onde os fungos aquáticos desempenham um papel fundamental.

Neste trabalho, avaliamos os efeitos combinados da exposição ao aumento das concentrações de nutrientes (azoto - N e fósforo - P) e de condições de seca na decomposição de folhas e na diversidade e atividade das comunidades fúngicas associadas às folhas em decomposição em ribeiros. Folhas de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) foram colonizadas por imersão 10 dias num ribeiro de referência e depois expostas em microcosmos durante 21 dias a um gradiente de nutrientes (5 níveis; de $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^- + 0,0065 \text{ mg L}^{-1} \text{ P- PO}_4^{3-}$ até $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^- + 0,6452 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$) e dois regimes hidrológicos (permanente ou intermitente: 14 dias de seca seguidos de 7 dias de re-humedecimento).

A decomposição da folhada não foi afetada pela exposição a nutrientes ou pela seca. A biomassa e a reprodução dos fungos foram estimuladas com níveis mais elevados de nutrientes, mas não foram afetadas pela seca. Os nutrientes tiveram um efeito positivo na riqueza em espécies de fungos aquáticos, no índice de diversidade de Shannon e na equitabilidade de Pielou, enquanto a seca teve um efeito negativo nestas métricas de diversidade. Além disso, a exposição ao aumento da concentração de nutrientes e à seca levou a mudanças na estrutura das comunidades de fungos. *Articulospora tetracladia*, *Anguillospora filiformis* e *Flagellospora curvula* foram as espécies dominantes, e *A. tetracladia* e *A. filiformis* foram favorecidas quando expostas à seca, enquanto *F. curvula* teve uma tendência oposta.

No geral, a exposição ao aumento das concentrações de nutrientes e às condições de seca nos ribeiros parece ter impactos mais fortes na diversidade dos fungos e na estrutura da comunidade do que na atividade dos fungos e no funcionamento do ecossistema.

Palavras-chave: fungos aquáticos, decomposição de folhada, mudanças climáticas, rios intermitentes, múltiplos agentes de stress

Drying and nutrient enrichment affect more the diversity than the functions of decomposer communities in rivers

Abstract

Climate change scenarios predict an increase in global temperature and changes in precipitation regimes, which could intensify dry periods and nutrient concentrations in fresh waters. In streams, the decomposition of organic matter is a key process at the ecosystem level where aquatic fungi play a fundamental role.

In this work, we evaluated the combined effects of exposure to increased nutrient concentrations (nitrogen - N and phosphorus - P) and drying conditions on leaf decomposition and on the diversity and activity of fungal communities associated with decomposing leaves in streams. Alder leaves (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) were colonized by immersion for 10 days in a reference stream and then exposed in microcosms for 21 days to a nutrient gradient (5 levels; 0,1 mg L⁻¹ N-NO₃⁻ + 0,0065 mg L⁻¹ P- PO₄³⁻ até 10 mg L⁻¹ N-NO₃⁻ + 0,6452 mg L⁻¹ P-PO₄³⁻) and two hydrological regimes (permanent or intermittent: 14 days of drying followed by 7 days of re-wetting).

Litter decomposition was not affected by nutrient exposure or drying. Fungal biomass and reproduction were stimulated by higher nutrient levels but were not affected by drying. Nutrients had a positive effect on fungal taxa richness, Shannon diversity index, and Pielou evenness, whereas drying had a negative effect on these diversity metrics. Furthermore, exposure to increased nutrient concentrations and drying led to changes in the structure of fungal communities. *Articulospora tetracladia*, *Anguillospora filiformis* and *Flagellospora curvula* were the dominant species, and *A. tetracladia* and *A. filiformis* were favored when exposed to drying, while *F. curvula* had an opposite trend.

Overall, exposure to increased nutrient concentrations and drying conditions in streams appears to have stronger impacts on fungal diversity and community structure than on fungal activity and ecosystem functioning.

Keywords: aquatic fungi, leaf decomposition, climate change, intermittent rivers, multiple stressors

Índice

1. Introdução	1
1.1. Alterações globais e a biodiversidade	1
1.2. Decomposição da matéria orgânica em ecossistemas fluviais	3
1.3. Decomposição de folhada e enriquecimento em nutrientes	6
1.4. Decomposição de folhada e seca.....	8
1.5. Múltiplos agentes de stress e decomposição de folhada: enriquecimento em nutrientes e seca	11
1.6. Objetivo do trabalho	14
2. Métodos.....	14
2.1. Desenho experimental.....	14
2.2. Local de amostragem para a colonização microbiana	15
2.3. Microcosmos	16
2.4. Biomassa fúngica.....	18
2.5. Taxa de reprodução e identificação dos fungos aquáticos.....	18
2.6. Perda de massa foliar	19
2.7. Análise estatística.....	19
3. Resultados	20
3.1. Decomposição da folhada	20
3.2. Biomassa dos fungos aquáticos.....	24
3.3. Taxa de reprodução dos fungos aquáticos	25
3.4. Diversidade dos fungos aquáticos.....	26
4. Discussão	30
4.1. Efeito da seca e do enriquecimento em nutrientes nas funções ecológicas dos fungos aquáticos.....	30
4.2. Efeito da seca e do enriquecimento em nutrientes na diversidade dos fungos aquáticos	33
4.3. Conclusões e perspectivas futuras.....	35
5. Referências.....	36
Anexos.....	49

Índice de Figuras

Figura 1. Metodologia usada para a colonização das comunidades microbianas existentes no rio Agra.....	16
Figura 2. Desenho experimental para avaliar os efeitos concomitantes das concentrações de nutrientes e da emersão na decomposição e nas comunidades microbianas.	17
Figura 3. Taxa de decomposição das folhas expostas a um gradiente de nutrientes e a dois regimes hidrológicos.....	21
Figura 4. Taxa de produção de biomassa fúngica nas folhas expostas a um gradiente de nutrientes e a dois regimes hidrológicos.....	24
Figura 5. Taxa de esporulação dos fungos existentes nas folhas expostas a um gradiente de nutrientes e a dois regimes hidrológicos.....	25
Figura 6. Riqueza de espécies (A), Índice de Shannon (B) e Equabilidade de Pielou (C) das comunidades de hifomicetos aquáticos associadas às folhas de amieiro.	26
Figura 7. Contribuição percentual de cada táxon de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídios durante a decomposição de folhas de amieiro.....	28
Figura 8. Ordenação PCoA das comunidades fungos aquáticos estruturada pelos níveis de nutrientes e tipo de hidrologia.....	30

Índice de Tabelas

Tabela 1. Two-way ANOVA's sobre o efeito da hidrologia e do gradiente de nutrientes na perda de massa foliar, na biomassa fúngica, na taxa de esporulação, na riqueza e nos dois índices de biodiversidade (índice de Shannon e equabilidade de Pielou).	22
Tabela 1. Two-way ANOVA's sobre o efeito da hidrologia e do gradiente de nutrientes na perda de massa foliar, na biomassa fúngica, na taxa de esporulação, na riqueza e nos dois índices de biodiversidade (índice de Shannon e equabilidade de Pielou). (continuação).....	23
Tabela 2. PERMANOVA sobre o efeito da hidrologia e de um gradiente de nutrientes nas comunidades de fungos aquáticos.	29

1. Introdução

1.1. Alterações globais e a biodiversidade

Desde meados do século 20 que a população humana tem crescido de forma exponencial, e esse crescimento levou a alterações nas condições ambientais (WWF, 2016). Face a essa mudança, Paul Crutzen (2002), vencedor de Prémio Nobel, e outros investigadores propuseram que fosse feita a transação do Holoceno para uma nova época geológica, denominando-a de “Antropoceno” (Waters et al., 2016), na qual as atividades humanas começaram a ter um impacto global significativo no clima da Terra e no funcionamento dos seus ecossistemas. Nos últimos anos, tem existido uma enorme preocupação com a perda de biodiversidade, pois temos enfrentado taxas de extinção de espécies de magnitudes maiores do que aquelas que têm ocorrido nos últimos milhões de anos (Argyroudi et al., 2009; Loreau, 2010; Thomas et al., 2004; WWF, 2016, 2018). Entre a comunidade científica, há a preocupação, de o Antropoceno poder ser marcado pela sexta extinção em massa do planeta devido à magnitude do impacto que a população humana está a causar, e por essas mudanças estarem a acontecer com a duração de uma única vida humana (WWF, 2016).

Alguns dos sistemas mais alterados da Terra incluem os sistemas de água doce, que apresentam as taxas mais altas de perda de espécies (Abelho & Graça, 2006; Covich et al., 2004; Dudgeon, 2019; Reid et al., 2019) e estão entre os ecossistemas mais ameaçados (Abelho & Graça, 2006; Dudgeon, 2019; Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019; Vorosmarty et al., 2010), pois estão sujeitos a uma grande variabilidade espacial e temporal de condições ambientais, como a temperatura, a precipitação e a disponibilidade em nutrientes (Bellemare et al., 2002; Chapin et al., 2000; Tilman et al., 1997). Ao contrário dos ecossistemas terrestres, os ecossistemas aquáticos possuem menos limitações na dispersão de propágulos e nas trocas de matéria intra- e/ou interespecífica, o que leva a que os processos biológicos sejam mais rápidos nestes ecossistemas (Giller et al., 2004). Assim, tem sido salientada a importância de investigar se os ecossistemas de água doce com menos espécies serão capazes de manter os processos ecológicos (Giller et al., 2004; Pascoal & Cássio, 2008).

Em 2019, Dudgeon (2019) descreveu como principais ameaças aos ecossistemas de água doce: a redução de caudal, a poluição, as alterações no uso do solo, as espécies invasoras, a sobre-exploração dos recursos e as alterações climáticas. Todos os rios e ribeiros estão sujeitos

à variabilidade natural espacial e temporal, que pode afetar a distribuição e a atividade dos organismos presentes nesses ecossistemas, mas podem também estar sujeitos a vários agentes de stress (Bruder et al., 2011; Lake, 2003; Ledger et al., 2013). Datry et al. (2017) adotaram o termo “rios intermitentes e ribeiros efêmeros” (IRES - Intermittent Rivers and Ephemeral Streams) como referência de todos cursos de água que cessam o fluxo e/ou secam completamente em algum ponto ao longo de seu curso. A modificação do caudal do rio pode ser originada de forma natural, devido as alterações na precipitação, ou de forma artificial, como por exemplo, a construção de barreiras físicas.

A poluição dos ecossistemas de água doce pode ter várias origens, pode ser derivada a fontes pontuais ou difusas (Burns et al., 2018; Lebreton et al., 2017). As fontes pontuais podem ser, por exemplo, descargas industriais e, também é incluída, a descarga de águas de arrefecimento de centrais elétricas (poluição térmica) (Burns et al., 2018; Lebreton et al., 2017). Existe um leque de fontes difusas que afetam estes ecossistemas, das quais podemos realçar os escoamentos de terrenos agrícolas, que poderão conter compostos orgânicos e/ou inorgânicos e agroquímicos, e as descargas de águas residuais provenientes das áreas urbanas (Burns et al., 2018; Lebreton et al., 2017). As consequências da poluição nos ecossistemas de água doce podem ter uma vasta extensão, como o caso da eutrofização, que pode ser observada por uma tonalidade esverdeada da água, devido ao crescimento exacerbado de algas, ou podem ser locais, em que uma determinada mistura de poluentes e/ou contaminantes afetam exclusivamente um único local. Estes efeitos da poluição nos ecossistemas de água doce vão aumentar num futuro próximo, devido ao aumento das descargas de águas residuais, consequência do aumento da urbanização (Wen et al., 2017), e da intensificação da agricultura e da pecuária para colmatar a crescente necessidade de alimento (Galloway & Cowling, 2002; Wen et al., 2017).

As mudanças no uso do solo resultam na fragmentação dos habitats de água doce (Mishra et al., 2021; Sage, 2020). Um dos grandes impactos dessas mudanças é a remoção parcial ou mesmo total da vegetação ribeirinha já existente (Dudgeon, 2019; Sage, 2020). A substituição de vegetação natural por plantas diferentes e com necessidades de água, também diferentes, promove um aumento do escoamento superficial e subterrâneo, e a alteração da qualidade e quantidade de matéria orgânica que entra no curso de água (Dudgeon, 2019). Uma outra forma de alteração do solo é a conversão do solo ribeirinho em um solo agrícola em que ocorre o

aumento do escoamento de agroquímicos e de nutrientes orgânicos e/ou inorgânicos para o curso de água existente nas proximidades (Foote et al., 2015; Sage, 2020).

As alterações climáticas representam também uma ameaça profunda à biodiversidade dos ecossistemas de água doce. Os impactos mais severos das alterações climáticas nestes ecossistemas surgem do aumento das temperaturas e das mudanças na frequência de precipitação, causando mudanças nos padrões de fluxo (Milly et al., 2008). Ou seja, tudo isso pode levar a um aumento da frequência de eventos extremos (Milly et al., 2008), como por exemplo, maior número de eventos de seca ou de inundações derivados das alterações no fluxo. Esses impactos são relativamente importantes nos ecossistemas de água doce porque os ciclos de vida de praticamente todas as espécies destes sistemas estão muitas vezes ligados à hidrologia. Em Portugal, prevê-se um aumento na frequência e/ou intensidade dos eventos de seca no futuro (IPCC, 2023). Os impactos das alterações climáticas globais nos ecossistemas de água doce já são bastante claros: 23 de 31 processos ecológicos analisados, como por exemplo a biomassa e produção primária e a qualidade e quantidade de habitat, em sistemas de água doce mostraram evidências de terem sido alterados (Scheffers et al., 2016). Estas ameaças aos ecossistemas de água doce estão relacionadas entre si. Por exemplo, uma maior captação de água pelos seres humanos e as alterações climáticas reduzirão a capacidade dos rios de diluir os poluentes (Wen et al., 2017).

1.2. Decomposição da matéria orgânica em ecossistemas fluviais

De acordo com a teoria do rio contínuo, os rios e ribeiros de baixa ordem rodeados de floresta são heterotróficos, pois a produção primária é geralmente muito baixa devido à sombra proveniente da floresta ribeirinha (Vannote et al., 1980). Portanto, a decomposição de detritos vegetais provenientes da vegetação ribeirinha é um processo vital nos ecossistemas ribeirinhos pois daí resulta uma importante fonte de carbono e energia para as teias alimentares destes ecossistemas (Fisher & Likens, 1973; Marks, 2019; Minshall, 1967; Webster & Benfield, 1986). A decomposição de matéria orgânica em ecossistemas de água doce, é um processo ecológico que depende da folhada da vegetação ribeirinha, do ambiente físico-químico e das comunidades decompositoras nomeadamente as comunidades microbianas e de invertebrados detritívoros (Gessner & Chauvet, 1994; Graça et al., 2001; Hieber & Gessner, 2002).

A decomposição da folhada é conduzida por uma combinação de processos abióticos (lixiviação de compostos solúveis, abrasão física) e bióticos (decomposição microbiana e por macroinvertebrados) (Gessner et al., 1999; Kaushik & Hynes, 1971; Marks, 2019). A lixiviação consiste na dissolução de compostos solúveis da folhada em água, sendo que a maior perda de massa foliar por este processo, normalmente, ocorre nas primeiras 48 horas após a imersão (Gomes, 2015; Taylor & Barlocher, 1996) e pode representar um terço da matéria orgânica dissolvida nos rios (Meyer et al., 1998). As comunidades microbianas, constituídas maioritariamente por fungos (em particular hifomicetos aquáticos) e bactérias, colonizam e decompõem a matéria orgânica, como a folhada, submersa nos ecossistemas de água doce e medeiam o fluxo da energia e o ciclo do carbono (Gulis & Suberkropp, 2003a). Os fungos aquáticos são considerados os principais intervenientes da decomposição pelas comunidades microbianas, uma vez que apresentam uma biomassa bastante superior à das bactérias (Findlay & Arsuffi, 1989; Gulis et al., 2019a; Hieber & Gessner, 2002). Estudos de campo (Baldy & Gessner, 1997; Baldy et al., 1995) e experiências de microcosmos no laboratório (Gulis & Suberkropp, 2003a, 2003b) observaram que os fungos aquáticos contribuem com cerca 88-99% da biomassa microbiana total durante a fase inicial da decomposição da folhada em rios e ribeiros (Baldy et al., 2007; Duarte et al., 2010; Findlay, 2010; Gulis et al., 2019a; Hieber & Gessner, 2002; Pascoal & Cássio, 2004; Pascoal et al., 2005; Suberkropp et al., 2010; Tant et al., 2013). Os fungos facilitam a penetração das bactérias no tecido foliar, pelo que as bactérias só tendem a aumentar a sua importância após o material foliar estar parcialmente decomposto, portanto numa fase mais avançada do processo de decomposição (Baldy et al., 1995; Weyers & Suberkropp, 1996).

Os hifomicetos aquáticos afetam de forma positiva vários níveis tróficos existentes nos sistemas de água doce (Suberkropp, 1998). Os hifomicetos aquáticos libertam uma vasta gama de enzimas hidrolíticas (por exemplo, celulasas, hemicelulasas, pectinases) que são capazes de degradar os polissacarídeos da parede celular das plantas (Chamier & Dixon, 1982a, 1982b; Suberkropp & Klug, 1980). Através da sua atividade enzimática, os hifomicetos aquáticos vão macerando a folhada libertando grandes quantidades de carbono orgânico (Meyer et al., 1998) de matéria orgânica particulada fina que é consumida pelos invertebrados coletores (Chamier & Dixon, 1982a, 1982b; Suberkropp, 1998; Suberkropp & Klug, 1980) e, também, são libertados nutrientes inorgânicos (Gessner et al., 1999; Suberkropp & Klug, 1980). Parte do carbono orgânico da folhada é convertido em biomassa microbiana que vai crescendo sobre as folhas

(Bärlocher & Kendrick, 1981; Gessner et al., 1999; Suberkropp, 1992), o que torna a folha uma fonte de alimento mais macia, mais nutritiva e mais palatável para os invertebrados trituradores (Bärlocher, 1985; Bärlocher & Kendrick, 1981; Gessner et al., 1999; Kaushik & Hynes, 1971; Suberkropp, 1992). Os nutrientes inorgânicos resultantes da sua atividade e libertados durante a decomposição de folhada (Gessner et al., 1999; Suberkropp & Klug, 1980), também são usados pelos organismos autotróficos para produção de matéria orgânica (Suberkropp, 1998).

Os invertebrados trituradores também fazem parte dos organismos-chave no processo de decomposição da folhada nos rios, sendo por vezes responsáveis por uma grande proporção da decomposição total da folhada submersa, podendo contribuir com 50-60% para a perda de massa total da folhada (Hieber & Gessner, 2002). Os invertebrados trituradores consomem diretamente as folhas produzindo, assim, elevadas quantidades de partículas finas de matéria orgânica finas como resultado da maceração da matéria vegetal e da sua defecação (Cummins & Klug, 1979; Graça, 2001). Esse tipo de partículas acaba por ser usada como fonte de alimento de outros invertebrados (Cummins & Klug, 1979), como já visto na decomposição feita pelas comunidades microbianas.

A fragmentação física é, também, uma componente importante na decomposição da folhada, mas, por vezes, pode ser difícil separar os efeitos da fragmentação física da folhada dos da fragmentação mediada pelos invertebrados trituradores (Rader et al., 1994). A fragmentação física depende da resistência da folhada (devido a concentrações elevadas dos polímeros estáveis, como a lignina e a celulose), da velocidade da corrente e das interações fluxo-substrato (Fonseca et al., 2013; Hoover et al., 2006). O fluxo afeta a fragmentação física da folha, de uma forma idêntica à lixiviação, ao “varrer” da superfície da folhada pequenas partículas, matéria orgânica particulada fina, que são transportadas pela corrente por estarem em suspensão (Ferreira, Graca, et al., 2006; Heard et al., 1999). A velocidade da corrente também afeta este tipo de fragmentação física da folhada: quanto mais rápida for maior a turbulência, o que leva a um aumento da abrasão física e a um aumento da fragmentação da matéria orgânica em partículas mais finas.

1.3. Decomposição de folhada e enriquecimento em nutrientes

O aumento rápido e exponencial da população humana (WWF, 2016), que assistimos atualmente, leva a que as atividades humanas se tornem o principal motor da mudança ambiental global (Rockström et al., 2009). Um dos impactos humanos mais difundido nos ecossistemas terrestres e aquáticos é o aumento da disponibilidade de nutrientes (Rockström et al., 2009), causado pelo aumento da agricultura e da urbanização (Azevedo et al., 2015; Smith et al., 1999). A intensificação da agricultura com a utilização intensiva de fertilizantes para o rápido crescimento e obtenção de alimentos, de forma a colmatar as necessidades alimentares da crescente população humana (Galloway & Cowling, 2002; WWF, 2016, 2018), leva a que ocorra um maior escoamento de agroquímicos para os cursos de água. Existe também evidência de que a deposição de azoto atmosférico, proveniente da combustão de combustíveis fósseis, contribui significativamente para o enriquecimento dos ecossistemas com nutrientes (Holland et al., 2005; Liu et al., 2013; Meunier et al., 2016; Zhang et al., 2012).

Os ribeiros podem originalmente, ou por alteração humana, diferir em várias condições ambientais ou na disponibilidade de alguns recursos, que influenciam a estrutura e atividade das comunidades de microrganismos (Duarte et al., 2015; Duarte et al., 2009; Pascoal & Cássio, 2004; Pascoal et al., 2005; Piggott, Niyogi, et al., 2015; Widder et al., 2014). Contudo, a eutrofização causada por distúrbios antropogénicos pode alterar a abundância relativa de espécies, afetando a estrutura da comunidade e/ou o funcionamento do ecossistema (Maltby, 1992; Webster & Benfield, 1986). Essas alterações podem ocorrer diretamente, pelo aumento das concentrações de nutrientes (como azoto e fósforo) inorgânicos, ou indiretamente, pela depleção de oxigénio dissolvido (Gulis & Suberkropp, 2003c; Pascoal & Cássio, 2004).

As comunidades microbianas são os principais impulsionadores dos ciclos biogeoquímicos dos rios e ribeiros de baixa ordem, desempenhando, assim, um papel crucial nos processos do ecossistema, como a decomposição da matéria orgânica e a reciclagem de nutrientes (Bruder et al., 2016; Kuehn, 2016; Manning et al., 2018). O aumento da disponibilidade em nutrientes (azoto e/ou fósforo) nos ribeiros tem vindo ser considerado um importante regulador da decomposição de folhada, pois resulta no aumento das taxas de decomposição (Elwood et al., 1981; Gulis & Suberkropp, 2003a; Meyer & Johnson, 1983; Pascoal et al., 2003) conduzidas pelas comunidades microbianas, que acabam por ser estimuladas por esse aumento nutricional

(Benfield et al., 2001; Gulis & Suberkropp, 2003a; Meyer & Johnson, 1983; Pascoal et al., 2001). A esporulação e a biomassa produzida pelos fungos associados às folhas em decomposição foram estimuladas pelo aumento da concentração de nutrientes, tanto em rios como em microcosmos (Sridhar & Bärlocher, 2000; Suberkropp, 1998). No entanto, alguns estudos não observaram quaisquer efeitos do enriquecimento em nutrientes no processo de decomposição da folhada (Abelho & Graça, 2006; Baldy et al., 2007; Chadwick & Huryn, 2003), ou observaram efeitos negativos quando as concentrações dos mesmos são muito elevadas (Pascoal & Cássio, 2004; Pereira et al., 2016; Woodward et al., 2012). A atividade decompositora pode, no entanto, ser ainda elevada em condições eutróficas (Arroita et al., 2019). O aumento dos nutrientes pode aliviar a limitação por recursos, quando a concentração de nutrientes é baixa, mas pode exercer efeito inibidor da atividade decompositora quando a concentração de nutrientes é muito elevada.

Num estudo de síntese foram encontradas respostas das taxas de decomposição ao enriquecimento de nutrientes nos ribeiros, sendo estas estimuladas em cerca de 50% (Ferreira, Castagnyrol, et al., 2015). Numa meta-análise centrada nas taxas de decomposição causadas pelas comunidades microbianas, a eutrofização não afetou a taxa de decomposição microbiana, a produção máxima de esporos e de biomassa de fungos de uma forma clara, dado que tanto efeitos positivos como negativos têm sido reportados na literatura (Lecerf & Chauvet, 2008). No entanto, a riqueza de espécies de fungos está consistentemente reduzida em rios eutrofizados (Lecerf & Chauvet, 2008).

Os invertebrados decompositores, em geral, diminuem a sua diversidade, mas aumentam a sua abundância em resposta ao enriquecimento de nutrientes (Beaumelle et al., 2020). Enquanto as comunidades microbianas decompositoras apresentam magnitudes mais baixas de efeitos do enriquecimento de nutrientes na sua diversidade e abundância, comparativamente aos invertebrados (Beaumelle et al., 2020). Assim sendo, o enriquecimento de nutrientes provoca uma variedade de efeitos na decomposição, que variam de efeitos positivos a efeitos negativos, que dependem do grupo taxonómico que estamos a analisar e da intensidade desse enriquecimento (Beaumelle et al., 2020).

1.4. Decomposição de folhada e seca

Os regimes hidrológicos dos ribeiros e rios estão a mudar em todo o mundo, principalmente nas regiões temperadas em que é previsto a intensificação das secas devido às alterações climáticas (por exemplo, o aumento da temperatura do ar, a redução da precipitação) (Beniston et al., 2007) e pelo aumento rápido da procura de água doce para os mais diversos usos humanos (por exemplo, irrigação, água potável) (Andersen et al., 2006; Meyer et al., 1999). Tendo em conta todos cenários de alterações climáticas para a Europa do Instituto Meteorológico e Hidrológico da Suécia (SMHI) com projeções até 2080, prevê-se um aumento acentuado de mudanças de um regime hidrológico perene para regime hidrológico intermitente em muitos cursos de água das bacias hidrográficas na região do Mediterrâneo (RCP 8.5) (Acuña et al., 2014).

O crescimento e desenvolvimento das comunidades microbianas nos ecossistemas de água doce são bastante sensíveis a mudanças das condições ambientais. Embora as condições físico-químicas também variem sazonalmente nos IRES, nestes as flutuações são mais extremas e imprevisíveis comparativamente aos sistemas perenes (Gasith & Resh, 1999; von Schiller et al., 2017). No entanto, as variações hidrológicas tanto podem proporcionar condições benéficas para o crescimento e desenvolvimento comunidades microbianas decompositoras, como podem levar a condições físico-químicas extremas em que se torna impossível desenvolver ou até mesmo sobreviver.

Nos ribeiros, a seca resulta numa diminuição do caudal, reduzindo assim a disponibilidade e as conexões longitudinais de habitat (Larned et al., 2010). Este processo de contração do caudal depende dos regimes hidrológicos (Humphries & Baldwin, 2003) das bacias hidrológicas a que estes ribeiros pertencem. Com a perda gradual de água superficial vão se formando poças. Nessas poças ocorrem a diminuição de oxigénio dissolvido e o aumento da temperatura e da condutividade, que afetam coletivamente as características da matéria orgânica dissolvida e levam a mudanças na estrutura e função das comunidades microbianas. No entanto, a diminuição do oxigénio dissolvido e do pH podem ser resultado da respiração estimulada pelas altas temperaturas em poças com grande acumulação de matéria orgânica particulada. O rehumedecimento e a retomada do fluxo de água levam a mudanças drásticas nas condições ambientais, as quais podem afetar as comunidades microbianas de forma negativa (por

exemplo, aumento da abrasão física) ou de forma positiva (por exemplo, aumento da matéria orgânica dissolvida disponível).

Nos IRES, as comunidades fúngicas estão potencialmente expostas a variações sazonais extremas, principalmente associadas à fase de seca do rio. As comunidades fúngicas associadas à folhada são fortemente afetadas pela dessecação, durante a fase de seca (Bruder et al., 2011). Antes das comunidades fúngicas associadas à folhada serem expostas a fase de seca total, estas são frequentemente expostas a um aumento da temperatura nas poças, que vão ficando cada vez menores, o que por um lado pode estimular o desenvolvimento dos fungos e por outro favorecer as espécies fúngicas mais adaptadas as essas condições (Canhoto et al., 2016). No entanto, durante a fase de seca, ocorre uma desaceleração das atividades das comunidades microbianas (como a produção de biomassa fúngica, a taxa de esporulação e a respiração microbiana) e a inibição da decomposição da folhada por essas comunidades (Mora-Gómez et al., 2015; Schlieff & Mutz, 2007). Nas poças, a atividade microbiana é inibida pelo baixo teor de oxigênio e pela acumulação de compostos fenólicos da lixiviação da folhada (Medeiros et al., 2009; Schlieff & Mutz, 2007). Mora-Gómez et al. (2016) observaram que as condições de seca num IRES durante o verão inibiram as atividades enzimáticas e modificaram a estrutura da comunidade fúngica, sugerindo uma ligação entre a estrutura e a função destes decompositores fúngicos. No entanto, a maioria das espécies de hifomicetos aquáticos exibem uma ampla gama de capacidades enzimáticas e, portanto, há redundância entre espécies em comunidades fúngicas associadas à folhada. Numa experiência de microcosmo, Gonçalves et al. (2016) constataram que uma maior riqueza fúngica estava relacionada com uma decomposição de folhada mais elevada, e essa relação foi mantida após a fase de seca.

Com o re-humedecimento, as funções das comunidades microbianas são rapidamente retomadas. Com o aumento da disponibilidade de matéria orgânica dissolvida na água, proporcionada pelo re-humedecimento, as atividades enzimáticas recuperam rapidamente (Pohlon et al., 2013; Zoppini & Marxsen, 2010) e o ocorre o potenciamento do uso de polissacarídeos (Romani et al., 2006; Ylla et al., 2010).

Contudo os fungos podem ter desenvolvido estratégias para proteger os seus micélios e propágulos da dessecação completa, por exemplo, criação de refúgios húmidos. Os locais mais importantes que oferecem refúgio às comunidades microbianas são a zona hiporreica e os aglomerados de folhada (Febria et al., 2012; Ylla et al., 2010), pois ambos os locais retêm água.

A zona hiporreica é um refúgio para os esporos dos hifomicetos aquáticos quando ocorre o cessamento de água superficial, no entanto, as condições não são as ideais para o desenvolvimento dos fungos, pelo que nesses locais a diversidade e biomassa de fungos tende a ser mais baixa comparativamente com os refúgios bentónicos provavelmente devido ao facto do oxigénio ser um fator limitante (Bärlocher et al., 2006; Cornut et al., 2010; Sudheep & Sridhar, 2012). Este tipo de refúgio acaba por criar diferenças nas comunidades fúngicas, uma vez que espécies com esporos filiformes são capazes de se dispersar em águas intersticiais (por exemplo, *A. filiformis*), enquanto as espécies com esporos compactos (por exemplo, *C. longibrachiata*) ou ramificados ou tetrarradiados (por exemplo, *T. elegans*) não o conseguem fazer (Cornut et al., 2014). A baixa diversidade e biomassa de fungos nesses refúgios coincidem com a diminuição das taxas de decomposição da folhada nesses locais, como consequência da diminuição das concentrações de oxigénio dissolvido, embora alguns hifomicetos aquáticos apresentem adaptações a esse tipo de stress (Field & Webster, 1983; Medeiros et al., 2009).

Os aglomerados de folhas também servem como refúgio para as comunidades microbianas, especialmente para os fungos aquáticos. Os micélios incorporados na matriz foliar do interior desses aglomerados expostos ao ar durante o leito seco do rio, podem sobreviver durante mais tempo devido à capacidade desses aglomerados de folhas reterem água. Maamri et al. (2001; 1998) relataram que fungos aquáticos associados a folhas em IRES mediterrânicos podem sobreviver a ciclos de secagem e re-humedecimento, com fases de secagem durando vários meses. Além disso, as películas de água nas superfícies das folhas podem transportar esporos, contribuindo para a disseminação de fungos pelas mesmas (Chauvet et al., 2016).

A comparação da constituição das comunidades fúngicas existentes nos IRES com as comunidades dos rios perenes raramente foi feita, embora seja esperado que as comunidades dos IRES tenham desenvolvido características de adaptação a essas condições ambientais. Maamri *et al.* (2001) encontraram uma maior riqueza em espécies de fungos (com base na análise da morfologia dos esporos produzidos) num ribeiro perene do que num IRES, em Marrocos. No entanto, houve espécies de fungos que dominaram a esporulação de forma semelhante em ambos os sistemas. Por outro lado, Foulquier *et al.* (2015) não encontraram diferenças na composição da comunidade fúngica e na resposta à frequência de emersão entre uma secção intermitente e uma secção perene num rio francês, utilizando técnicas moleculares. No caso desse estudo, o seu resultado pode ter sido afetado pelo facto da sua avaliação ser em

dois trechos próximos no mesmo IRES, em que pode ter havido conectividade durante uma fase chuvosa.

Em ribeiros de zonas temperadas, as comunidades biológicas existentes não estão evolutivamente adaptadas à seca, o que pode levar a que a integridade ecológica destes ribeiros fique ameaçada (Dieter et al., 2013; Schliep & Mutz, 2011). A complexa dinâmica hidrológica, típica de ribeiros intermitentes, estrutura as comunidades biológicas e os processos dos ecossistemas ribeirinhos (Abril et al., 2016; Datry et al., 2011; Ylla et al., 2010). Contudo, ainda pouco se sabe sobre as respostas biológicas que ocorrem quando um ribeiro permanente se torna intermitente devido ao aumento da escassez de água.

1.5. Múltiplos agentes de stress e decomposição de folhada: enriquecimento em nutrientes e seca

Os ecossistemas de água doce estão expostos a vários tipos de pressões antropogénicas (Birk et al., 2020; Reid et al., 2019) e a mudanças nos agentes de stress naturais (Canedo-Arguelles et al., 2014; Doll & Mueller Schmied, 2012). Um dos maiores desafios no estudo dos efeitos de um agente de stress é que o termo stress é um meta-conceito bastante difícil de definir de uma forma genérica porque um conjunto de condições que é prejudicial para uma espécie pode ser benéfico para uma outra (Loreau, 2010). Assim sendo, as mudanças climáticas podem afetar de forma direta um ecossistema, uma vez que o fator de stress inevitavelmente leva a uma correlação entre as competências funcionais e as competências competitivas, fazendo com que espécies mais tolerantes substituam espécies mais sensíveis à medida que a intensidade do stress aumenta (Baert et al., 2016). Um ecossistema entrará em colapso quando um fator de stress é suficientemente alto para inibir o crescimento de todas as espécies (Baert et al., 2018).

Os efeitos de múltiplos agentes de stress podem variar desde a dominância individual do agente de stress até a situações mais complexas em que dois ou mais agentes de stress têm de ser considerados simultaneamente (Cote et al., 2016; Crain et al., 2008; Feld et al., 2016; Piggott, Townsend, et al., 2015). Em casos em que o efeito combinado de dois ou mais agentes de stress é igual à soma dos efeitos individuais, temos um efeito aditivo (ou não interativo). Mas, podem existir efeitos combinados de interação que podem ser de antagonismo, quando o efeito

é menor do que o esperado a partir da análise dos efeitos individuais, ou de sinergismo, quando o efeito combinado é superior ao esperado a partir dos efeitos individuais. Pelo que, analisar os efeitos de cada agente de stress de forma individual pode não ser realista (Kath et al., 2018). Na última década tem havido um aumento no interesse em se explorar os efeitos conjuntos de alguns agentes de stress nos ecossistemas de água doce (Cote et al., 2016; Noges et al., 2016). Por exemplo, Birk et al. (2020) sugerem, com base num estudo pan-europeu, que o excesso de nutrientes exerce um efeito dominante nos lagos, anulando o efeito de um segundo agente de stress.

Durante a fase de contração hidrológica dos IRES, as fontes de nutrientes e de matéria orgânica ganham bastante relevância em relação às fontes terrestres, sendo que esta fase hidrológica exerce uma elevada influência na dinâmica de nutrientes e de matéria orgânica (Bernal et al., 2013). Durante a fase de contração hidrológica, ocorrem alterações nas concentrações de nutrientes das águas superficiais (von Schiller et al., 2017). As concentrações de alguns nutrientes presentes nas águas superficiais, que resultam da fase de contração hidrológica, podem diminuir ou aumentar, enquanto outros nutrientes podem não apresentar alterações significativas (von Schiller et al., 2017). No caso do azoto pode haver a diminuição concentração de nitratos derivada do aumento da desnitrificação, enquanto as outras formas, como por exemplo, a amónia e o azoto orgânico dissolvido, tendem a permanecer estáveis (Dahm et al., 1998; Stanley & Boulton, 1995; von Schiller et al., 2011). No entanto, para o fósforo temos resultados muito contraditórios dado que em alguns estudos foi observada a diminuição da concentração de fósforo dissolvido ao longo do tempo (Finn et al., 2009), enquanto noutros foram observados aumentos (von Schiller et al., 2011) durante a fase de contração hidrológica.

Como consequência de uma contração hidrológica severa, ocorre uma fase hidrológica denominada de “fragmentação” que consiste no aparecimento de poças de água derivadas da descontinuidade hidrológica. Nessas poças isoladas, acontece uma panóplia de eventos, entre elas, a criação de ambientes anaeróbicos e tóxicos. Esses ambientes são o resultado da acumulação de matéria orgânica, do aumento da respiração e dos seus subprodutos, do aumento da evaporação da água e a inexistente renovação de água (que proporcionam a acumulação/concentração dos nutrientes dissolvidos na água e resultados das atividades dos microrganismos que estão presentes) (Acuña et al., 2005; Boulton & Lake, 1990; Lillebo et al., 2007; von Schiller et al., 2011). Como os processos anaeróbicos são dominantes ocorrem,

como resultado dos mesmos, mudanças substanciais nas concentrações, bem como nas formas dos nutrientes e da matéria orgânica dissolvida (von Schiller et al., 2017).

Existe já um grande conjunto de estudos que nos mostra que o enriquecimento em nutrientes ou a exposição a situações de seca afeta o processo de decomposição de folhada nos ribeiros e as comunidades de fungos aquáticos associadas (Gonçalves et al., 2016; Gulis & Suberkropp, 2003a; Medeiros et al., 2009; Mora-Gómez et al., 2015; Pascoal et al., 2001; Suberkropp, 1998). De modo geral, o enriquecimento em nutrientes proporciona a estimulação das atividades das comunidades microbianas (Gulis & Suberkropp, 2003a; Pascoal et al., 2001; Suberkropp, 1998) e a seca leva à inibição dessas atividades (Gonçalves et al., 2016; Medeiros et al., 2009; Mora-Gómez et al., 2015). No entanto, ainda não é muito claro o efeito combinado de ambos os agentes de stress nas comunidades microbianas.

Duarte et al. (2017) avaliaram os efeitos da emersão na decomposição de folhas de choupo preto e nas comunidades microbianas associadas, em dois ribeiros com características distintas, incluindo o nível de nutrientes. A emersão das folhas inibiu o desempenho das comunidades microbianas e retardou a decomposição das folhas, tendo sido encontrados esses efeitos negativos em ambos os ribeiros (Duarte et al., 2017). A taxa de decomposição das folhas e as atividades das comunidades microbianas (por exemplo, a produção de biomassa fúngica) foram mais reduzidas no ribeiro mais eutrófico, ou seja, com maior concentração de nutrientes (Duarte et al., 2017). A resposta das comunidades fúngicas à emersão foi diferentes em ambos os ribeiros: a produção de biomassa fúngica e a produção de enzimas extracelulares sofreram maior inibição no ribeiro mais oligotrófico, enquanto a produção de conídios foi mais sensível a esse agente de stress no ribeiro eutrófico (Duarte et al., 2017). Portanto, as comunidades decompositoras apresentam diferentes respostas quando expostas a múltiplos agentes de stress, podendo prosperar sob um excesso de nutrientes mostrando-se mais tolerantes à emersão, devido a potenciais compromissos entre as capacidades competitivas e a resistência a esse agente de stress (Duarte et al., 2017). As elevadas concentrações de nutrientes dissolvidos permitiram que as comunidades microbianas respondessem mais rapidamente e fossem menos sensíveis ao aumento da procura energética durante o stress proporcionado pela seca (Duarte et al., 2017).

Em suma, sabe-se que até um certo nível os nutrientes estimulam a atividade das comunidades microbianas e que a seca geralmente as inibe. Contudo, a informação sobre como as

comunidades microbianas reagem quando expostas a situações de seca e de aumento dos nutrientes em simultâneo ainda é bastante escassa, pelo que é necessário estudar os seus potenciais impactos nas comunidades de fungos aquáticos e na sua atividade.

1.6. Objetivo do trabalho

Neste estudo, pretendemos avaliar a resposta das comunidades de fungos aquáticos à seca e a um gradiente de nutrientes e as consequências para o funcionamento dos ecossistemas de água doce. Iremos utilizar a decomposição de matéria orgânica em ribeiros como um sistema modelo para este estudo, avaliando o impacto dos agentes de stress acima descritos (isoladamente ou em conjunto) na taxa de decomposição de folhada, na produção de biomassa de fungos, na taxa de reprodução e na diversidade de fungos aquáticos. Para isso, utilizámos comunidades microbianas naturais, obtidas através da imersão de folhas de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) durante 10 dias num rio de referência. Estas comunidades foram subsequentemente expostas, em laboratório, a condições manipuladas de enriquecimento de nutrientes e de emersão durante 21 dias.

Colocamos as hipóteses de que (i) a atividade e a diversidade da comunidade de fungos irá aumentar com o aumento da concentração dos nutrientes e ser reduzida quando exposta a um período de seca; e (ii) os efeitos dos agentes de stress serão equivalentes na atividade (decomposição, biomassa e reprodução) e na diversidade dos fungos aquáticos.

2. Métodos

2.1. Desenho experimental

Para testar o efeito da concentração de nutrientes e da seca nas comunidades microbianas decompositoras da folhada, utilizámos comunidades naturais obtidas por imersão de folhada de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) durante 10 dias num rio de referência. Estas comunidades foram subsequentemente expostas, em microcosmos, a tratamentos de nutrientes e de seca.

2.2. Local de amostragem para a colonização microbiana

O local de amostragem situa-se no rio Agra (latitude: 41° 36' 10.95" N, longitude: 8° 2' 54.70" W e elevação 646 m), um curso de água situado perto da nascente do rio Ave. A vegetação ribeirinha que circunda o local de amostragem é constituída por amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), carvalho-alvarinho (*Quercus robur* L.), sobreiro (*Quercus suber* L.), castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), choupo-negro (*Populus nigra* L.), pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton), abeto-de-Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) e por uma zona arbustiva de hera (*Hedera helix* L.), silvas (*Rubus* sp.), samambaia (*Struthiopteris castanea* (Makino & Nemoto) Nakai) e arbustos (urze-branca (*Erica arborea* L.)), sendo encontradas algumas espécies exóticas, tais como, acácia (*Acacia dealbata* Link) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.). O substrato do rio é constituído por areia, blocos e seixos.

A temperatura, a condutividade, o pH e a concentração de oxigénio dissolvido na corrente foram medidas *in situ* (Multi 3320 SET 1, WTW) a 7 e 17 de Dezembro de 2021. Amostras de água foram recolhidas e mantidas a 4 °C até chegarem ao laboratório, onde foram filtradas (Glass Microfiber Filters, GF-C diâmetro 25 mm, Whatman) e congeladas a - 20 °C. As águas recolhidas foram usadas para a quantificação de nitratos (HACH kit, programa 351, método “redução de cádmio”), nitritos (HACH kit, programa 371, método “USEPA de diazotização”), amónia (HACH kit, programa 385, método “salicilato”) e fosfato (HACH kit, programa 490, método “USEPA ácido ascórbico”), usando o HACH DR 1900 (HACH, Loveland, CO, USA). Os dados das análises físico-químicas do rio indicaram um pH levemente ácido (5,8), uma baixa condutividade (16,2 $\mu\text{S cm}^{-1}$), uma alta concentração de oxigénio dissolvido (10,7 mg L^{-1}) e uma baixa concentração de nutrientes inorgânicos (0,045 mg L^{-1} N - NO_3^- ; 0,007 mg L^{-1} N - NO_2^- ; < 0,01 mg L^{-1} N - NH_3 e < 0,01 mg L^{-1} P - PO_4^{3-}) e uma baixa temperatura (10 °C).

Folhas de amieiro (*Alnus glutinosa*) secas ao ar, recolhidas em Outubro de 2021 de árvores individuais, foram imersas em água desionizada por 1 h e cortadas em discos de 12 mm. Conjuntos de 198 discos de folhas foram colocados em sacos de malha fina (16 x 20 cm, poro de 0,5 mm, para prevenir a entrada de invertebrados; 1 saco = 3 réplicas), num total de 30 sacos. Os sacos com os discos de folhas foram imersos por 10 dias no local de estudo para permitir a colonização microbiana (Figura 1).

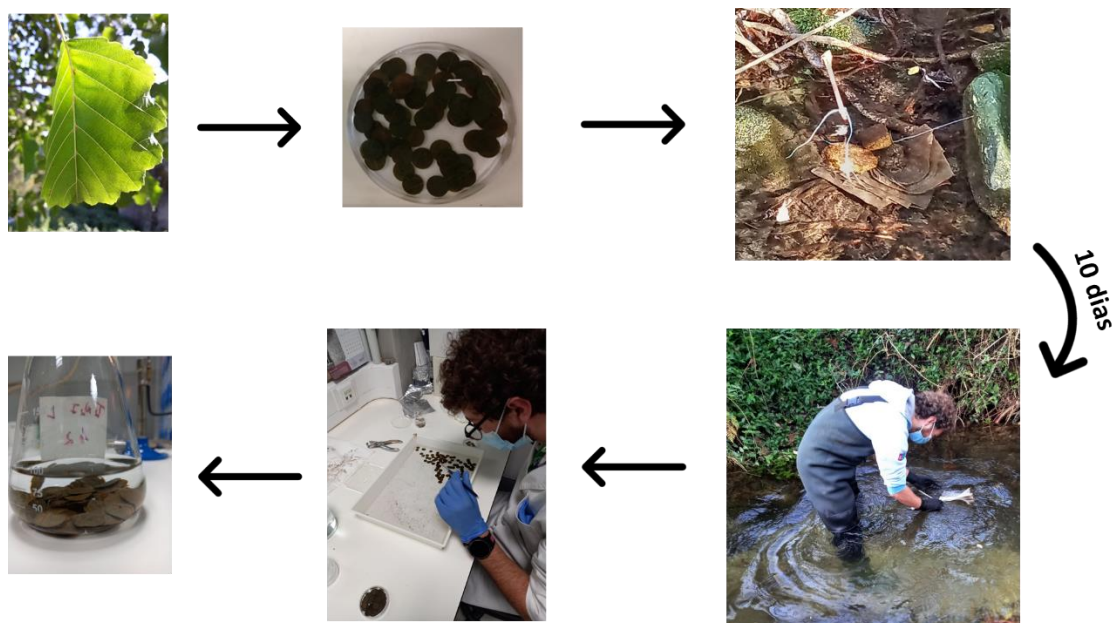


Figura 1. Esquema da metodologia utilizada para a colonização de discos de folhas de amieiro por comunidades microbianas no rio Agra, e na preparação dos microcosmos para avaliar os efeitos concomitantes da concentração de nutrientes e da emersão na decomposição de folhas de amieiro e nas comunidades microbianas associadas.

2.3. Microcosmos

Cinco soluções de nutrientes foram preparadas (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻). As concentrações mais baixas (N1 e N2) foram preparadas através da diluição de água do Fastio (0,403 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,026 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; rácio N:P = 15,5) em água desionizada. As outras três concentrações (N3 - N5) foram preparadas através da adição de soluções padrão de azoto (KNO₃; 500 mg L⁻¹ N - NO₃⁻) e fósforo (NaH₂PO₄.H₂O; 30 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) à água do Fastio. Todas as soluções depois de preparadas foram autoclavadas a 121 °C durante 37 minutos.

Ao fim dos 10 dias de colonização, os sacos foram recolhidos e transportados para o laboratório. No laboratório, os discos de folhas foram lavados em água desionizada para a remoção de areias, entre outros, com o uso de um pincel. Conjuntos de 66 discos foliares foram distribuídos por balões de Erlenmeyer de 150 ml com 75 ml de cada solução de nutrientes, num total de 30 microcosmos (Figura 1). Os microcosmos, 6 réplicas por tratamento, foram incubados num agitador orbital (INFORS HT Orbiton) a 120 rpm e a uma temperatura de 14 °C.

Os 2 dias iniciais da experiência serviram como aclimação das comunidades microbianas às condições laboratoriais. De seguida, foi induzida seca em metade dos microcosmos por 14 dias (tratamento intermitente - I). A outra metade dos microcosmos foi mantida com água durante toda a duração da experiência (tratamento permanente - P). Após os 14 dias de seca, os microcosmos foram re-imersos, por 7 dias (Figura 2). As soluções dos microcosmos de todos os tratamentos foram trocadas a cada 7 dias até ao final da experiência. Estas soluções foram usadas para avaliar a produção de conídios por parte dos fungos aquáticos (Secção 2.5). As soluções recolhidas foram fixadas usando 250 µl formaldeído a 37% e 150 µl de Tween 80 a 10% (para garantir uma distribuição uniforme dos conídios) e guardadas a 4 °C.

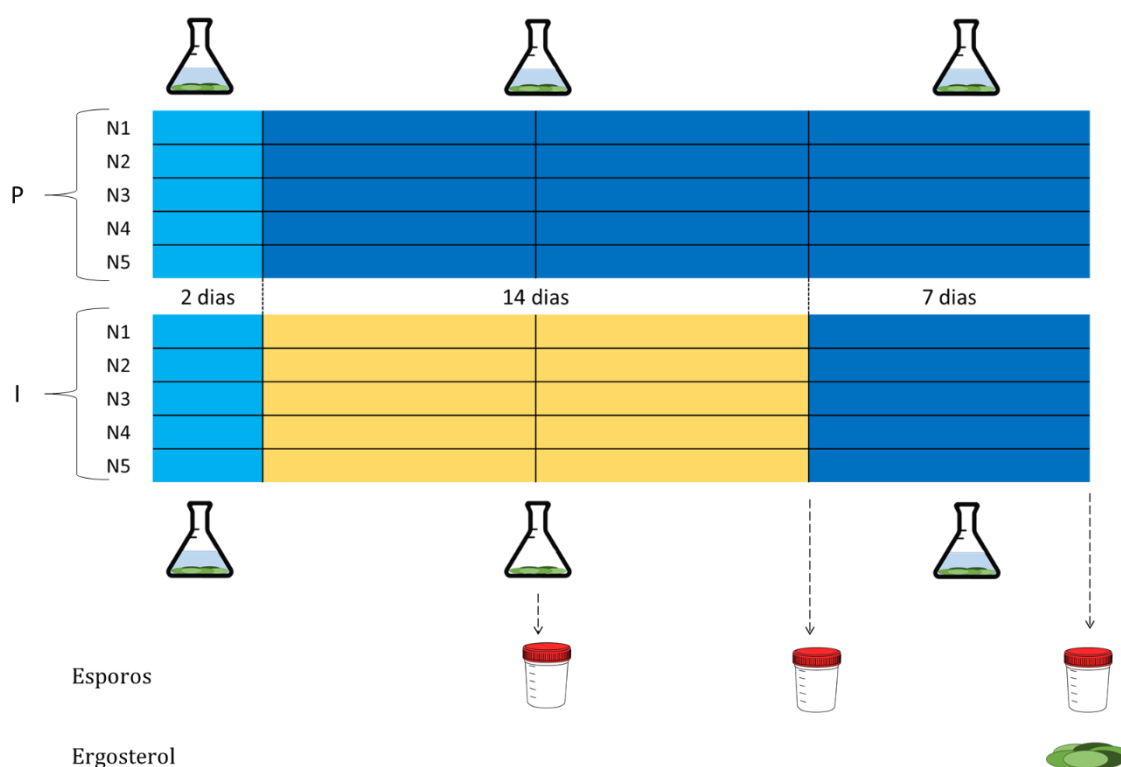


Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental utilizado no estudo para avaliar os efeitos concomitantes da concentração de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e da emersão na decomposição das folhas de amieiro e nas comunidades microbianas associadas. Em laboratório, os microcosmos foram aclimatados durante 2 dias. Após este período, um conjunto foi mantido com água durante 21 dias (tratamento permanente - P) e outro conjunto foi submetido a emersão durante 14 dias (tratamento intermitente - I), seguindo-se um período de reimersão de 7 dias. Foram recolhidas amostras para avaliação de esporos de fungos aquáticos e quantificação de ergosterol.

No final da experiência, os discos foliares foram separados de acordo com os parâmetros a

avaliar posteriormente (decomposição foliar - 60 discos e de biomassa fúngica - 6 discos). Os discos foliares foram embalados em folhas de alumínio e armazenados a -20 °C. Esses discos foram, posteriormente, liofilizados e pesados (Balança Sartorius - Quintix 224-1S, d = 0,0001 g).

2.4. Biomassa fúngica

A biomassa fúngica associada às folhas em decomposição foi estimada através da concentração de ergosterol (Gessner, 2020). Foi adicionada uma base forte (KOH/metanol: 8 g L⁻¹) a conjuntos de 6 discos foliares de cada amostra. Por cada série de amostras, foi adicionado um conjunto de 6 discos foliares, que não continham ergosterol, sendo enriquecidos com uma solução stock de ergosterol em KOH/metanol (concentração da solução: 200 mg L⁻¹), como controle da extração. Os conjuntos de discos foliares foram aquecidos a 80 °C durante 30 minutos, para que ocorresse a saponificação dos lípidos, ou seja, para que ocorra uma hidrólise básica de lípidos presentes nas folhas e consequentemente a sua extração. Após esse tempo foram arrefecidos com gelo, num local com pouca iluminação para evitar a degradação do ergosterol. O ergosterol foi eluído do cartucho através da adição de isopropanol. A solução resultante foi recolhida em frascos de vidro com rosca para cromatografia, previamente numerados e pesados. Para cada série de amostras, foram analisadas cinco concentrações-padrão de ergosterol, obtidas da diluição da solução stock de ergosterol em isopropanol (concentração da solução stock: 200 mg L⁻¹), para se obter uma curva padrão. O ergosterol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a uma absorbância de 282 nm, com um tempo de retenção deste composto de cerca de 7 minutos e um fluxo de 0,8 ml min⁻¹, usando uma coluna Acclaim™ 120 C18 3x150MM Thermo Scientific.

2.5. Taxa de reprodução e identificação dos fungos aquáticos

As soluções guardadas de cada microcosmos foram usadas para quantificar a produção de conídios e identificar as espécies presentes em cada microcosmo. Volumes apropriados de suspensão de conídios foram filtrados utilizando um filtro de membrana (poro de 0,45 µm, Millipore). Os conídios retidos nos filtros foram corados com azul de algodão 0,1% em ácido láctico, e examinados ao microscópio para identificar as espécies de fungos e quantificar os conídios libertados. Como forma de padronizar o número de conídios por amostra, foram

contados 6 quadrados aleatórios do filtro (54 mm²), e um mínimo de 300 conídios por amostra. A taxa de reprodução foi expressa em número de conídios produzidos por mg de folha seca por dia. A contribuição de cada espécie de fungo para a produção total de conídios foi expressa em percentagem.

2.6. Perda de massa foliar

No final da experiência os discos foliares restantes em cada microcosmos foram congelados (-20 °C) e posteriormente liofilizados até uma massa constante para ser determinada a massa de folha remanescente. Os discos de folha foram pesados (Balança Sartorius - Quintix 224-1S, d = 0,0001 g) e a perda de massa foliar calculada através da subtração do peso final ao peso inicial. A perda de massa foliar foi expressa como a percentagem da massa foliar inicial.

2.7. Análise estatística

De forma a visualizarmos de que forma a decomposição da folhada, a biomassa produzida pelos fungos associados à folhada, a taxa de esporos produzidos pelos fungos e a biodiversidade de hifomicetos aquáticos responderam aos diferentes níveis de nutrientes e ao tipo de hidrologia, foi criado um diagrama de caixas (função “ggboxplot”, pacotes R “ggpubr” e “ggplot2”, versões 0.6.0 e 3.4.2, respetivamente; (Kassambara, 2023; Wickham, 2016)).

A normalidade na distribuição dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk; pacote R “stats”, versão 4.2.2; (R. C. Team, 2022)) e a homogeneidade de variâncias (teste de Levene; pacote R “car”, versão 3.1-2; (Fox & Weisberg, 2019)) foram testadas. Os dados da biomassa fúngica não passaram no teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,05$), pelo foi feita a transformação desses dados através do inverso da sua raiz quadrada. Embora com a transformação os dados não tenham passado no teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $P = 0,01448$), segundo a função “boxcox” do pacote R “MASS” (versão 7.3-60; (Venables & Ripley, 2002)) esta foi a transformação que mais aproximou esses dados de uma distribuição normal. Os dados da taxa de esporulação dos fungos não passou no teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,05$), pelo que se procedeu à sua transformação logarítmica (função “log”;

package “base”, versão 4.2.2; (Team, 2022)).

O efeito, isolado ou conjunto, dos nutrientes e da seca na taxa de decomposição da folhada, na biomassa de fungos, na taxa de esporulação e na biodiversidade de hifomicetos aquáticos (riqueza, índices de Shannon e de equabilidade de Pielou) foi avaliado por ANOVAs de duas vias, seguidas pelo teste de Tukey (pacote R “stats”, versão 4.2.2; (Team, 2022)), usamos a função “cld_glt” do pacote R “multcomp” (versão 1.4-25; (Hothorn et al., 2008)) para realçar as diferenças obtidas pelo teste de Tukey. Estas análises foram realizadas através do software de análise estatística RStudio (team, 2023) do software estatístico R (Team, 2022).

A biodiversidade de fungos aquáticos foi observada inicialmente através do gráfico com as contribuições percentuais de cada taxon de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídios obtido através do software de folha de cálculo do Microsoft Excel do sistema operativo Microsoft Office 365 do Microsoft Windows. Realizou-se uma análise de variância multivariada permutações (PERMANOVA) para avaliar o efeito da exposição a seca e nutrientes nas comunidades de fungos aquáticos. Os dados foram previamente transformados usando a raiz quadrada das taxas de esporulação das espécies de hifomicetos aquáticos e de seguida foi construída uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. Foi feita ainda uma análise de coordenadas principais (PCoA), a partir da mesma matriz de dissimilaridade, para explorar e visualizar o nível de similaridade entre os tratamentos. Estas análises foram feitas usando o software de análise estatística PRIMER 6 e PERMANOVA+ (Primer-E, UK).

3. Resultados

3.1. Decomposição da folhada

A decomposição da folhada não foi significativamente afetada pelo tipo de hidrologia, pelo gradiente de concentração de nutrientes, nem pela interação destes dois fatores (two-way ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 1). De um modo geral, a perda de massa foliar variou entre os 39 e 53% no tratamento permanente, e entre os 32 e 48% no tratamento intermitente (Figura 3). A perda de massa foliar foi, na maioria, maior no tratamento permanente quando comparado com o tratamento intermitente, no entanto esta diferença não foi significativa (two-way ANOVA, $P = 0,073$; Tabela 1).

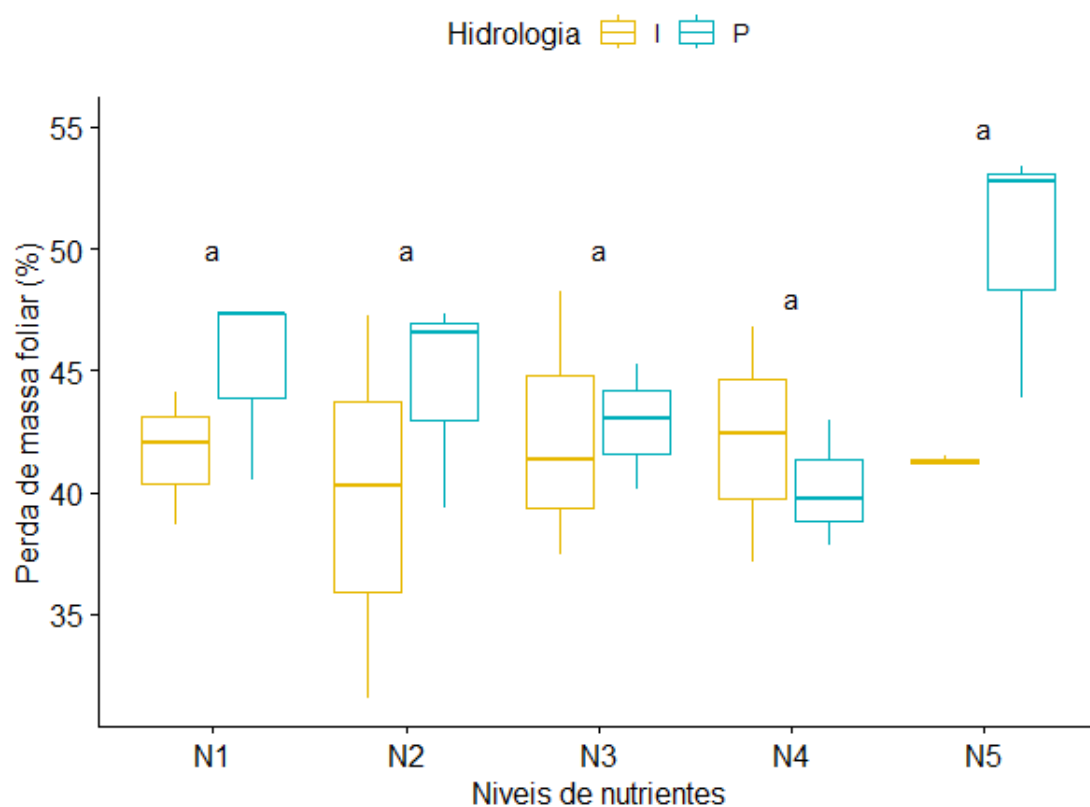


Figura 3. Perda de massa das folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

Tabela 1. Two-way ANOVA's sobre o efeito da hidrologia e do gradiente de nutrientes na perda de massa foliar, na biomassa fúngica, na taxa de esporulação, na riqueza e nos dois índices de biodiversidade (índice de Shannon e equabilidade de Pielou).

Parâmetro	Efeito	df	SS	MS	F	P
Perda de massa foliar	Hidrologia	1	71,4	71,37	3,582	0,073
	Nutrientes	4	69,3	17,34	0,870	0,499
	Nutrientes x Hidrologia	4	99,2	24,81	1,245	0,324
	Residuais	20	398,5	19,92		
Biomassa fúngica	Hidrologia	1	0,0000027	2,650e ⁶	0,067	0,799
	Nutrientes	4	0,0010507	2,627e ⁴	6,615	0,002
	Nutrientes x Hidrologia	4	0,0000536	1,335e ⁵	0,336	0,850
	Residuais	20	0,0007942	3,971e ⁵		
Taxa de esporulação	Hidrologia	1	0,174	0,1741	2,172	0,156
	Nutrientes	4	6,147	1,5366	19,165	1,28e ⁶
	Nutrientes x Hidrologia	4	0,569	0,1422	1,773	0,174
	Residuais	20	1,604	0,0802		

Tabela 1. Two-way ANOVA's sobre o efeito da hidrologia e do gradiente de nutrientes na perda de massa foliar, na biomassa fúngica, na taxa de esporulação, na riqueza e nos dois índices de biodiversidade (índice de Shannon e equabilidade de Pielou). (continuação)

Riqueza de espécies	Hidrologia	1	10,80	10,800	4,696	0,043
	Nutrientes	4	50,53	12,633	5,493	0,004
	Nutrientes x Hidrologia	4	12,53	3,133	1,362	0,282
	Residuais	20	46,00	2,300		
Índice de Shannon (H')	Hidrologia	1	0,3387	0,3387	16,070	689x10 ⁻⁶
	Nutrientes	4	1,1782	0,2946	13,977	1,35e ⁻⁵
	Nutrientes x Hidrologia	4	0,2263	0,0566	2,685	0,061
	Residuais	20	0,4215	0,0211		
Equabilidade de Pielou (J')	Hidrologia	1	0,02521	0,025213	8,355	0,009
	Nutrientes	4	0,10815	0,027037	80960	258x10 ⁻⁶
	Nutrientes x Hidrologia	4	0,04231	0,010577	3,505	0,025
	Residuais	20	0,06035	0,003018		

Graus de liberdade (df), soma dos quadrados (SS), média dos quadrados (MS), valor de F (F), probabilidade de aceitação da hipótese nula (P).

3.2. Biomassa dos fungos aquáticos

A biomassa dos fungos associada à folhada em decomposição foi afetada significativamente pelo gradiente de concentrações de nutrientes (two-way ANOVA, $P < 0,05$; Tabela 1). Contudo, a biomassa fúngica não foi afetada de forma significativa pelo tipo de hidrologia ou pela interação entre o tipo de hidrologia e o gradiente de concentrações de nutrientes (two-way ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 1). De modo geral, houve uma resposta positiva da biomassa fúngica ao aumento da concentração de nutrientes, independentemente, do tipo de hidrologia (Figura 4). A biomassa fúngica variou entre os 95,18 e 174,91 μg ergosterol g^{-1} folha seca no tratamento permanente, e entre os 96,64 e 177,92 μg ergosterol g^{-1} folha seca no tratamento intermitente. A biomassa foi menor para a concentração mais baixa de nutrientes (N1), tendo aumentado gradualmente com o aumento das concentrações de nutrientes. Apenas entre as concentrações N1 e N5 a biomassa fúngica foi significativamente diferente (teste de Tukey, $P < 0,05$).

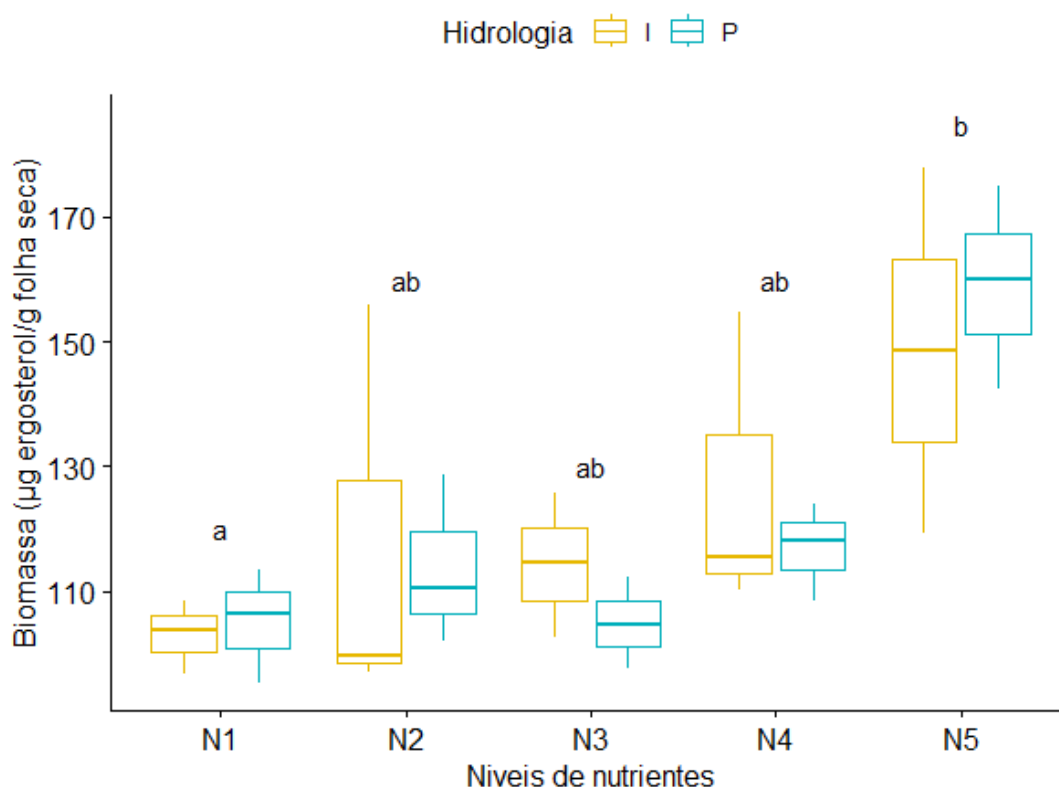


Figura 4. Taxa de produção de biomassa fúngica na decomposição em folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0065 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N2: 0,25 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0161 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N3: 0,5 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0323 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N4: 1 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0645 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} e N5: 10 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,6452 mg L^{-1} P - PO_4^{3-}) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

3.3. Taxa de reprodução dos fungos aquáticos

A taxa de esporulação dos fungos aquáticos foi afetada significativamente pelo gradiente de concentrações de nutrientes (two-way ANOVA, $P < 0,05$; Tabela 1), mas não pelo tipo de hidrologia nem pela interação entre o tipo de hidrologia e o gradiente de concentrações de nutrientes (two-way ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 1). De modo geral, observou-se uma resposta positiva da taxa de esporulação dos fungos aquáticos ao longo do gradiente de concentração de nutrientes, independentemente, do tipo de hidrologia (Figura 5). A taxa de reprodução variou entre os 693,89 e 4076,13 esporos mg^{-1} folha seca d^{-1} no tratamento permanente, e entre os 353,56 e 3358,67 esporos mg^{-1} folha seca d^{-1} no tratamento intermitente. A taxa de esporulação foi menor para baixas concentrações de nutrientes (N1 - N2), tendo aumentado nas concentrações intermédias de nutrientes (N3 - N4) e foi significativamente mais alta na concentração mais elevada de nutrientes (N5) (teste de Tukey, $P < 0,05$).

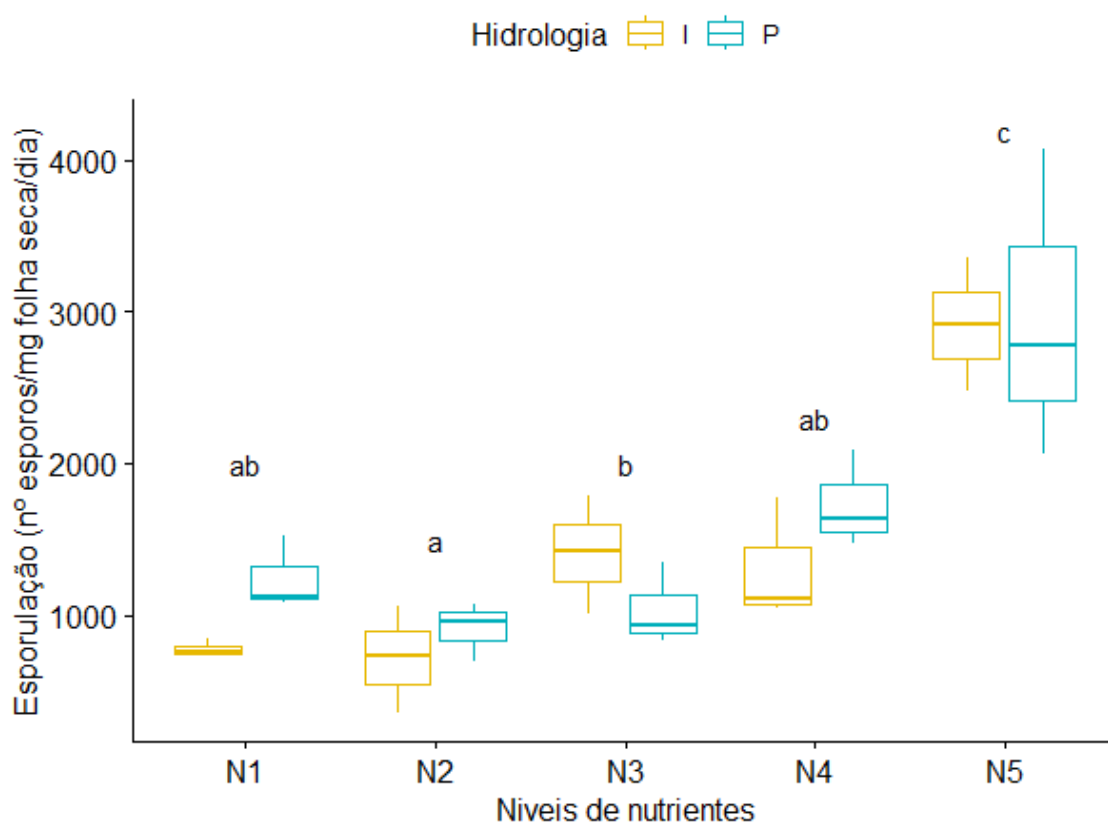


Figura 5. Taxa de esporulação na decomposição em folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0065 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N2: 0,25 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0161 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N3: 0,5 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0323 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} ; N4: 1 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,0645 mg L^{-1} P - PO_4^{3-} e N5: 10 mg L^{-1} N - NO_3^- e 0,6452 mg L^{-1} P - PO_4^{3-}) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

3.4. Diversidade dos fungos aquáticos

A riqueza em taxa de hifomicetos aquáticos foi significativamente afetada pelo gradiente de concentrações de nutrientes (two-way ANOVA, $P < 0,01$; Tabela 1) e pelo tipo de hidrologia (two-way ANOVA, $P < 0,05$; Tabela 1), mas não foi afetada pela interação de ambos os fatores (two-way ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 1). A riqueza foi menor para baixas concentrações de nutrientes (N1), tendo aumentado gradualmente com o aumento da concentração de nutrientes. Apenas entre as concentrações N1 e N5 a riqueza foi significativamente diferente (teste de Tukey, $P < 0,05$). A riqueza em espécies variou entre 12 e 15, no tratamento permanente, e variou entre 10 e 15, no tratamento intermitente. Em média, a riqueza foi menor nos tratamentos intermitentes do que nos permanentes (Figura 6).

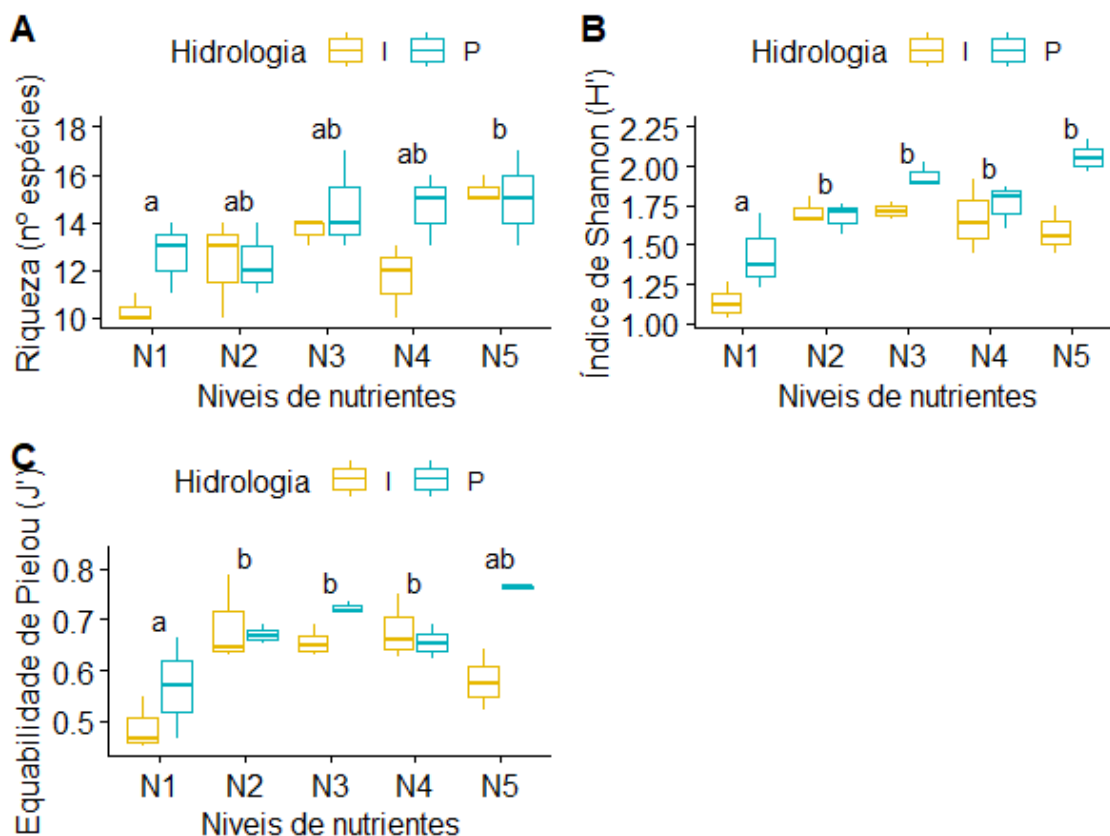


Figura 6. Riqueza de espécies (A), Índice de Shannon (B) e Equabilidade de Pielou (C) das comunidades de hifomicetos aquáticos associadas às folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

Foi analisada também a resposta de dois índices de biodiversidade: o índice de Shannon (H') e a equabilidade de Pielou (J) (Figura 6). O índice de Shannon foi afetado significativamente pelo gradiente de concentração de nutrientes e pelo tipo de hidrologia (two-way ANOVA, $P < 0,05$), mas não pela interação destes fatores (two-way ANOVA, $P > 0,05$; Tabela 1). O índice de Shannon foi menor na concentração mais baixa (N1), tendo aumentado nas concentrações intermédias e mais elevada de nutrientes (N2 - N5) (teste de Tukey, $P < 0,05$). Por outro lado, a equabilidade de Pielou foi afetada significativamente pelo gradiente de concentração de nutrientes e pelo tipo de hidrologia (two-way ANOVA, $P < 0,05$), tal como no índice de biodiversidade anterior, bem como pela interação desses fatores (two-way ANOVA, $P < 0,05$; Tabela 1). A equabilidade de Pielou foi menor na concentração mais baixa (N1), tendo aumentado nas concentrações intermédias e na concentração mais elevada de nutrientes (N2 - N5) (teste de Tukey, $P < 0,05$). De forma geral, os índices de biodiversidade foram maiores no tratamento hidrológico permanente quando comparado com o tratamento hidrológico intermitente. Porém, observamos que a equabilidade de Pielou, aumentou gradualmente com a concentração de nutrientes no tratamento hidrológico permanente, mas mostrou uma tendência em forma de sino no tratamento hidrológico intermitente, diminuindo para a concentração N5 (Figura 6).

Verificamos que ocorreu uma maior dominância na esporulação por parte de duas espécies de fungos aquáticos em ambos os tratamentos hidrológicos, nomeadamente a *Anguillospora filiformis* e a *Articulospora tetracladia*. No tratamento hidrológico permanente houve uma terceira espécie de fungo dominante, a *Flagellospora curvula* (Figura 7). Observamos ainda que as espécies *Dimorphospora foliicola*, Sigmoid 1, e Sigmoid 5 (tratamento permanente) e também as espécies *Flagellospora curvula* e *Varicosporium elodeae* (tratamento permanente e intermitente) ganharam relevância ao longo do gradiente de nutrientes (Figura 7).

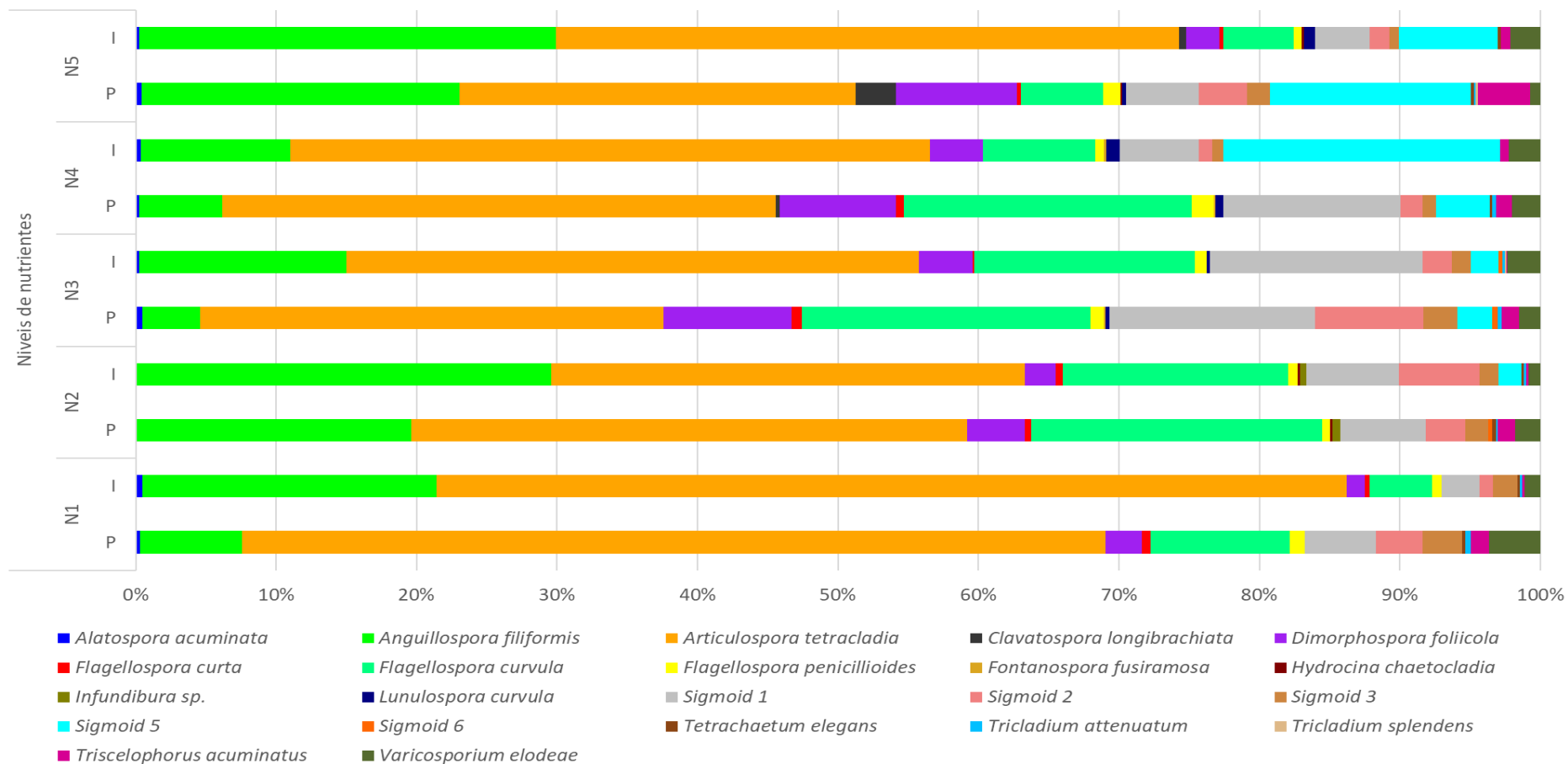


Figura 7. Contribuição percentual de cada taxon de hifomicetos aquáticos para a produção total de conídios durante a decomposição de folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

O enriquecimento dos microcosmos com nutrientes, o tipo de hidrologia e o efeito conjunto destes agentes de stress afetaram de forma significativa a biodiversidade beta das comunidades fúngicas, avaliada pelo índice de Bray-Curtis (PERMANOVA, $P < 0,05$; Tabela 2). Observou-se uma clara distribuição das comunidades fúngicas pelos níveis de nutrientes (Fig. 8), sendo que a comunidade fúngica presente no nível de nutrientes mais alto (N5) foi claramente diferentes das outras comunidades fúngicas. A hidrologia também foi importante para a estruturação das comunidades. No entanto, apenas as comunidades de N1 apresentam uma separação clara entre os tratamentos permanente e intermitente.

Tabela 2. PERMANOVA sobre o efeito da hidrologia e de um gradiente de nutrientes nas comunidades de fungos aquáticos.

Efeito	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Nutrientes	4	7765,2	1941.3	10,093	0,001
Hidrologia	1	1103,5	1103,5	5,7368	0,001
Nutrientes x Hidrologia	4	1367,7	341,93	1,7776	0,014
Resíduos	20	3847	192,35		
Total	29	14083			

Graus de liberdade (df), soma dos quadrados (SS), média dos quadrados (MS), valor de F (Pseudo-F), probabilidade de aceitação da hipótese nula (P(perm)).

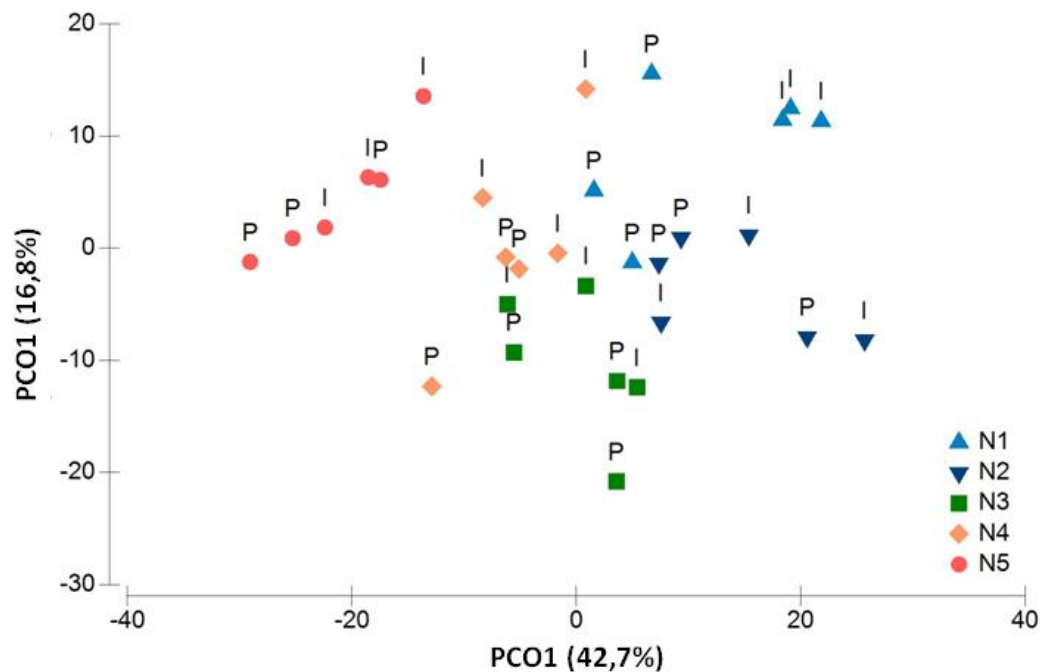


Figura 8. Ordenação PCoA das comunidades fungos aquáticos estruturada pelos níveis de nutrientes e tipo de hidrologia. Níveis de nutrientes: N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻. Tipos de hidrologia: permanente (P) e intermitente (I).

4. Discussão

4.1. Efeito da seca e do enriquecimento em nutrientes nas funções ecológicas dos fungos aquáticos

No nosso estudo, a taxa de decomposição de folhada não foi afetada pelo aumento da concentração de nutrientes. Este resultado foi surpreendente, uma vez que a maioria dos estudos em laboratório (Gulis et al., 2017) ou no campo (Ferreira, Gulis, et al., 2006; Gulis et al., 2006; Gulis & Suberkropp, 2003c) mostraram que o aumento da concentração de azoto e/ou fósforo dissolvido estimulava a taxa de decomposição (Ferreira, Chauvet, et al., 2015; Rosemond et al., 2015). Numa meta-análise, onde se analisaram 840 casos de estudo referentes a 40 anos de investigação concluiu-se que o enriquecimento de nutrientes dissolvidos na água dos rios estimulou a decomposição de folhada em cerca de 50% (Ferreira, Castagnérol, et al., 2015). A produção de enzimas extracelulares pelas comunidades fúngicas para a obtenção de nutrientes é um processo energeticamente dispendioso e que requer o consumo de nutrientes orgânicos e

inorgânicos, pelo que os fungos podem utilizar os nutrientes dissolvidos na coluna de água para além dos nutrientes disponíveis nos substratos orgânicos, como folhada, para contrabalançarem os gastos desse processo biológico. O aumento da decomposição de folhada tem sido associado a um enriquecimento moderado de nutrientes (Ferreira, Chauvet, et al., 2015; Gulis et al., 2019b; Gulis & Suberkropp, 2003c; Rosemond et al., 2015; Woodward et al., 2012), o que pode ser atribuído ao efeito estimulador que os nutrientes exercem na comunidade microbiana e nas suas atividades (Ferreira, 2020). No entanto, alguns estudos não observaram quaisquer efeitos do enriquecimento em nutrientes no processo de decomposição da folhada (Abelho & Graça, 2006; Baldy et al., 2007; Chadwick & Hury, 2003), ou observaram efeitos negativos quando as concentrações dos mesmos são muito elevadas (Pascoal & Cássio, 2004; Pereira et al., 2016; Woodward et al., 2012). Muitas vezes, em rios eutrofizados, essa inibição está relacionada com a presença concomitante de outros contaminantes, potencialmente tóxicos para as comunidades microbianas (Pascoal & Cássio, 2004). Em condições em que as concentrações de nutrientes são mais baixas, o enriquecimento em nutrientes pode ter um efeito estimulador na decomposição de folhada, contudo este efeito não é tão forte quando as comunidades microbianas já estão expostas a altas concentrações de nutrientes (Ferreira, Castagnyrol, et al., 2015). No nosso estudo, as comunidades microbianas eram provenientes de um ribeiro com baixa concentração basal de nutrientes ($0,045 \text{ mg L}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$ e $< 0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ P} - \text{PO}_4^{3-}$), pelo que seria de esperar um efeito estimulador do enriquecimento em nutrientes. No entanto, isso não foi observado. Sabe-se que os fungos têm capacidade de obter nutrientes tanto das folhas como da água (Suberkropp & Chauvet, 1995). Como as folhas de amieiro são folhas com maior conteúdo em nutrientes (Hladyz et al., 2009), é possível que os fungos tenham conseguido obter nutrientes suficientes e que por isso o enriquecimento em nutrientes na água não tenha promovido um estímulo da decomposição.

Por outro lado, e corroborando a hipótese colocada, a biomassa fúngica e a taxa de reprodução dos fungos aquáticos associados às folhas em decomposição foram aumentando à medida que os níveis de nutrientes aumentaram. A reprodução fúngica é bastante sensível a vários fatores tanto bióticos como abióticos, nos quais se incluem a concentração de nutrientes na água (Abelho & Graça, 2006; Gulis & Suberkropp, 2004). Vários estudos de laboratório demonstraram um claro estímulo da atividade microbiana (acumulação de biomassa fúngica, taxa de esporulação e produção cumulativa de esporos) pelos nutrientes inorgânicos dissolvidos (Ferreira & Chauvet, 2011; Gulis & Suberkropp, 2003a, 2003c; Sridhar & Bärlocher, 1997; Suberkropp,

1998). As taxas de esporulação dos fungos aquáticos foram estimuladas em locais com maior enriquecimento de nutrientes, estando de acordo com o que já foi observado em outros estudos (Grattan & Suberkropp, 2001; Nikolcheva & Bärlocher, 2005; Sridhar & Bärlocher, 2000; Suberkropp, 1998; Suberkropp & Chauvet, 1995). As necessidades das comunidades microbianas por azoto podem ser satisfeitas por baixos níveis de nutrientes, sugerindo que mesmo pequenos aumentos nos nutrientes dissolvidos na água devido à eutrofização antropogénica, podem levar a mudanças significativas na dinâmica das comunidades microbianas (Ferreira, Gulis, et al., 2006).

Contrariamente à hipótese colocada, a exposição a um período de intermitência não afetou a decomposição de folhada, a produção de biomassa, e a reprodução dos fungos aquáticos. Apesar dos valores de decomposição terem sido tendencialmente inferiores no tratamento intermitente comparativamente ao tratamento permanente, esta diferença não foi significativa. O aumento da velocidade da corrente e, consequentemente, o aumento da oxigenação, da turbulência e da disponibilidade de nutrientes estimulam a colonização fúngica e a perda de massa foliar (Artigas et al., 2011). A estrutura e a atividade das comunidades microbianas presentes nas folhas respondem de forma rápida à retomada do fluxo (Artigas et al., 2009), e os fungos respondem de uma forma positiva ao re-humedecimento das folhas (Bruder et al., 2011). Um retorno do fluxo de água e o aumento da disponibilidade em nutrientes dissolvidos promovem a libertação das restrições fisiológicas impostas durante o período de seca às comunidades microbianas e, portanto, estimulação da decomposição pelas comunidades microbianas (Bruder et al., 2011; Maamri et al., 2001; Schlieff & Mutz, 2011), ou seja, ocorre algo semelhante ao “efeito de Birch” em que acontecem pulsos de mineralização quando os solos secos são novamente molhados pela chuva ou irrigação (Birch, 1958). Assim sendo, um re-humedecimento das folhas pode levar a um pulso de decomposição pelas comunidades microbianas, fazendo com que não haja diferenças entre tratamentos permanentes e intermitentes.

As reduções da disponibilidade de água levam a uma redução da biomassa produzidas pelas comunidades microbianas e restringem a sua atividade por meio de uma redução do substrato e da difusão de nutrientes, combinada com o aumento do stress osmótico derivado dessa redução hídrica (Amalfitano et al., 2008; Duarte et al., 2017; Manzoni et al., 2012; Mora-Gómez et al., 2018; Schimel et al., 2007). No entanto, no nosso trabalho, o tipo de hidrologia não teve um

efeito significativo na biomassa fúngica, nem na taxa de reprodução, contrariamente à hipótese colocada. Isto pode ser devido ao facto das comunidades fúngicas reagirem de forma muito positiva ao re-humedecimento da folhada (Bruder et al., 2011), e a retoma de fluxo, o aumento da oxigenação, o aumento da turbulência e a disponibilidade de nutrientes acabarem por estimular a produção de biomassa e a esporulação fúngica (Artigas et al., 2011).

4.2. Efeito da seca e do enriquecimento em nutrientes na diversidade dos fungos aquáticos

No nosso estudo, observámos que o número de espécies de hifomicetos aquáticos aumentou ao longo do gradiente de nutrientes. No entanto, o número de espécies de hifomicetos foi afetado pelo tipo de hidrologia, sendo que foram observados valores mais baixos de riqueza no regime hidrológico intermitente. O mesmo padrão foi observado para o índice de Shannon e para a equitabilidade de Pielou. O enriquecimento em nutrientes levou a um aumento do número de espécies de hifomicetos aquáticos em ribeiros (Gulis & Suberkropp, 2004). A equitabilidade de Pielou foi o único parâmetro para o qual se verificou uma interação entre o aumento dos nutrientes e a hidrologia. No regime permanente, a equitabilidade aumentou gradualmente com o aumento dos nutrientes, mas no regime intermitente, a equitabilidade mostrou um padrão em sino, diminuindo nos tratamentos com baixa ou elevada concentração de nutrientes. Isto sugere que o efeito concomitante do aumento de nutrientes e da seca, podem levar a uma diminuição da equitabilidade das comunidades de fungos aquáticos, levando a uma dominância de um menor número de espécies.

A estrutura da comunidade fúngica do nosso estudo sofreu alterações devidas aos efeitos individuais e combinados dos dois agentes de stress analisados. O enriquecimento em nutrientes da água pode originar mudanças nas contribuições relativas das espécies de hifomicetos aquáticos para a produção de conídios (Artigas et al., 2008; Ferreira, Gulis, et al., 2006; Gulis & Suberkropp, 2003c, 2004). O potencial reprodutivo de cada espécie de hifomiceto aquático pode mudar com o enriquecimento em nutrientes, sendo que algumas espécies de hifomicetos aquáticos são beneficiadas pela maior disponibilidade de recursos (Gulis & Suberkropp, 2003c).

O nível de nutrientes pode ser um bom preditor da taxa de esporulação dos fungos, uma vez que

este parâmetro eco-fisiológico é bastante sensível à variação ambiental, incluindo à presença de gradientes de eutrofização (Abelho & Graça, 2006; Gulis & Suberkropp, 2004; Pereira et al., 2016). Em trabalhos anteriores, os esporos de *A. tetracladia* e de *T. elegans* foram os mais abundantes em ambientes com concentrações de nutrientes baixas, enquanto a *C. longibrachiata* aumentava o número de esporos produzidos em concentrações mais altas de nutrientes (Fernández et al., 2016). Os nossos dados confirmam que o nível de nutrientes é um fator importante nas taxas de esporulação, mas mostram respostas diferentes das espécies *A. tetracladia* e *T. elegans* a este agente de stress: observámos uma maior produção de esporos por ambas as espécies nas concentrações mais altas de nutrientes. Por outro lado, o número de esporos observados e produzidos pela *C. longibrachiata* vem a conferir o que já foi observado por Fernández *et al.* (2016). No nosso estudo, as espécies de hifomicetos aquáticos que apresentaram maiores taxas de esporulação foram *A. filiformis*, *A. tetracladia* e *F. curvula*. Arias-Real *et al.* (2023) caracterizaram a *F. curvula* como uma espécie generalista à seca e *A. tetracladia* como uma espécie parcialmente sensível à seca. A espécie *A. filiformis* não foi analisada no estudo de Arias-Real *et al.* (2023), mas outras espécies do género *Anguillospora* foram caracterizadas como generalistas em relação à seca, pelo que podemos colocar a hipótese de que *A. filiformis* seja também uma espécie generalista à seca. No nosso estudo, *F. curvula* foi afetada negativamente pela intermitência, o que vai contra o que foi observado no estudo referido anteriormente. Arias-Real *et al.* (2023) confirmaram que a seca é um fator abiótico dominante e que regula a composição das comunidades de fungos aquáticos nos IRES. Paralelamente, estes autores agruparam os fungos aquáticos em quatro grupos apresentando distribuições e respostas contrastantes ao longo do gradiente de seca: sensíveis à seca, parcialmente tolerantes à seca, generalistas e especialistas em seca. Descobriram também que as espécies pertencentes ao grupo das espécies sensíveis e parcialmente tolerantes tiveram uma contribuição potencialmente maior para ambos os processos do ecossistema (decomposição de folhada e produção de biomassa fúngica) do que as generalistas e as especialistas em seca, sugerindo, assim, um compromisso funcional entre estratégias de resistência à seca e a energia investida no crescimento e na reprodução.

4.3. Conclusões e perspectivas futuras

Globalmente, os impactos da seca e dos nutrientes parecem ser mais fortes na diversidade de fungos aquáticos do que nas funções ecológicas que os fungos desempenham. A decomposição de folhada não foi afetada pelo enriquecimento em nutrientes ou pela seca, e a biomassa e a esporulação foram estimuladas pelo enriquecimento em nutrientes. No entanto, quer a diversidade, quer a estrutura das comunidades foram afetadas por ambos os agentes de stress.

Alguns estudos sobre as relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas que envolveram a manipulação de espécies de hifomicetos aquáticos apontaram para uma relação positiva entre a diversidade fúngica e a decomposição de folhada (Bärlocher & Corkum, 2003; Duarte et al., 2006; Fernandes et al., 2011; Pascoal et al., 2010; Treton et al., 2004). No entanto, noutros estudos não foi possível observar esses efeitos da diversidade na perda de massa foliar, apontando assim para uma redundância funcional entre os fungos (Andrade et al., 2016; Dang et al., 2005; Geraldine et al., 2012). No nosso trabalho, observou-se uma maior diversidade de fungos aquáticos, biomassa fúngica, e reprodução com o aumento do gradiente de nutrientes, mas isso não se traduziu num aumento da decomposição foliar. É possível que os fungos estivessem a usar os nutrientes da água (Cheever et al., 2013), investindo menos na obtenção de nutrientes a partir da folha. Por outro lado, os efeitos da intermitência foram apenas observados na diversidade dos fungos aquáticos, mas não nas funções, promovendo uma diminuição da riqueza e da equitabilidade das comunidades. No longo termo, estes efeitos na diversidade podem repercutir-se no processo de decomposição de folhada, com consequências para o funcionamento dos ecossistemas de água doce.

De forma a complementar o nosso estudo, seria interessante comparar os efeitos do enriquecimento em nutrientes e da seca em comunidades microbianas com diferentes backgrounds, como por exemplo, comunidades microbianas de rios perenes com as de rios intermitentes, ou comunidades microbianas de rios oligotróficos com as de rios eutrofizados. Também seria interessante estabelecer comparações entre regiões climáticas diferentes, como por exemplo, comparar as comunidades microbianas de regiões temperadas com as de regiões tropicais, ou mesmo entre as comunidades de ambas as regiões temperadas (norte e sul). E, também, seria bastante desafiante aprofundar ainda a análise dos dados deste estudo através de análise das respostas genéticas e/ou dos traços funcionais.

5. Referências

- Abelho, M., & Graça, M. A. S. (2006). Effects of nutrient enrichment on decomposition and fungal colonization of sweet chestnut leaves in an iberian stream (Central portugal) [Article]. *Hydrobiologia*, 560, 239-247. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-9414-2>
- Abril, M., Munoz, I., & Menendez, M. (2016). Heterogeneity in leaf litter decomposition in a temporary Mediterranean stream during flow fragmentation [Article]. *Science of the Total Environment*, 553, 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.082>
- Acuña, V., Datry, T., Marshall, J., Barcelo, D., Dahm, C. N., Ginebreda, A., . . . Palmer, M. A. (2014). Why Should We Care About Temporary Waterways? [Editorial Material]. *Science*, 343(6175), 1080-1081. <https://doi.org/10.1126/science.1246666>
- Acuña, V., Muñoz, I., Giorgi, A., Omella, M., Sabater, F., & Sabater, S. (2005). Drought and postdrought recovery cycles in an intermittent Mediterranean stream: structural and functional aspects [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(4), 919-933. <https://doi.org/10.1899/04-078.1>
- Amalfitano, S., Fazi, S., Zoppini, A., Caracciolo, A. B., Grenni, P., & Puddu, A. (2008). Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers [Article]. *Microbial Ecology*, 55(2), 270-279. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9274-6>
- Andersen, H. E., Kronvang, B., Larsen, S. E., Hoffmann, C. C., Jensen, T. S., & Rasmussen, E. K. (2006). Climate-change impacts on hydrology and nutrients in a Danish lowland river basin [Article]. *Science of the Total Environment*, 365(1-3), 223-237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.02.036>
- Andrade, R., Pascoal, C., & Cássio, F. (2016). Effects of inter and intraspecific diversity and genetic divergence of aquatic fungal communities on leaf litter decomposition-a microcosm experiment [Article]. *Fems Microbiology Ecology*, 92(7), 8, Article fiw102. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw102>
- Argyroudi, A., Chatzinikolaou, Y., Poirazidis, K., & Lazaridou, M. (2009). Do intermittent and ephemeral Mediterranean rivers belong to the same river type? [Article]. *Aquatic Ecology*, 43(2), 465-476. <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9176-9>
- Arias-Real, R., Menéndez, M., Muñoz, I., & Pascoal, C. (2023). Drying shapes the ecological niche of aquatic fungi with implications on ecosystem functioning [Article]. *Science of the Total Environment*, 859, 9, Article 160374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160374>
- Arroita, M., Eloegi, A., & Hall, R. O. (2019). Twenty years of daily metabolism show riverine recovery following sewage abatement [Article]. *Limnology and Oceanography*, 64, S77-S92. <https://doi.org/10.1002/lno.11053>
- Artigas, J., Gaudes, A., Muñoz, I., Romani, A. M., & Sabater, S. (2011). Fungal and Bacterial Colonization of Submerged Leaf Litter in a Mediterranean Stream [Article]. *International Review of Hydrobiology*, 96(3), 221-234. <https://doi.org/10.1002/iroh.201111355>
- Artigas, J., Romani, A. M., Gaudes, A., Muñoz, I., & Sabater, S. (2009). Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream [Article]. *Freshwater Biology*, 54(10), 2025-2036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02140.x>
- Artigas, J., Romani, A. M., & Sabater, S. (2008). Effect of nutrients on the sporulation and diversity of aquatic hyphomycetes on submerged substrata in a Mediterranean stream [Article]. *Aquatic Botany*, 88(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.08.005>
- Azevedo, L. B., van Zelm, R., Leuven, R., Hendriks, A. J., & Huijbregts, M. A. J. (2015). Combined ecological risks of nitrogen and phosphorus in European freshwaters [Article]. *Environmental Pollution*, 200, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.011>

- Baert, J. M., Eisenhauer, N., Janssen, C. R., & De Laender, F. (2018). Biodiversity effects on ecosystem functioning respond unimodally to environmental stress [Article]. *Ecology Letters*, 21(8), 1191-1199. <https://doi.org/10.1111/ele.13088>
- Baert, J. M., Janssen, C. R., Sabbe, K., & De Laender, F. (2016). Per capita interactions and stress tolerance drive stress-induced changes in biodiversity effects on ecosystem functions [Article]. *Nature Communications*, 7, 8, Article 12486. <https://doi.org/10.1038/ncomms12486>
- Baldy, V., & Gessner, M. O. (1997). Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream [Article]. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 320(9), 747-758. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(97\)84824-x](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(97)84824-x)
- Baldy, V., Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1995). Bacteria, Fungi and the Breakdown of Leaf Litter in a Large River [Article]. *Oikos*, 74(1), 93-102. <https://doi.org/10.2307/3545678>
- Baldy, V., Gobert, V., Guerold, F., Chauvet, E., Lambrigt, D., & Charcosset, J. Y. (2007). Leaf litter breakdown budgets in streams of various trophic status: effects of dissolved inorganic nutrients on microorganisms and invertebrates [Article]. *Freshwater Biology*, 52(7), 1322-1335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01768.x>
- Beaumelle, L., De Laender, F., & Eisenhauer, N. (2020). Biodiversity mediates the effects of stressors but not nutrients on litter decomposition [Article]. *Elife*, 9, 40, Article e55659. <https://doi.org/10.7554/eLife.55659>
- Bellemare, J., Motzkin, G., & Foster, D. R. (2002). Legacies of the agricultural past in the forested present: an assessment of historical land-use effects on rich mesic forests [Article]. *Journal of Biogeography*, 29(10-11), 1401-1420. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00762.x>
- Benfield, E. F., Webster, J. R., Tank, J. L., & Hutchens, J. J. (2001). Long-term patterns in leaf breakdown in streams in response to watershed logging [Article; Proceedings Paper]. *International Review of Hydrobiology*, 86(4-5), 467-474. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<467::aid-iroh467>3.3.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<467::aid-iroh467>3.3.co;2-t)
- Beniston, M., Stephenson, D. B., Christensen, O. B., Ferro, C. A. T., Frei, C., Goyette, S., . . . Woth, K. (2007). Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections [Article]. *Climatic Change*, 81, 71-95. <https://doi.org/10.1007/s10584-006-9226-z>
- Bernal, S., von Schiller, D., Sabater, F., & Marti, E. (2013). Hydrological extremes modulate nutrient dynamics in mediterranean climate streams across different spatial scales [Review]. *Hydrobiologia*, 719(1), 31-42. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1246-2>
- Birch, H. F. (1958). The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil*, 10, 9-31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01343734>
- Birk, S., Chapman, D., Carvalho, L., Spears, B. M., Andersen, H. E., Argillier, C., . . . Hering, D. (2020). Impacts of multiple stressors on freshwater biota across spatial scales and ecosystems [Article]. *Nature Ecology & Evolution*, 4(8), 1060-1068. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1216-4>
- Boulton, A. J., & Lake, P. S. (1990). THE ECOLOGY OF 2 INTERMITTENT STREAMS IN VICTORIA, AUSTRALIA .1. MULTIVARIATE ANALYSES OF PHYSICOCHEMICAL FEATURES [Article]. *Freshwater Biology*, 24(1), 123-141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1990.tb00313.x>
- Bruder, A., Chauvet, E., & Gessner, M. O. (2011). Litter diversity, fungal decomposers and litter decomposition under simulated stream intermittency [Article]. *Functional Ecology*, 25(6), 1269-1277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01903.x>
- Bruder, A., Salis, R. K., McHugh, N. J., & Matthaei, C. D. (2016). Multiple-stressor effects on leaf litter decomposition and fungal decomposers in agricultural streams contrast between litter species [Article]. *Functional Ecology*, 30(7), 1257-1266. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12598>

- Burns, E. E., Carter, L. J., Kolpin, D. W., Thomas-Oates, J., & Boxall, A. B. A. (2018). Temporal and spatial variation in pharmaceutical concentrations in an urban river system [Article]. *Water Research*, 137, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.066>
- Bärlocher, F. (1985). The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91(1-2), 83-94. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1985.tb01137.x>
- Bärlocher, F., & Corkum, M. (2003). Nutrient enrichment overwhelms diversity effects in leaf decomposition by stream fungi. *Oikos*, 101(2), 247-252.
- Bärlocher, F., & Kendrick, B. (1981). Role of aquatic hyphomycetes in the trophic structure of streams. *The Fungal Community*, 743-760.
- Bärlocher, F., Nikolcheva, L. G., Wilson, K. P., & Williams, D. D. (2006). Fungi in the hyporheic zone of a springbrook [Article]. *Microbial Ecology*, 52(4), 708-715. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9102-4>
- Canedo-Argüelles, M., Bundschuh, M., Gutierrez-Canovas, C., Kefford, B. J., Prat, N., Trobajo, R., & Schafer, R. B. (2014). Effects of repeated salt pulses on ecosystem structure and functions in a stream mesocosm [Article]. *Science of the Total Environment*, 476, 634-642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.067>
- Canhoto, C., Gonçalves, A. L., & Barlocher, F. (2016). Biology and ecological functions of aquatic hyphomycetes in a warming climate [Article]. *Fungal Ecology*, 19, 201-218. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.011>
- Chadwick, M. A., & Hurn, A. D. (2003). Effect of a whole-catchment N addition on stream detritus processing [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 22(2), 194-206. <https://doi.org/10.2307/1467992>
- Chamier, A. C., & Dixon, P. A. (1982a). PECTINASES IN LEAF DEGRADATION BY AQUATIC HYPHOMYCETES - THE ENZYMES AND LEAF MACERATION [Article]. *Journal of General Microbiology*, 128(OCT), 2469-2483.
- Chamier, A. C., & Dixon, P. A. (1982b). PECTINASES IN LEAF DEGRADATION BY AQUATIC HYPHOMYCETES-I - THE FIELD-STUDY THE COLONIZATION-PATTERN OF AQUATIC HYPHOMYCETES ON LEAF PACKS IN A SURREY STREAM [Article]. *Oecologia*, 52(1), 109-115. <https://doi.org/10.1007/bf00349018>
- Chapin, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., . . . Diaz, S. (2000). Consequences of changing biodiversity [Review]. *Nature*, 405(6783), 234-242. <https://doi.org/10.1038/35012241>
- Chauvet, E., Cornut, J., Sridhar, K. R., Selosse, M. A., & Barlocher, F. (2016). Beyond the water column: aquatic hyphomycetes outside their preferred habitat [Article]. *Fungal Ecology*, 19, 112-127. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.014>
- Cheever, B. M., Webster, J. R., Bilger, E. E., & Thomas, S. A. (2013). The relative importance of exogenous and substrate-derived nitrogen for microbial growth during leaf decomposition [Article]. *Ecology*, 94(7), 1614-1625. <https://doi.org/10.1890/12-1339.1>
- Cornut, J., Chauvet, E., Mermillod-Blondin, F., Assemat, F., & Elger, A. (2014). Aquatic Hyphomycete Species Are Screened by the Hyporheic Zone of Woodland Streams [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1949-1960. <https://doi.org/10.1128/aem.03024-13>
- Cornut, J., Elger, A., Lambrigt, D., Marmonier, P., & Chauvet, E. (2010). Early stages of leaf decomposition are mediated by aquatic fungi in the hyporheic zone of woodland streams [Article]. *Freshwater Biology*, 55(12), 2541-2556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02483.x>
- Cote, I. M., Darling, E. S., & Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation [Review]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 283(1824), 9, Article 20152592. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2592>

- Covich, A. P., Austen, M. C., Barlocher, F., Chauvet, E., Cardinale, B. J., Biles, C. L., . . . Moss, B. (2004). The role of Biodiversity in the functioning of freshwater and marine benthic ecosystems [Article]. *Bioscience*, 54(8), 767-775. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0767:trobil\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0767:trobil]2.0.co;2)
- Crain, C. M., Kroeker, K., & Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems [Article]. *Ecology Letters*, 11(12), 1304-1315. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x>
- Crutzen, P. J. (2002). Geology of mankind [Editorial Material]. *Nature*, 415(6867), 23-23. <https://doi.org/10.1038/415023a>
- Cummins, K. W., & Klug, M. J. (1979). FEEDING ECOLOGY OF STREAM INVERTEBRATES [Review]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10, 147-172. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.001051>
- Dahm, C. N., Grimm, N. B., Marmonier, P., Valett, H. M., & Vervier, P. (1998). Nutrient dynamics at the interface between surface waters and groundwaters [Article; Proceedings Paper]. *Freshwater Biology*, 40(3), 427-451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00367.x>
- Dang, C. K., Chauvet, E., & Gessner, M. O. (2005). Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships [Article]. *Ecology Letters*, 8(11), 1129-1137. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00815.x>
- Datry, T., Corti, R., Claret, C., & Philippe, M. (2011). Flow intermittence controls leaf litter breakdown in a French temporary alluvial river: the "drying memory" [Article]. *Aquatic Sciences*, 73(4), 471-483. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0193-8>
- Dieter, D., Frindte, K., Krüger, A., & Wurzbacher, C. (2013). Preconditioning of leaves by solar radiation and anoxia affects microbial colonisation and rate of leaf mass loss in an intermittent stream [Article]. *Freshwater Biology*, 58(9), 1918-1931. <https://doi.org/10.1111/fwb.12180>
- Doll, P., & Mueller Schmied, H. (2012). How is the impact of climate change on river flow regimes related to the impact on mean annual runoff? A global-scale analysis [Article]. *Environmental Research Letters*, 7(1), 11, Article 014037. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/1/014037>
- Duarte, S., Bärlocher, F., Trabulo, J., Cássio, F., & Pascoal, C. (2015). Stream-dwelling fungal decomposer communities along a gradient of eutrophication unraveled by 454 pyrosequencing [OriginalPaper]. *Fungal Diversity*, 70(1), 127-148. <https://doi.org/doi:10.1007/s13225-014-0300-y>
- Duarte, S., Mora-Gómez, J., Romani, A. M., Cássio, F., & Pascoal, C. (2017). Responses of microbial decomposers to drought in streams may depend on the environmental context. *Environmental microbiology reports*, 9(6), 756-765. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12592>
- Duarte, S., Pascoal, C., Alves, A., Correia, A., & Cassio, F. (2010). Assessing the dynamic of microbial communities during leaf decomposition in a low-order stream by microscopic and molecular techniques [Article]. *Microbiological Research*, 165(5), 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.06.002>
- Duarte, S., Pascoal, C., Cássio, F., & Bärlocher, F. (2006). Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia*, 147(4), 658-666. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0300-4>
- Duarte, S., Pascoal, C., Garabetian, F., Cássio, F., & Charcosset, J. Y. (2009). Microbial Decomposer Communities Are Mainly Structured by Trophic Status in Circumneutral and Alkaline Streams [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6211-6221. <https://doi.org/10.1128/aem.00971-09>
- Dudgeon, D. (2019). Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene [Editorial Material]. *Current Biology*, 29(19), R960-R967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.002>

- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Leveque, C., . . . Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163-182.
- Elwood, J. W., Newbold, J. D., Trimble, A. F., & Stark, R. W. (1981). THE LIMITING ROLE OF PHOSPHORUS IN A WOODLAND STREAM ECOSYSTEM - EFFECTS OF P-ENRICHMENT ON LEAF DECOMPOSITION AND PRIMARY PRODUCERS [Article]. *Ecology*, 62(1), 146-158. <https://doi.org/10.2307/1936678>
- Febria, C. M., Beddoes, P., Fulthorpe, R. R., & Williams, D. D. (2012). Bacterial community dynamics in the hyporheic zone of an intermittent stream [Article]. *Isme Journal*, 6(5), 1078-1088. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.173>
- Feld, C. K., Segurado, P., & Gutierrez-Canovas, C. (2016). Analysing the impact of multiple stressors in aquatic biomonitoring data: A 'cookbook' with applications in R [Article]. *Science of the Total Environment*, 573, 1320-1339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.243>
- Fernandes, I., Pascoal, C., & Cássio, F. (2011). Intraspecific traits change biodiversity effects on ecosystem functioning under metal stress. *Oecologia*, 166(4), 1019-1028. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1930-3>
- Fernández, D., Tummala, M., Schreiner, V. C., Duarte, S., Pascoal, C., Winkelmann, C., . . . Schäfer, R. B. (2016). Does nutrient enrichment compensate fungicide effects on litter decomposition and decomposer communities in streams? [Article]. *Aquatic Toxicology*, 174, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.019>
- Ferreira, V. (2020). Impact of Climate Change on Aquatic Hyphomycetes. In J. Marxsen (Ed.), *Climate Change and Microbial Ecology: Current Research and Future Trends* (Second Edition ed., pp. 193-214). Caister Academic Press, U.K. <https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781913652579.06>
- Ferreira, V., Castagnyrol, B., Koricheva, J., Gulis, V., Chauvet, E., & Graça, M. A. S. (2015). A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams [Review]. *Biological Reviews*, 90(3), 669-688. <https://doi.org/10.1111/brv.12125>
- Ferreira, V., & Chauvet, E. (2011). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi [Article]. *Global Change Biology*, 17(1), 551-564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ferreira, V., Chauvet, E., & Canhoto, C. (2015). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream [Article]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(2), 206-216. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0119>
- Ferreira, V., Graca, M. A. S., de Lima, J., & Gomes, R. (2006). Role of physical fragmentation and invertebrate activity in the breakdown rate of leaves [Article]. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 165(4), 493-513. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0165-0493>
- Ferreira, V., Gulis, V., & Graça, M. A. S. (2006). Whole-stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates [Article]. *Oecologia*, 149(4), 718-729. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0478-0>
- Field, J. I., & Webster, J. (1983). Anaerobic survival of aquatic fungi [Article]. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(OCT), 365-369. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(83\)80088-6](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(83)80088-6)
- Findlay, S. (2010). Stream microbial ecology [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 170-181. <https://doi.org/10.1899/09-023.1>
- Findlay, S. E. G., & Arsuffi, T. L. (1989). MICROBIAL-GROWTH AND DETRITUS TRANSFORMATIONS DURING DECOMPOSITION OF LEAF LITTER IN A STREAM [Article]. *Freshwater Biology*, 21(2), 261-269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1989.tb01364.x>
- Finn, M. A., Boulton, A. J., & Chessman, B. C. (2009). Ecological responses to artificial drought in two Australian rivers with differing water extraction [Article]. *Fundamental and*

- Applied Limnology*, 175(3), 231-248. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2009/0175-0231>
- Fisher, S. G., & Likens, G. E. (1973). Energy Flow in Bear Brook, New Hampshire: An Integrative Approach to Stream Ecosystem Metabolism. *Ecological Monographs*, 43(4), 421-439. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1942301>
- Fonseca, A. L. D., Bianchini, I., Pimenta, C. M. M., Soares, C. B. P., & Mangiavacchi, N. (2013). The flow velocity as driving force for decomposition of leaves and twigs [Article]. *Hydrobiologia*, 703(1), 59-67. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1342-3>
- Foote, K. J., Joy, M. K., & Death, R. G. (2015). New Zealand Dairy Farming: Milking Our Environment for All Its Worth [Article]. *Environmental Management*, 56(3), 709-720. <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0517-x>
- Foulquier, A., Artigas, J., Pesce, S., & Datry, T. (2015). Drying responses of microbial litter decomposition and associated fungal and bacterial communities are not affected by emersion frequency [Article]. *Freshwater Science*, 34(4), 1233-1244. <https://doi.org/10.1086/682060>
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change [Article; Proceedings Paper]. *Ambio*, 31(2), 64-71. [https://doi.org/10.1639/0044-7447\(2002\)031\[0064:rnatwy\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1639/0044-7447(2002)031[0064:rnatwy]2.0.co;2)
- Gasith, A., & Resh, V. H. (1999). Streams in Mediterranean climate regions: Abiotic influences and biotic responses to predictable seasonal events [Review]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 51-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.51>
- Geraldes, P., Pascoal, C., & Cássio, F. (2012). Effects of increased temperature and aquatic fungal diversity on litter decomposition [Article]. *Fungal Ecology*, 5(6), 734-740. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.007>
- Gessner, M. O. (2020). Ergosterol as a Measure of Fungal Biomass. In F. Bärlocher, M. Gessner, & M. Graça (Eds.), *Methods to Study Litter Decomposition* (2nd ed., pp. 247–255). Springer Nature. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_27
- Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1994). Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf-litter. *Ecology*, 75(6), 1807-1817.
- Gessner, M. O., Chauvet, E., & Dobson, M. (1999). A perspective on leaf litter breakdown in streams [Article]. *Oikos*, 85(2), 377-384. <https://doi.org/10.2307/3546505>
- Giller, P. S., Hillebrand, H., Berninger, U. G., Gessner, M. O., Hawkins, S., Inchausti, P., . . . O'Mullan, G. (2004). Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments [Article]. *Oikos*, 104(3), 423-436.
- Gomes, P. P. (2015). *Influência da química do detrito foliar e da água sobre a comunidade de hifomicetos aquáticos* Universidade de Brasília].
- Gonçalves, A. L., Lírio, A. V., Graça, M. A. S., & Canhoto, C. (2016). Fungal species diversity affects leaf decomposition after drought. *International Review of Hydrobiology*, 101(1-2), 78-86. <https://doi.org/10.1002/iroh.201501817>
- Grattan, R. M., & Suberkropp, K. (2001). Effects of nutrient enrichment on yellow poplar leaf decomposition and fungal activity in streams [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(1), 33-43. <https://doi.org/10.2307/1468186>
- Graça, M. A. S. (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - A review. *International Review of Hydrobiology*, 86(4-5), 383-393. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<383::aid-iroh383>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<383::aid-iroh383>3.0.co;2-d)
- Graça, M. A. S., Ferreira, R. C. F., & Coimbra, C. N. (2001). Litter processing along a stream gradient: the role of invertebrates and decomposers. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(3), 408-420.
- Gulis, V., Ferreira, V., & Graca, M. A. S. (2006). Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment [Article]. *Freshwater Biology*, 51(9), 1655-1669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01615.x>

- Gulis, V., Kuehn, K. A., Schoettle, L. N., Leach, D., Benstead, J. P., & Rosemond, A. D. (2017). Changes in nutrient stoichiometry, elemental homeostasis and growth rate of aquatic litter-associated fungi in response to inorganic nutrient supply [Article]. *Isme Journal*, 11(12), 2729-2739. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.123>
- Gulis, V., Su, R., & Kuehn, K. A. (2019a). Fungal Decomposers in Freshwater Environments. In C. Hurst (Ed.), *The Structure and Function of Aquatic Microbial Communities* (Vol. 7, pp. 121–155). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-16775-2_5
- Gulis, V., Su, R., & Kuehn, K. A. (2019b). Fungal Decomposers in Freshwater Environments. In C. Hurst (Ed.), *The Structure and Function of Aquatic Microbial Communities. Advances in Environmental Microbiology* (Vol. 7, pp. 121–155). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-16775-2_5
- Gulis, V., & Suberkropp, K. (2003a). Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microbial Ecology*, 45(1), 11-19.
- Gulis, V., & Suberkropp, K. (2003b). Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability [Article]. *Aquatic Microbial Ecology*, 30(2), 149-157. <https://doi.org/10.3354/ame030149>
- Gulis, V., & Suberkropp, K. (2003c). Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream [Article]. *Freshwater Biology*, 48(1), 123-134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.00985.x>
- Gulis, V., & Suberkropp, K. (2004). Effects of whole-stream nutrient enrichment on the concentration and abundance of aquatic hyphomycete conidia in transport [Article]. *Mycologia*, 96(1), 57-65. <https://doi.org/10.2307/3761988>
- Heard, S. B., Schultz, G. A., Ogden, C. B., & Griesel, T. C. (1999). Mechanical abrasion and organic matter processing in an Iowa stream [Article]. *Hydrobiologia*, 400, 179-186. <https://doi.org/10.1023/a:1003713307849>
- Hieber, M., & Gessner, M. O. (2002). Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates [Article]. *Ecology*, 83(4), 1026-1038. <https://doi.org/10.2307/3071911>
- Hladyz, S., Gessner, M. O., Giller, P. S., Pozo, J., & Woodward, G. (2009). Resource quality and stoichiometric constraints on stream ecosystem functioning [Article]. *Freshwater Biology*, 54(5), 957-970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02138.x>
- Holland, E. A., Braswell, B. H., Sulzman, J., & Lamarque, J. F. (2005). Nitrogen deposition onto the United States and western Europe: Synthesis of observations and models [Review]. *Ecological Applications*, 15(1), 38-57. <https://doi.org/10.1890/03-5162>
- Hoover, T. M., Richardson, J. S., & Yonemitsu, N. (2006). Flow-substrate interactions create and mediate leaf litter resource patches in streams [Article]. *Freshwater Biology*, 51(3), 435-447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01499.x>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346-363.
- Humphries, P., & Baldwin, D. S. (2003). Drought and aquatic ecosystems: an introduction [Article]. *Freshwater Biology*, 48(7), 1141-1146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01092.x>
- IPCC. (2023). *Summary for Policymakers* (Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Issue. IPCC.
- Kassambara, A. (2023). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. In.
- Kath, J., Thomson, J. R., Thompson, R. M., Kefford, B. J., Dyer, F. J., & Mac Nally, R. (2018). Interactions among stressors may be weak: Implications for management of freshwater macroinvertebrate communities [Article]. *Diversity and Distributions*, 24(7), 939-950. <https://doi.org/10.1111/ddi.12737>

- Kaushik, N. K. K., & Hynes, H. B. N. (1971). The fate of dead leaves that fall into streams. *Archiv für Hydrobiologie*, 465-515.
- Kuehn, K. A. (2016). Lentic and lotic habitats as templates for fungal communities: traits, adaptations, and their significance to litter decomposition within freshwater ecosystems [Article]. *Fungal Ecology*, 19, 135-154. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.009>
- Larned, S. T., Datry, T., Arscott, D. B., & Tockner, K. (2010). Emerging concepts in temporary-river ecology [Review]. *Freshwater Biology*, 55(4), 717-738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02322.x>
- Lebreton, L. C. M., Van der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans [Article]. *Nature Communications*, 8, 10, Article 15611. <https://doi.org/10.1038/ncomms15611>
- Lecerf, A., & Chauvet, E. (2008). Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams [Article]. *Freshwater Biology*, 53(8), 1658-1672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01986.x>
- Lillebo, A. I., Morais, M., Guilherme, P., Fonseca, R., Serafim, A., & Neves, R. (2007). Nutrient dynamics in Mediterranean temporary streams: A case study in Pardiela catchment (Degebe River, Portugal) [Article]. *Limnologia*, 37(4), 337-348. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2007.05.002>
- Liu, X. J., Zhang, Y., Han, W. X., Tang, A. H., Shen, J. L., Cui, Z. L., . . . Zhang, F. S. (2013). Enhanced nitrogen deposition over China [Article]. *Nature*, 494(7438), 459-462. <https://doi.org/10.1038/nature11917>
- Loreau, M. (2010). Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory [Review]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365(1537), 49-60. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0155>
- Maamri, A., Bärlocher, F., Pattee, E., & Chergui, H. (2001). Fungal and bacterial colonisation of *Salix pedicellata* leaves decaying in permanent and intermittent streams in eastern Morocco [Article]. *International Review of Hydrobiology*, 86(3), 337-348. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200106\)86:3<337::aid-iroh337>3.3.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200106)86:3<337::aid-iroh337>3.3.co;2-e)
- Maamri, A., Chauvet, E., Chergui, H., Gourbiere, F., & Pattee, E. (1998). Microbial dynamics on decaying leaves in a temporary Moroccan river. I - Fungi [Article]. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 144(1), 41-59.
- Maltby, L. (1992). Heterotrophic microbes. In P. Calow & G. E. Petts (Eds.), *The rivers handbook: hydrological and ecological principles, vol. 1* (pp. 165–187). Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Manning, D. W. P., Rosemond, A. D., Gulis, V., Benstead, J. P., & Kominoski, J. S. (2018). Nutrients and temperature additively increase stream microbial respiration [Article]. *Global Change Biology*, 24(1), E233-E247. <https://doi.org/10.1111/gcb.13906>
- Manzoni, S., Schimel, J. P., & Porporato, A. (2012). Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis [Article]. *Ecology*, 93(4), 930-938. <https://doi.org/10.1890/11-0026.1>
- Marks, J. C. (2019). Revisiting the Fates of Dead Leaves That Fall into Streams. In D. J. Futuyma (Ed.), *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 50* (Vol. 50, pp. 547-568). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024755>
- Medeiros, A. O., Pascoal, C., & Graca, M. A. S. (2009). Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions [Article]. *Freshwater Biology*, 54(1), 142-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02101.x>
- Meunier, C. L., Gundale, M. J., Sanchez, I. S., & Liess, A. (2016). Impact of nitrogen deposition on forest and lake food webs in nitrogen-limited environments [Review]. *Global Change Biology*, 22(1), 164-179. <https://doi.org/10.1111/gcb.12967>

- Meyer, J. L., & Johnson, C. (1983). THE INFLUENCE OF ELEVATED NITRATE CONCENTRATION ON RATE OF LEAF DECOMPOSITION IN A STREAM [Article]. *Freshwater Biology*, 13(2), 177-183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1983.tb00669.x>
- Meyer, J. L., Sale, M. J., Mulholland, P. J., & Poff, N. L. (1999). Impacts of climate change on aquatic ecosystem functioning and health [Review]. *Journal of the American Water Resources Association*, 35(6), 1373-1386. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1999.tb04222.x>
- Meyer, J. L., Wallace, J. B., & Eggert, S. L. (1998). Leaf litter as a source of dissolved organic carbon in streams [Article]. *Ecosystems*, 1(3), 240-249. <https://doi.org/10.1007/s100219900019>
- Milly, P. C. D., Betancourt, J., Falkenmark, M., Hirsch, R. M., Kundzewicz, Z. W., Lettenmaier, D. P., & Stouffer, R. J. (2008). Climate change - Stationarity is dead: Whither water management? [Editorial Material]. *Science*, 319(5863), 573-574. <https://doi.org/10.1126/science.1151915>
- Minshall, G. W. (1967). Role of Allochthonous Detritus in the Trophic Structure of a Woodland Springbrook Community. *Ecology*, 48(1), 139-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1933425>
- Mishra, A., Alnahit, A., & Campbell, B. (2021). Impact of land uses, drought, flood, wildfire, and cascading events on water quality and microbial communities: A review and analysis [Review]. *Journal of Hydrology*, 596, 17, Article 125707. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125707>
- Mora-Gómez, J., Duarte, S., Cássio, F., Pascoal, C., & Romani, A. (2018). Microbial decomposition is highly sensitive to leaf litter emersion in a permanent temperate stream. *The Science of The Total Environment*, 621, 486-496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.055>
- Mora-Gómez, J., Elosegi, A., Duarte, S., Cássio, F., Pascoal, C., & Romani, A. M. (2016). Differences in the sensitivity of fungi and bacteria to season and invertebrates affect leaf litter decomposition in a Mediterranean stream [Article]. *Fems Microbiology Ecology*, 92(8), 13, Article fiw121. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw121>
- Mora-Gómez, J., Elosegi, A., Mas-Marti, E., & Romani, A. M. (2015). Factors controlling seasonality in leaf-litter breakdown in a Mediterranean stream [Article]. *Freshwater Science*, 34(4), 1245-1258. <https://doi.org/10.1086/683120>
- Nikolcheva, L. G., & Bärlocher, F. (2005). Seasonal and substrate preferences of fungi colonizing leaves in streams:: traditional versus molecular evidence [Article]. *Environmental Microbiology*, 7(2), 270-280. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00709.x>
- Noges, P., Argillier, C., Borja, A., Garmendia, J. M., Hanganu, J., Kodes, V., . . . Birk, S. (2016). Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters [Article]. *Science of the Total Environment*, 540, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.045>
- Pascoal, C., & Cássio, F. (2004). Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5266-5273. <https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5266-5273.2004>
- Pascoal, C., & Cássio, F. (2008). Linking fungal diversity to the functioning of freshwater ecosystems. In K. Sridhar, F. Bärlocher, & H. K.D (Eds.), *Novel Techniques and Ideas in Mycology* (pp. 1-15). Fungal diversity Press.
- Pascoal, C., Cássio, F., & Gomes, P. (2001). Leaf breakdown rates: A measure of water quality? [Article; Proceedings Paper]. *International Review of Hydrobiology*, 86(4-5), 407-416. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<407::aid-iroh407>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<407::aid-iroh407>3.0.co;2-p)
- Pascoal, C., Cássio, F., Marcotegui, A., Sanz, B., & Gomes, P. (2005). Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(4), 784-797. <https://doi.org/10.1899/05-010.1>

- Pascoal, C., Cássio, F., Nikolcheva, L., & Bärlocher, F. (2010). Realized fungal diversity increases functional stability of leaf litter decomposition under zinc stress. *Microbial Ecology*, 59(1), 84-93. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9567-z>
- Pascoal, C., Pinho, M., Cássio, F., & Gomes, P. (2003). Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river [Article]. *Freshwater Biology*, 48(11), 2033-2044. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01130.x>
- Pereira, A., Gerales, P., Lima-Fernandes, E., Fernandes, I., Cássio, F., & Pascoal, C. (2016). Structural and functional measures of leaf-associated invertebrates and fungi as predictors of stream eutrophication [Article]. *Ecological Indicators*, 69, 648-656. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.05.017>
- Piggott, J. J., Niyogi, D. K., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Multiple stressors and stream ecosystem functioning: climate warming and agricultural stressors interact to affect processing of organic matter [Article]. *Journal of Applied Ecology*, 52(5), 1126-1134. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12480>
- Piggott, J. J., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors [Article]. *Ecology and Evolution*, 5(7), 1538-1547. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>
- Pohlon, E., Fandino, A. O., & Marxsen, J. (2013). Bacterial Community Composition and Extracellular Enzyme Activity in Temperate Streambed Sediment during Drying and Rewetting [Article]. *Plos One*, 8(12), 14, Article e83365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083365>
- Rader, R. B., McArthur, J. V., & Aho, J. M. (1994). RELATIVE IMPORTANCE OF MECHANISMS DETERMINING DECOMPOSITION IN A SOUTHEASTERN BLACKWATER STREAM [Article]. *American Midland Naturalist*, 132(1), 19-31. <https://doi.org/10.2307/2426197>
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., . . . Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity [Review]. *Biological Reviews*, 94(3), 849-873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin III, F. S., Lambin, E. F., . . . Foley, J. A. (2009). A safe operating space for humanity [Article]. *Nature*, 461(7263), 472-475. <https://doi.org/10.1038/461472a>
- Romani, A. M., Vazquez, E., & Butturini, A. (2006). Microbial availability and size fractionation of dissolved organic carbon after drought in an intermittent stream: Biogeochemical link across the stream-riparian interface [Article]. *Microbial Ecology*, 52(3), 501-512. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9112-2>
- Rosemond, A. D., Benstead, J. P., Bumpers, P. M., Gulis, V., Kominoski, J. S., Manning, D. W. P., . . . Wallace, J. B. (2015). Experimental nutrient additions accelerate terrestrial carbon loss from stream ecosystems [Article]. *Science*, 347(6226), 1142-1145. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1958>
- Sage, R. F. (2020). Global change biology: A primer [Review]. *Global Change Biology*, 26(1), 3-30. <https://doi.org/10.1111/gcb.14893>
- Scheffers, B. R., De Meester, L., Bridge, T. C. L., Hoffmann, A. A., Pandolfi, J. M., Corlett, R. T., . . . Watson, J. E. M. (2016). The broad footprint of climate change from genes to biomes to people [Review]. *Science*, 354(6313), 11, Article aaf7671. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7671>
- Schimel, J., Balser, T. C., & Wallenstein, M. (2007). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function [Article]. *Ecology*, 88(6), 1386-1394. <https://doi.org/10.1890/06-0219>
- Schlieff, J., & Mutz, M. (2007). Response of aquatic leaf associated microbial communities to elevated leachate DOC: A microcosm study [Article; Proceedings Paper]. *International Review of Hydrobiology*, 92(2), 146-155. <https://doi.org/10.1002/iroh.200510950>

- Schlieff, J., & Mutz, M. (2011). Leaf Decay Processes during and after a Supra-Seasonal Hydrological Drought in a Temperate Lowland Stream [Article]. *International Review of Hydrobiology*, 96(6), 633-655. <https://doi.org/10.1002/iroh.201111322>
- SMHI, S. M. a. H. I.-. (2016). *Europe Climate Change*. Retrieved 07/09 from
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems [Article; Proceedings Paper]. *Environmental Pollution*, 100(1-3), 179-196. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00091-3)
- Sridhar, K. R., & Bärlocher, F. (1997). Water chemistry and sporulation by aquatic hyphomycetes [Article]. *Mycological Research*, 101, 591-596. <https://doi.org/10.1017/s0953756296003024>
- Sridhar, K. R., & Bärlocher, F. (2000). Initial colonization, nutrient supply, and fungal activity on leaves decaying in streams [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1114-1119. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.1114-1119.2000>
- Stanley, E. H., & Boulton, A. J. (1995). HYPORHEIC PROCESSES DURING FLOODING AND DRYING IN A SONORAN DESERT STREAM .1. HYDROLOGIC AND CHEMICAL-DYNAMICS [Article]. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 134(1), 1-26.
- Suberkropp, K. (1992). Interactions with invertebrates. In F. Bärlocher (Ed.), *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes* (Vol. 94, pp. 118–134). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76855-2_6
- Suberkropp, K. (1998). Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter [Article]. *Mycological Research*, 102, 998-1002. <https://doi.org/10.1017/s0953756297005807>
- Suberkropp, K., & Chauvet, E. (1995). Regulation of Leaf Breakdown by Fungi in Streams: Influences of Water Chemistry [Article]. *Ecology*, 76(5), 1433-1445. <https://doi.org/10.2307/1938146>
- Suberkropp, K., Gulis, V., Rosemond, A. D., & Benstead, J. P. (2010). Ecosystem and physiological scales of microbial responses to nutrients in a detritus-based stream: Results of a 5-year continuous enrichment [Article]. *Limnology and Oceanography*, 55(1), 149-160. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.1.0149>
- Suberkropp, K., & Klug, M. J. (1980). THE MACERATION OF DECIDUOUS LEAF LITTER BY AQUATIC HYPHOMYCETES [Article]. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 58(9), 1025-1031. <https://doi.org/10.1139/b80-126>
- Sudheep, N. M., & Sridhar, K. R. (2012). Aquatic hyphomycetes in hyporheic freshwater habitats of southwest India [Article]. *Limnologica*, 42(2), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2012.02.001>
- Tant, C. J., Rosemond, A. D., & First, M. R. (2013). Stream nutrient enrichment has a greater effect on coarse than on fine benthic organic matter [Article]. *Freshwater Science*, 32(4), 1111-1121. <https://doi.org/10.1899/12-049.1>
- Taylor, B. R., & Barlocher, F. (1996). Variable effects of air-drying on leaching losses from tree leaf litter [Article]. *Hydrobiologia*, 325(3), 173-182. <https://doi.org/10.1007/bf00014982>
- Team, R. C. (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: R Foundation for Statistical Computing.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., . . . Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change [Article]. *Nature*, 427(6970), 145-148. <https://doi.org/10.1038/nature02121>
- Tilman, D., Lehman, C. L., & Thomson, K. T. (1997). Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1857-1861. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1857>

- Treton, C., Chauvet, E., & Charcosset, J. Y. (2004). Competitive interaction between two aquatic hyphomycete species and increase in leaf litter breakdown. *Microbial ecology*, 48(3), 439-446. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0195-8>
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 130–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/f80-017>
- von Schiller, D., Acuna, V., Graeber, D., Marti, E., Ribot, M., Sabater, S., . . . Tockner, K. (2011). Contraction, fragmentation and expansion dynamics determine nutrient availability in a Mediterranean forest stream [Article]. *Aquatic Sciences*, 73(4), 485-497. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0195-6>
- von Schiller, D., Bernal, S., Dahm, C. N., & Martí, E. (2017). Nutrient and Organic Matter Dynamics in Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. In T. Datry, N. Bonada, & A. Boulton (Eds.), *Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: Ecology and Management* (pp. 135-160). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803835-2.00006-1>
- Vorosmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., . . . Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity [Article]. *Nature*, 467(7315), 555-561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Waters, C. N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A. D., Poirier, C., Galuszka, A., . . . Wolfe, A. P. (2016). The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene [Review]. *Science*, 351(6269), 137-+. <https://doi.org/10.1126/science.aad2622>
- Webster, J. R., & Benfield, E. F. (1986). Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems [review-article]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 567-594. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003031>
- Wen, Y. R., Schoups, G., & van de Giesen, N. (2017). Organic pollution of rivers: Combined threats of urbanization, livestock farming and global climate change [Article]. *Scientific Reports*, 7, 9, Article 43289. <https://doi.org/10.1038/srep43289>
- Weyers, H. S., & Suberkropp, K. (1996). Fungal and bacterial production during the breakdown of yellow poplar leaves in 2 streams [Article]. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(4), 408-420. <https://doi.org/10.2307/1467795>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Widder, S., Besemer, K., Singer, G. A., Ceola, S., Bertuzzo, E., Quince, C., . . . Battin, T. J. (2014). Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12799-12804. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411723111>
- Woodward, G., Gessner, M. O., Giller, P. S., Gulis, V., Hladysz, S., Lecerf, A., . . . Chauvet, E. (2012). Continental-Scale Effects of Nutrient Pollution on Stream Ecosystem Functioning [Article]. *Science*, 336(6087), 1438-1440. <https://doi.org/10.1126/science.1219534>
- WWF, W. W. F. f. N.-. (2016). *Living Planet Report 2016: Risk and resilience in a new era*.
- WWF, W. W. F. f. N.-. (2018). *Living Planet Report 2018: Aiming higher*.
- Ylla, I., Sanpera-Calbet, I., Vázquez, E., Román, A. M., Muñoz, I., Butturini, A., & Sabater, S. (2010). Organic matter availability during pre- and post-drought periods in a Mediterranean stream [Article]. *Hydrobiologia*, 657(1), 217-232. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0193-z>
- Zhang, L., Jacob, D. J., Knipping, E. M., Kumar, N., Munger, J. W., Carouge, C. C., . . . Chen, D. (2012). Nitrogen deposition to the United States: distribution, sources, and processes [Article]. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12(10), 4539-4554. <https://doi.org/10.5194/acp-12-4539-2012>
- Zoppini, A., & Marxsen, J. (2010). Importance of Extracellular Enzymes for Biogeochemical Processes in Temporary River Sediments during Fluctuating Dry–Wet Conditions. In G.

Shukla & A. Varma (Eds.), *Soil Enzymology* (Vol. 22, pp. 103–117). Springer.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_6

Anexos

Anexo 1. Número médio de conídios de cada taxa de hifomicetos aquáticos na produção total de esporos na decomposição em folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

Espécies	Tratamentos									
	N1		N2		N3		N4		N5	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	3,80	3,54	-	-	5,01	3,70	4,73	4,60	11,76	7,39
<i>Anguillospora filiformis</i> Greath.	89,98	162,66	1770,95	210,45	42,33	206,58	101,70	139,80	673,25	864,90
<i>Articulospora tetracladia</i> Ingold	764,99	502,33	358,86	240,49	340,73	573,05	681,02	596,65	836,40	1293,94
<i>Clavatospora longibranchiata</i> (Ingold) Marvanová & Sv. Nilsson	-	-	-	-	-	-	4,86	-	85,70	14,83
<i>Dimorphospora foliicola</i> Tubaki	32,13	10,17	37,24	15,41	93,96	53,91	143,44	49,18	254,67	68,95
<i>Flagellospora curta</i> Webster	8,08	2,43	3,92	3,64	7,65	1,23	9,59	-	9,31	7,38
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	123,09	34,84	187,79	114,26	212,06	220,95	354,58	104,64	173,90	145,53
<i>Flagellospora penicillioides</i> Ingold	13,42	4,92	5,27	4,85	10,18	11,84	26,53	7,74	36,58	17,23
<i>Fontanospora fusiramosa</i> Marvanová, PJ Fisher & Descals	-	-	-	-	1,32	-	2,33	2,51	-	-
<i>Hydrocina chaetocladia</i> Scheuer	-	-	1,37	1,06	-	-	-	-	3,10	4,94
<i>Infundibura</i> sp.	-	-	5,46	3,17	-	-	-	-	-	-
<i>Lunulospora curvula</i> Ingold	-	-	-	-	2,64	2,55	9,52	12,35	8,78	22,15
<i>Sigmoid</i> 1 (50-74/ 1-2 µm)	62,55	20,92	55,18	46,93	151,48	212,76	218,13	74,08	153,83	113,31
<i>Sigmoid</i> 2 (44-94/ 1-3 µm)	41,79	7,56	25,50	41,07	79,60	29,77	27,07	12,35	100,96	41,92
<i>Sigmoid</i> 3 (80-85/ 1-2 µm)	35,08	13,55	14,69	9,54	25,04	19,00	16,80	10,46	48,36	19,71
<i>Sigmoid</i> 5 (80-88/ 2-3 µm)	-	-	-	11,66	25,60	27,49	66,46	258,25	425,89	204,65
<i>Sigmoid</i> 6 (20-30/ 1-2 µm)	-	-	2,38	-	3,96	3,79	-	-	-	-
<i>Tetrachaetum elegans</i> Ingold	2,59	1,29	2,75	1,21	-	-	2,54	-	6,21	7,38
<i>Tricladium attenuatum</i> SH Iqbal	4,86	1,25	1,19	1,21	2,53	2,63	4,94	-	2,58	-
<i>Tricladium splendens</i> Ingold	-	-	-	-	-	1,16	-	-	6,21	-
<i>Triscelophorus acuminatus</i> Nawawi	16,01	1,29	10,85	1,06	13,05	1,16	19,87	7,53	109,03	19,70
<i>Varicosporium elodeae</i> W Kegel	45,50	8,74	16,41	6,06	15,53	33,03	34,43	29,72	22,15	61,58

Anexo 2. Contribuição percentual de cada taxa de hifomicetos aquáticos na produção total de esporos na decomposição em folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I).

Espécies	Tratamentos									
	N1		N2		N3		N4		N5	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	0,31	0,46	-	-	0,48	0,26	0,27	0,35	0,40	0,25
<i>Anguillospora filiformis</i> Greath.	7,23	20,98	19,62	29,55	4,10	14,71	5,88	10,67	22,68	29,67
<i>Articulospora tetracladia</i> Ingold	61,50	64,77	39,57	33,77	32,99	40,80	39,40	45,55	28,17	44,38
<i>Clavatospora longibranchiata</i> (Ingold) Marvanová & Sv. Nilsson	-	-	-	-	-	-	0,28	-	2,89	0,51
<i>Dimorphospora foliicola</i> Tubaki	2,58	1,31	4,11	2,16	9,10	3,84	8,30	3,75	8,58	2,37
<i>Flagellospora curta</i> Webster	0,65	0,31	0,43	0,51	0,74	0,09	0,56	-	0,31	0,25
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	9,90	4,49	20,71	16,05	20,54	15,73	20,51	7,99	5,86	4,99
<i>Flagellospora penicillioides</i> Ingold	1,08	0,63	0,58	0,68	0,99	0,84	1,53	0,59	1,23	0,59
<i>Fontanospora fusiramosa</i> Marvanová, PJ Fisher & Descals	-	-	-	-	0,13	-	0,13	0,19	-	-
<i>Hydrocina chaetocladia</i> Scheuer	-	-	0,15	0,15	-	-	-	-	0,10	0,17
<i>Infundibura</i> sp.	-	-	0,60	0,45	-	-	-	-	-	-
<i>Lunulospora curvula</i> Ingold	-	-	-	-	0,26	0,18	0,55	0,94	0,30	0,76
<i>Sigmoid</i> 1 (50-74/1-2 µm)	5,03	2,70	6,09	6,59	14,67	15,15	12,62	5,66	5,18	3,89
<i>Sigmoid</i> 2 (44-94/1-3 µm)	3,36	0,97	2,81	5,77	7,71	2,12	1,57	0,94	3,40	1,44
<i>Sigmoid</i> 3 (80-85/1-2 µm)	2,82	1,75	1,62	1,34	2,42	1,35	0,97	0,80	1,63	0,68
<i>Sigmoid</i> 5 (80-88/2-3 µm)	-	-	-	1,64	2,48	1,96	3,84	19,72	14,35	7,02
<i>Sigmoid</i> 6 (20-30/1-2 µm)	-	-	0,26	-	0,38	0,27	-	-	-	-
<i>Tetrachaetum elegans</i> Ingold	0,21	0,17	0,30	0,17	-	-	0,15	-	0,21	0,25
<i>Tricladium attenuatum</i> SH Iqbal	0,39	0,16	0,13	0,17	0,24	0,19	0,29	-	0,09	-
<i>Tricladium splendens</i> Ingold	-	-	-	-	-	0,08	-	-	0,21	-
<i>Triscelophorus acuminatus</i> Nawawi	1,29	0,17	1,20	0,15	1,26	0,08	1,15	0,58	3,67	0,68
<i>Varicosporium elodeae</i> W Kegel	3,66	1,13	1,81	0,85	1,50	2,35	1,99	2,27	0,75	2,11

Anexo 3. Média e desvio padrão da perda de massa foliar, da taxa de esporulação, da produção de biomassa fúngica, da riqueza e dos dois índices de biodiversidade (índice de Shannon e equabilidade de Pielou) da decomposição em folhas de amieiro expostas a um gradiente de nutrientes (N1: 0,1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0065 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N2: 0,25 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0161 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N3: 0,5 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0323 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻; N4: 1 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,0645 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻ e N5: 10 mg L⁻¹ N - NO₃⁻ e 0,6452 mg L⁻¹ P - PO₄³⁻) e a dois regimes hidrológicos (Permanente - P e Intermitente - I). N=3.

	Perda de massa foliar	Esporulação fúngica	Biomassa fúngica	Riqueza	Índice de Shannon (H')	Equabilidade de Pielou (J')
N1P	45,05 ± 3,22	1243,87 ± 199,42	104,94 ± 7,50	12,67 ± 1,25	1,44 ± 0,20	0,57 ± 0,08
N1I	41,61 ± 2,24	776,68 ± 44,89	102,89 ± 4,84	10,33 ± 0,47	1,14 ± 0,09	0,49 ± 0,04
N2P	44,41 ± 3,61	908,01 ± 158,30	113,72 ± 11,10	12,33 ± 1,25	1,68 ± 0,09	0,67 ± 0,02
N2I	39,67 ± 6,41	712,06 ± 285,61	117,47 ± 27,16	12,33 ± 1,70	1,71 ± 0,07	0,69 ± 0,07
N3P	42,80 ± 2,11	1032,68 ± 221,53	104,75 ± 5,94	14,67 ± 1,70	1,94 ± 0,07	0,72 ± 0,01
N3I	42,32 ± 4,45	1404,60 ± 315,28	114,24 ± 9,38	13,67 ± 0,47	1,71 ± 0,05	0,66 ± 0,03
N4P	40,19 ± 2,09	1728,55 ± 257,23	116,78 ± 6,42	14,67 ± 1,25	1,76 ± 0,12	0,66 ± 0,03
N4I	42,12 ± 3,95	1309,86 ± 332,98	126,68 ± 19,95	11,67 ± 1,25	1,67 ± 0,20	0,68 ± 0,05
N5P	49,98 ± 4,35	2968,66 ± 836,22	159,03 ± 13,34	15,00 ± 1,63	2,06 ± 0,09	0,76 ± 0,01
N5I	41,29 ± 0,17	2915,48 ± 359,63	148,54 ± 23,93	15,33 ± 0,47	1,58 ± 0,12	0,58 ± 0,05