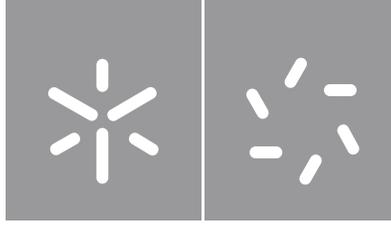


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Vânia Sofia Azevedo Sousa

Avaliação ecotoxicológica de misturas de fungicidas nas teias alimentares detritívoras em ecossistemas de água doce



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Vânia Sofia Azevedo Sousa

Avaliação ecotoxicológica de misturas de fungicidas nas teias alimentares detritívoras em ecossistemas de água doce

Tese de Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação do

Orientador: Professor Doutor Bruno Branco Castro

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal

Declaração

Nome: Vânia Sofia Azevedo Sousa

Endereço eletrónico: vania_asousa@hotmail.com

Cartão de cidadão: 14316643

Título da dissertação: Avaliação ecotoxicológica de misturas de fungicidas nas teias alimentares detritívoras em ecossistemas de água doce

Orientador: Professor Doutor Bruno Branco Castro

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal

Ano de conclusão: 2019

Designação do Mestrado: Mestrado em Ecologia

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

Universidade do Minho, 31 de janeiro de 2019



(Vânia Sofia Azevedo Sousa)

Agradecimentos

Aproveito esta oportunidade para agradecer a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, pois sem o vosso apoio, a mesma não seria possível.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, ao Prof. Doutor Bruno Castro por ter acreditado em mim e por toda a dedicação ao longo deste ano; à Prof. Doutora Cláudia Pascoal, por ter estado lá para me guiar nas alturas mais críticas do meu trabalho; aos dois agradeço por todo o apoio e pela partilha de conhecimento científico durante todo o meu trajeto. Em especial, agradeço à Prof. Doutora Fernanda Cássio por tão bem me ter recebido no seu grupo de investigação.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório de biodiversidade/ laboratório de ecologia que estiveram sempre dispostos a tirar-me dúvidas, sempre com a maior paciência, agradeço por toda a ajuda e por toda a animação. Agradeço também aos nossos mais recentes membros, por tornarem estes últimos meses mais suportáveis. A todos que foram passando pelo laboratório e “voluntariamente” me foram dando toda a ajuda essencial para eu conseguir terminar o meu trabalho prático, o meu muito obrigada.

Quero agradecer a todos que no departamento de biologia e no IB-S me ajudaram, em especial, ao sr. Luís e à Lídia por solucionarem sempre os nossos problemas. Agradeço também a todas as pessoas de outros laboratórios/pisos que me foram acolhendo e ajudando sempre que precisei, seja em almoços na cantina, seja a mexer no liofilizador ou a fechar o “-80”, foram todos fantásticos.

Agradeço do fundinho do meu coração às minhas Lab mates, à Flávia porque sem ela isto não era possível, obrigada por todas as vezes que me salvaste; à Cláudia não tenho como agradecer, obrigada por este ano, obrigada por todos os outros anos; à Mariana, a nossa mais pequena, mas também a nossa maior força da natureza, obrigada por toda a ajuda, obrigada pela banda sonora.

Agradeço aos Big 5 por aparecerem para ajudar, obrigada pelo 1º ano de mestrado, obrigada pelo apoio emocional.

Quero agradecer ao Pedro, por ser a minha boia de salvação, por estar lá sempre, por ser quem é...

Nunca vou conseguir agradecer o suficiente à minha mãe e ao meu irmão, por todo o esforço e paciência para me ajudarem a chegar aqui, muito obrigada.

Agradeço ao André, por todo o amor, paciência e apoio incondicional ...

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

Avaliação ecotoxicológica de misturas de fungicidas nas teias alimentares detritívoras em ecossistemas de água doce

Resumo

A decomposição da folhada é a principal fonte de nutrientes e energia em ecossistemas ribeirinhos, e é assegurada por microrganismos decompositores e invertebrados detritívoros. Entre os microrganismos, os hifomicetos aquáticos são um grupo de fungos que desempenha um papel fundamental nestas teias alimentares baseadas em detritos. Algumas pressões antropogênicas podem afetar este grupo de fungos e prejudicar a decomposição da folhada; incluem-se nestas pressões o uso intensivo de agroquímicos e fármacos fungicidas que têm como destino final os sistemas aquáticos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos fungicidas tebuconazol, azoxistrobina, clotrimazol e miclobutanil na comunidade de fungos associada à decomposição da folhada nos rios. Como estas substâncias co-ocorrem frequentemente nos sistemas aquáticos, pretendeu-se comparar os seus efeitos isoladamente e em misturas binárias. Numa primeira experiência, foram usados microcosmos laboratoriais para testar o impacto de concentrações crescentes (4,1 a 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$) de três fungicidas (tebuconazol, azoxistrobina e clotrimazol) em folhas de videira previamente colonizadas por microbiota local. Nenhum dos fungicidas teve efeitos na comunidade de fungos, na esporulação ou na decomposição foliar. Seguidamente, foi utilizada uma abordagem semelhante para testar o impacto de três fungicidas isoladamente (tebuconazol, azoxistrobina e miclobutanil; 15,6 a 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$) em folhas de amieiro previamente colonizadas por microbiota local. Em paralelo, avaliou-se a resposta da comunidade de fungos a misturas binárias de substâncias com o mesmo modo de ação (tebuconazol + miclobutanil) e com modos de ação diferentes (tebuconazol + azoxistrobina). Todos os fungicidas causaram reduções significativas na esporulação e na riqueza de espécies, mas a azoxistrobina reduziu também a decomposição foliar. No caso das misturas binárias com o mesmo modo de ação (tebuconazol + miclobutanil) não se verificou interação entre os fungicidas (modelo de adição da concentração), mas nas misturas de fungicidas com modos de ação diferentes (tebuconazol + azoxistrobina) ocorreu antagonismo entre os tóxicos. Os resultados sugerem que estes fungicidas sozinhos e em misturas podem ter efeitos negativos sobre os decompositores da folhada e comprometer funções chave do ecossistema.

Ecotoxicological evaluation of fungicide mixtures in detritivorous food webs in freshwater ecosystems

Abstract

Leaf litter decomposition is the main source of nutrients and energy for aquatic biota in stream ecosystems and is performed by decomposing microorganisms and detritivorous invertebrates. Among the microorganisms, aquatic hyphomycetes are a group of fungi that play a key role in these detritus-based food webs. Some anthropogenic pressures can affect this group of fungi and impair leaf litter decomposition; such pressures include the intensive use of agrochemical and pharmaceutical fungicides, which reach aquatic systems. The aim of this study was to evaluate the effects of the fungicides tebuconazol, azoxystrobin, clotrimazole and myclobutanil in the fungal community associated to the leaf litter decomposition in riverine ecosystems. Since these substances often co-occur in aquatic systems, the objective was to compare their effects in isolation and in binary mixtures. In a first experimental phase, laboratory microcosms were used to test the impact of increasing concentrations (4.1 to 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$) of three fungicides (tebuconazole, azoxystrobin and clotrimazole) on vine leaves previously colonized by local microbiota. None of the fungicides had effects on the fungal community, sporulation or decomposition. Then, using a similar approach, the impact of three fungicides (tebuconazole, azoxystrobin and myclobutanil; 15.6 to 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$) was separately tested on alder leaves previously colonized by local microbiota. In parallel, the response of the fungal community to binary mixtures of substances with the same mode of action (tebuconazole + myclobutanil) and with different modes of action (tebuconazole + azoxystrobin) was evaluated. All fungicides significantly decreased sporulation and species richness, and azoxystrobin also reduced leaf mass loss. No interaction between fungicides was observed in binary mixtures with the same mode of action (tebuconazole + myclobutanil) and a concentration addition model was fitted; in mixtures with different modes of action (tebuconazole + azoxystrobin), however, antagonism occurred among the toxicants. Results suggest that these fungicides alone and in mixtures may have negative effects on leaf litter decomposers, compromising ecosystem functions.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. A biodiversidade em sistemas de água doce	1
1.2. A decomposição em sistemas ribeirinhos	2
1.3. Pressões antropogénicas sobre os ecossistemas aquáticos.....	4
1.3.1. Contaminação por fungicidas.....	5
1.3.2. Toxicidade de misturas	9
1.4. Objetivos	11
2. Metodologia.....	13
2.1. Condicionamento das folhas	13
2.2. Microcosmos laboratoriais	15
2.3. Perda de massa foliar	18
2.4. Esporulação	19
2.5. Estrutura da comunidade.....	19
2.6. Análise estatística:	20
2.6.1. Efeitos individuais dos fungicidas (Fase 1 e 2).....	20
2.6.2. Efeitos das misturas de fungicidas.....	20
3. Resultados	23
3.1. Dados preliminares (fase experimental 1).....	23
3.2. Efeitos dos fungicidas isoladamente (fase experimental 2)	28

3.3.	Efeitos dos fungicidas em misturas (fase experimental 2).....	33
3.3.1.	Tebuconazol vs azoxistrobina	33
3.3.2.	Miclobutanil vs. Tebuconazol.....	35
4.	Discussão dos resultados.....	37
4.1.	Efeitos isolados dos fungicidas	37
4.1.	Efeitos dos fungicidas em misturas binárias	40
4.2.	Conclusão.....	42
5.	Bibliografia.....	43
6.	Anexos	52

Lista de figuras

Figura 1. Etapas da decomposição da folhada num rio: lixiviação, condicionamento por fungos e bactérias e fragmentação física e biótica.....	3
Figura 2. Alvos de agentes antifúngicos sistêmicos. Representação em função das famílias de fungicidas de acordo com o seu modo de ação.	7
Figura 3 Respostas de toxicidade a misturas binárias que ilustram a adição da concentração e três padrões de desvio desta referência.	11
Figura 4. Alguns detalhes do procedimento experimental: (A) Corte das folhas em discos de 12 mm. (B) Sacos devidamente selados contendo os discos de folhas. (C) Rio Oliveira, local de submersão dos sacos de folhas de forma a permitir a colonização por microrganismos nativos.	14
Figura 5. Representação das concentrações utilizadas no ensaio de misturas.....	17
Figura 6. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na perda de massa foliar e na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos.....	23
Figura 7. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na riqueza em espécies dos hifomicetos aquáticos e no índice de equitabilidade.....	25
Figura 8. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na composição relativa da comunidade dos hifomicetos aquáticos.	25
Figura 9. Gráficos de ordenação (PCA com transformação de Hellinger) de perfis da esporulação da comunidade de fungos exposta a concentrações crescentes de azoxistrobina, clotrimazol e tebuconazol.	27
Figura 10. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na perda de massa foliar e na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos.....	28
Figura 11. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na riqueza em <i>taxa</i> dos hifomicetos aquáticos e no índice de equitabilidade.	29
Figura 12. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na composição relativa das comunidades dos hifomicetos aquáticos.	30

Figura 13 Gráficos de ordenação (PCA com transformação de Hellinger) de perfis da esporulação da comunidade de fungos sob concentrações crescentes de azoxistrobina, miclobutanil e tebuconazol.	32
Figura 14 Representação de isobolas dos efeitos de interação do tebuconazol com a azoxistrobina na esporulação dos fungos.	34
Figura 15 Representação de isobolas dos efeitos de interação do tebuconazol com a azoxistrobina na riqueza em espécie dos fungos.	34
Figura 16 Representação de isobolas dos efeitos da mistura do tebuconazol com o miclobutanil na esporulação dos fungos.	35
Figura 17 Representação de isobolas dos efeitos da mistura do tebuconazol com o miclobutanil na riqueza em espécies de fungos.	36

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do rio Oliveira em outubro de 2017 e julho de 2018	15
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do lote de água mineral natural utilizada nos microcosmos (“Água do Fastio”).	16
Tabela 3 Propriedades dos fungicidas tebuconazol, clotrimazol, azoxistrobina e miclobutanil adquiridos à Sigma Aldrich.....	18
Tabela 4. Significância do modelo unifatorial usado para testar os efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na perda de massa dos discos de folhas, na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos, bem como na riqueza em taxa e na equitabilidade desta comunidade.	24
Tabela 5. Significância do modelo unifatorial usado para testar os efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na perda de massa foliar dos discos de folhas, na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos, bem como na riqueza em <i>taxa</i> e na equitabilidade desta comunidade.	28

1. Introdução

1.1. A biodiversidade em sistemas de água doce

Os ecossistemas de água doce são um dos principais provedores de serviços fundamentais ao bem-estar humano, tais como água potável, rega, produção de energia, reciclagem de nutrientes, suporte de outros ecossistemas, bem como valores culturais, recreativos, turismo e educação (Durance et al. 2016). Com o crescimento da população humana, a pressão antropogénica sobre os ecossistemas de água doce tem vindo a aumentar, ameaçando a biodiversidade aquática e os serviços providenciados por esses ecossistemas. Os ecossistemas de água doce fornecem habitat para 6% dos 1,8 milhões das espécies conhecidas (Balian et al. 2008). Os cinco fatores que mais têm ameaçado a biodiversidade em sistemas de água doce são a sobre-exploração dos recursos, a poluição, a alteração do caudal, a destruição e a degradação do habitat e, por último, a disseminação e a atividade das espécies invasoras (Dudgeon et al. 2006). Muitos estudos têm-se focado nas relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (Duffy 2009; Loreau 2010), e demonstrado um efeito positivo da diversidade biológica na produtividade e na estabilidade dos processos dos ecossistemas (Loreau et al. 2001). No caso dos sistemas aquáticos, processos como a decomposição foliar, a produção primária e a reciclagem de nutrientes estão diretamente dependentes da biodiversidade existente nesses ecossistemas (Loreau et al. 2001; Hooper et al. 2005).

O uso desmesurado dos sistemas aquáticos pela espécie humana tem trazido consequências para estes ecossistemas e os organismos que lá habitam, sendo que a poluição foi já considerada uma das maiores causas de perda de biodiversidade aquática (Schindler e Gessner 2009). Alguns estudos identificaram como principais fontes de poluição a descarga de efluentes domésticos e industriais não tratados, e a libertação de pesticidas devido à agricultura intensa (Hooper et al. 2005; Schindler e Gessner 2009). A importância que os ecossistemas dulçaquícolas têm para a espécie humana, nas suas múltiplas vertentes, torna crucial perceber os impactos que estes sistemas e a sua biodiversidade podem estar a sofrer devido à pressão das várias atividades humanas (Postel e Richter 2003); tal informação é vital para uma adequada conservação e restauro das funções e dos serviços dos ecossistemas de que o ser humano usufrui.

1.2. A decomposição em sistemas ribeirinhos

A decomposição dos detritos vegetais em ecossistemas ribeirinhos é um sistema modelo que tem sido usado como medida do funcionamento dos ecossistemas (Pascoal et al. 2001, 2003; Pascoal e Cássio 2004; Dunck et al. 2015; Pereira et al. 2016), para estabelecer as relações entre a biodiversidade e as funções do ecossistema (Duarte et al. 2006; Kominoski et al. 2010; Lecerf e Richardson 2010), bem como para avaliar os efeitos das pressões antropogênicas sobre essa relação (Pascoal et al. 2010; Lima-Fernandes et al. 2015).

A decomposição da matéria orgânica permite a reciclagem dos nutrientes, sendo um processo essencial em todos os ecossistemas de forma a regular a disponibilidade de elementos vitais para os organismos (Swift et al. 1979). Em sistemas ribeirinhos de baixa ordem, a matéria orgânica alóctone, como as folhas provenientes da vegetação ripária, é a fonte principal de carbono e energia devido à baixa produção primária nesses sistemas, consequência das baixas temperaturas, e da exposição solar reduzida (devido ao sombreamento por parte da vegetação) e dos baixos níveis de nutrientes inorgânicos (Benfield 1998; Allan e Castillo 2007). Deste modo, a decomposição da folhada ocupa um lugar de destaque enquanto processo ecológico, que é conduzido por fungos, bactérias e macroinvertebrados que convertem as folhas e outro material orgânico grosseiro (CPOM¹) em matéria orgânica fina (FPOM²), matéria orgânica dissolvida, e CO₂ (figura 1) (Gessner et al. 1999).

A decomposição da folhada ocorre em três fases distintas: a lixiviação, o condicionamento microbiano e o fracionamento biótico e abiótico (Allan e Castillo 2007). A lixiviação consiste na perda de componentes solúveis, como os açúcares mais simples, e também de fenóis e taninos, o que facilita a fase de condicionamento por bactérias e fungos (Canhoto e Graça 1996; Casas e Gessner 1999). Na fase de condicionamento, o contributo dos fungos, principalmente dos hifomicetos aquáticos, é essencial na fase inicial da decomposição, contribuindo maioritariamente para a

¹ CPOM - coarse particulate organic matter (matéria particulada orgânica grosseira)

² FPOM - fine particulate organic matter (matéria particulada orgânica fina)

degradação da folha através de processos mecânicos e enzimáticos que promovem a degradação dos compostos mais recalcitrantes (ex.: lenhina, celulose) difíceis de utilizar pelos organismos de níveis tróficos superiores (Benfield 1998; Gessner et al. 2007). A ação microbiana é facilitadora da colonização por macroinvertebrados, e os hifomicetos aquáticos desempenham um papel central para o aumento da palatabilidade da folha para larvas de insetos e invertebrados detritívoros (Graça 2001; Pascoal e Cássio 2004). Por último, a fragmentação abiótica da folhada decorre como resultado da ação física da água e a fragmentação biótica por ação dos macroinvertebrados detritívoros que se alimentam da folha colonizada (Gessner et al. 1999). De entre os macroinvertebrados detritívoros, os trituradores apresentam traços adaptativos (ex.: peças bucais capazes de recortar a folha condicionada) que lhes permitem transformar a matéria orgânica particulada grosseira (CPOM) em FPOM, desempenhando assim um importante papel na decomposição (Graça 2001). Muitas destas espécies de invertebrados são presas importantes na teia alimentar do rio (ex.: como componentes da dieta de peixes). No balanço final de todo o processo, é transferido carbono e energia da matéria vegetal para níveis tróficos superiores da teia trófica (Graça e Canhoto 2006).

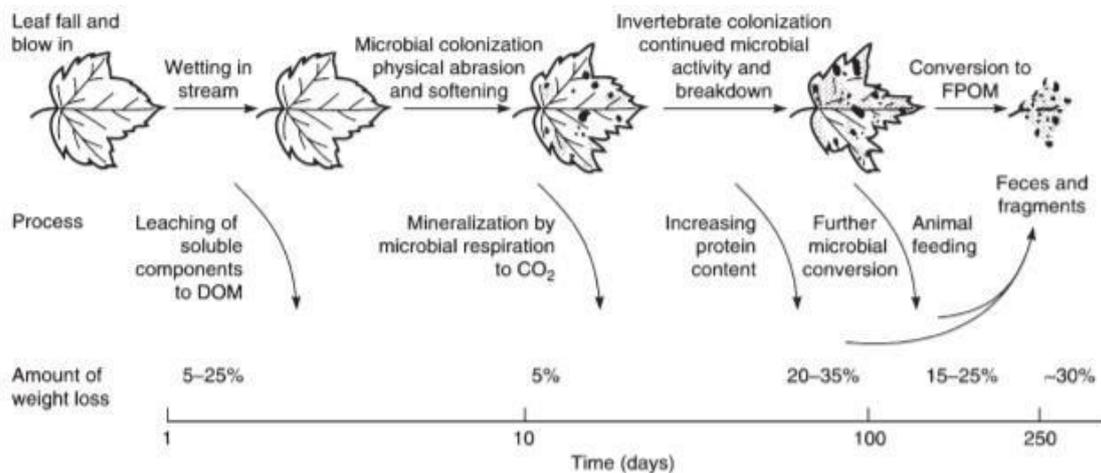


Figura 1. Etapas da decomposição da folhada num rio: lixiviação, condicionamento por fungos e bactérias e fragmentação física e biótica (Allan e Castillo 2007).

Os hifomicetos aquáticos são um grupo de fungos filamentosos, ubíquo e filogeneticamente heterogéneo, que apresentam traços morfológicos e fisiológicos resultantes da adaptação a ambientes lóticos e que justificam o seu sucesso como colonizadores e decompositores da folhada nos rios e ribeiros (Bärlocher 2005). Entre

estes traços, inclui-se altas taxas de produção e germinação de conídias (esporos assexuados) o que facilita a sua dispersão, a morfologia das conídias (tetrarradiada ou sigmoide) o que favorece o contacto com novos substratos, e a capacidade das conídias produzirem mucilagem nas extremidades dos seus braços, o que facilita ainda mais a adesão aos novos substratos que colonizam (Read et al. 1992). Adicionalmente, os hifomicetos aquáticos têm a capacidade de produzir uma vasta gama de enzimas extracelulares, capazes de degradar os polissacarídeos complexos constituintes da parede celular de plantas (Gessner et al. 2007).

1.3. Pressões antropogénicas sobre os ecossistemas aquáticos

As alterações globais e o crescimento populacional têm levado a um grande aumento na pressão para satisfazer as necessidades de alimento, água, energia e sequestro de carbono, o que tem levado à intensificação da agricultura, da captação de água e do uso de agroquímicos, situação que poderá agravar-se ainda mais no futuro próximo (Durance et al. 2016). A agricultura é uma das atividades humanas com maior impacto, pois implica a alteração do uso do solo, um uso pouco sustentável da água para rega, e a aplicação recorrente de produtos químicos para aumentar a produtividade. Em particular, o uso de fertilizantes e pesticidas pode causar a degradação do solo, da água e do ar, não havendo limitação do efeito ao local onde é aplicado, já que este se pode estender aos sistemas terrestres e aquáticos circundantes (Stoate et al. 2009). Estas substâncias atingem as águas circundantes e as águas superficiais sobretudo através da lixiviação e de eventos de escoamento (Arias-Estévez et al. 2008; McKnight et al. 2015).

Os pesticidas são químicos utilizados para prevenir, destruir ou mitigar qualquer tipo de praga e são catalogados de acordo com as espécies-alvo que pretendem atingir (inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas). O uso destes produtos é essencial para combater as pragas e as doenças na agricultura e para aumentar a qualidade e quantidade da produção agrícola (Cooper e Dobson 2007). Estes agroquímicos, uma vez nos sistemas aquáticos, podem ser tóxicos para organismos não-alvo, causando vários impactos negativos nas comunidades naturais e podem comprometer as funções dos ecossistemas (Stoate et al. 2009). Conforme as características particulares de cada substância, alguns destes compostos podem persistir no ambiente (Hanazato 2001).

Os organismos aquáticos são especialmente sensíveis aos pesticidas. Reconhecendo este facto, bem como a insustentabilidade da dependência excessiva de pesticidas na produção alimentar, têm sido feitos esforços legislativos importantes no sentido de proteger os ecossistemas aquáticos. A Diretiva 2009/128/CE, por exemplo, pretende regular atividades de distribuição, venda e aplicação de produtos fitofarmacêuticos (em que se englobam os pesticidas), assim como os procedimentos de monitorização, de forma a tornar o uso destes compostos mais sustentável (DGAV 2013). A sensibilização acerca de assuntos como a poluição e o uso de produtos fitofarmacêuticos é difícil, na medida em que Portugal tem uma população agrícola envelhecida, com um nível de instrução reduzido e com formação agrícola principalmente prática (DGAV 2013). Entre 2011 e 2014, vendeu-se um total de 12889,2 toneladas de pesticidas em Portugal, vendas essas dominadas por fungicidas (64%), seguidos de herbicidas (19%) e inseticidas e acaricidas (6%) (Eurostat 2015; INE 2016).

No norte de Portugal, as culturas agrícolas são de uma enorme importância, destacando-se o castanheiro (*Castanea sativa*), a oliveira (*Olea europaea*) e a videira (*Vitis vinifera*) (NICIF 2006). Destas três culturas preponderantes na região Norte, a vinha é aquela que apresenta maior dependência de esquemas de pulverização com pesticidas (a lista de pesticidas autorizados pela DGAV para a videira contempla 175 formulações com base em 106 substâncias ativas), particularmente fungicidas (131 das 175 formulações têm como finalidade o controlo de pragas fúngicas na vinha). Consequentemente, existe um excessivo uso de agroquímicos nas vinhas (Komárek et al. 2010). Em 2016, a área total de vinha em Portugal era de 190.467 hectares, e 41% desta área situa-se no Norte do país (I.V.V 2016). A videira está sujeita a diversas doenças causadas por fungos e organismos semelhantes a fungos (ex.: oomicetos) que levam à redução da produtividade e longevidade, causando grandes perdas económicas para a indústria vitivinícola (Armengol et al. 2011). Algumas das doenças mais importantes incluem o míldio (causado pelo fungo *Plasmopara viticola*), o oídio (causado pelo fungo *Uncinula necator*) ou a podridão cinzenta (causada pelo fungo *Botrytis cinerea*) (Thind et al. 2004; Neves 2008; Ulea et al. 2012).

1.3.1. Contaminação por fungicidas

Os fungicidas estão entre os compostos mais usados na agricultura, adicionalmente são também bastante utilizados como fármacos no tratamento de doenças fúngicas em

terapia humana e veterinária (Boxall 2004). Durante a fabricação, alguns resíduos podem ser descarregados em águas superficiais. Depois da administração, os antifúngicos farmacêuticos utilizados pelo Homem são absorvidos, metabolizados e excretados para os sistemas de efluentes domésticos, atingindo as estações de tratamento de águas residuais. A degradação incompleta durante o tratamento de águas residuais pode causar contaminação nos efluentes que são depois lançados nos cursos de água naturais (Hirsch et al. 1999).

A aplicação de fungicidas é, portanto, essencial tanto na agricultura, como no tratamento de doenças fúngicas enquanto fármaco, representando assim um risco para fungos não-alvo e podendo afetar as funções que estes desempenham, como a decomposição (Zubrod et al. 2015b). Os fungicidas são capazes de alterar a composição da comunidade microbiana, alterando assim a estrutura da rede trófica e limitando as funções do ecossistema (Rasmussen et al. 2012). Alguns trabalhos demonstraram que a presença de fungicidas em concentrações ambientalmente relevantes podem ter efeitos negativos nos processos ecológicos, na atividade microbiana e na biodiversidade aquática. Zubrod e colaboradores (2014) encontraram efeitos negativos da presença de cobre (substância ativa com múltiplos modos de ação) sobre espécies aquáticas, como *Gammarus fossarum*, um macroinvertebrado detritívoro e com um papel chave na decomposição da folhada. Um estudo com o fungicida tebuconazol demonstrou que este pode ser tóxico para os organismos aquáticos, e causar efeitos negativos nas populações de fitoplâncton e de plantas aquáticas, bem como efeitos a longo prazo no caso de intoxicação de peixes e zooplâncton (Kegley et al. 2014). Alguns estudos também sugerem que o tebuconazol altera os processos relacionados com a atividade fúngica como a decomposição da folhada, diminuindo a palatabilidade das folhas (Bundschuh et al. 2011) e impede a dispersão de doenças mediadas por fungos parasitas que ocorrem naturalmente (Cuco et al. 2017a). O fármaco fungicida clotrimazol em concentrações ambientalmente realísticas inibiu a atividade das demetilases em algas e, em concentrações mais elevadas, o crescimento da comunidade foi reduzido (Porsbring et al. 2009). Também a aplicação do fungicida carbendazima afetou a decomposição da matéria orgânica e alterou a composição da comunidade de invertebrados aquáticos (Cuppen et al. 2000).

Zubrod e colaboradores (2015a) consideram que o atual esquema de avaliação de risco pode não proteger adequadamente as comunidades de fungos que desempenham

um papel fundamental na decomposição em ecossistemas de risco de pesticidas, o que no caso particular dos fungicidas poderá significar não avaliar o efeito dos fungicidas em fungos não-alvo. Vários estudos concluem que a avaliação de risco do uso de fungicidas para organismos aquáticos deve ser efetuada ao nível trófico dos decompositores usando espécies de fungos selecionadas como organismos teste (Maltby et al. 2009; Ittner et al. 2018). Assim, os hifomicetes aquáticos que decompõem a folhada são de alta relevância e devem ser os organismos usados em estudos de avaliação de risco de fungicidas (Ittner et al. 2018).

Os fungicidas são um grupo específico de pesticidas que atacam os fungos inibindo o seu desenvolvimento ou causando a sua morte, sendo importante conhecer o seu mecanismo de ação. É comum classificar os fungicidas pelo modo de ação e alvo celular, que podem incluir a inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de biomoléculas (esteróis, aminoácidos), a interferência nas cadeias de transferência de elétrons e produção de energia, a inibição da divisão celular, ou atuar em múltiplos locais de ação (figura 2) (McGrath 2004; Maltby et al. 2009).

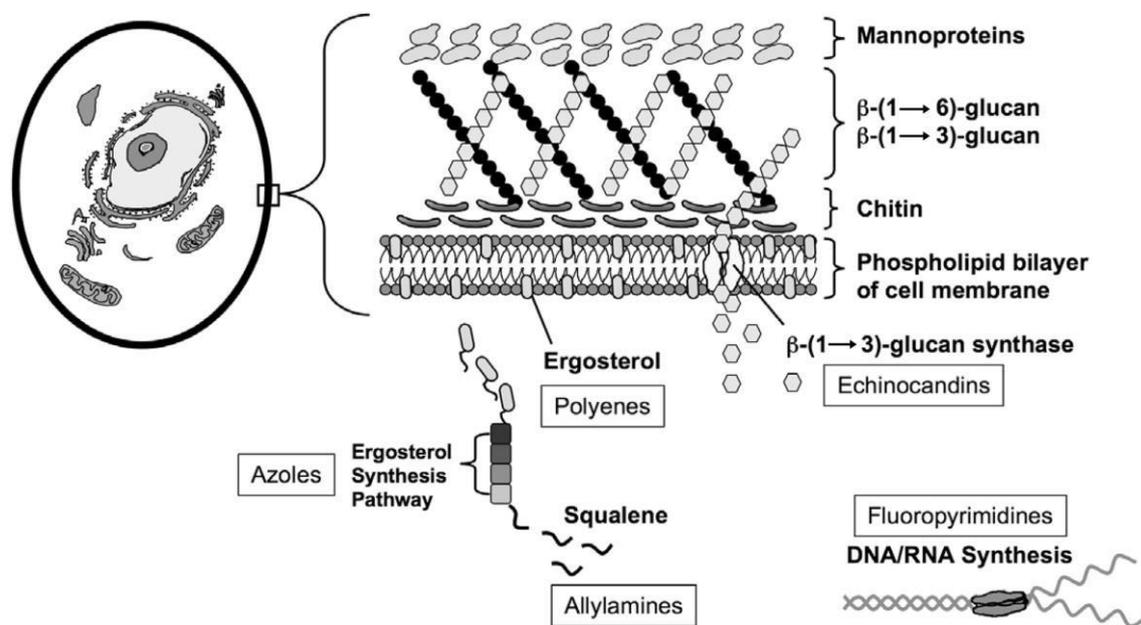


Figura 2. Alvos de agentes antifúngicos sistêmicos. Representação em função das famílias de fungicidas de acordo com o seu modo de ação (polienos, azoles, alilaminas, fluoropirimidinas e equinocandinas) (Dodds Ashley et al. 2006).

Entre os fungicidas mais usados encontram-se as substâncias que atuam na inibição da biossíntese de ergosterol, sendo os fungicidas azoles os mais usados (Barrett-Bee e

Dixon 1995). Este tipo de fungicidas tem a capacidade de dificultar a formação de esporos viáveis ou retardar a sua maturação (Fuchs e Drandarevski 1976). Os fungicidas azólicos atuam inibindo a lanosterol-14 α -desmetilase (Kahle et al. 2008), que impede a desmetilação do lanosterol em ergosterol, que é um componente essencial da membrana citoplasmática fúngica. Consequentemente, a redução da formação de ergosterol e a acumulação associada de esteróis 14 α -metil prejudicam a permeabilidade e a fluidez da membrana celular, interrompendo o crescimento dos fungos (Hof 2001). Muitos destes fungicidas são estáveis na fase aquosa, podendo ser continuamente libertados para ambientes aquáticos (Kahle et al. 2008).

Alguns exemplos de fungicidas azoles são o tebuconazol, que demonstrou ser tóxico para vários organismos aquáticos (ver exemplo acima), o miclobutanil e o fármaco clotrimazol. Os dois primeiros têm aparecido em amostras de águas superficiais na proximidade de culturas vitícolas (Bereswill et al. 2012). O tebuconazol tem sido regularmente detetado em cursos de água em concentrações que variam de 1 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kahle et al. 2008; Rasmussen et al. 2012), em eventos extremos de *runoff* pode ser detetado em concentrações de 175 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Elsaesser e Schulz 2008). O tempo de meia vida deste fungicida na água é de cerca de 28 dias (Kegley et al. 2014). O miclobutanil é regularmente detetado em cursos de água doce em concentrações inferiores a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Battaglin et al. 2011; Smalling e Orlando 2011; Bereswill et al. 2012). O fármaco clotrimazol é utilizado principalmente para o tratamento de infeções fúngicas dermatológicas e ginecológicas. São compradas anualmente no mercado europeu 25 toneladas de clotrimazol (OSPAR, 2013) e as descargas das estações de tratamento de águas residuais são a principal fonte de contaminação. Espera-se que o tempo de meia-vida ambiental seja superior a 60 dias e tem sido frequentemente encontrado em rios na Alemanha e no Reino Unido em concentrações entre 3 a 54 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Peschka et al. 2007).

Outro grande grupo de fungicidas usados na agricultura são as estrobilurinas, cuja atividade fungicida resulta da sua capacidade para inibir a respiração mitocondrial por ligação ao chamado local Qo (parte exterior da quinona) do citocromo b. O citocromo b é parte do complexo citocromo bc1, localizado na membrana mitocondrial interna de fungos e outros eucariontes. Quando uma destas substâncias inibidoras se liga a este local, bloqueia a transferência de eletrões entre o citocromo b e o citocromo c1, o que, por sua vez, interrompe o ciclo de energia dentro da célula, interrompendo a produção

de ATP (Bartlett et al. 2002). Há a preocupação generalizada de que a inibição de um processo tão conservado como a respiração celular cause problemas de seletividade, apresentando por isso um risco tóxico para vários organismos não-alvo. A estrobilurina azoxistrobina é comumente aplicada na vinha, sendo usada para muitas das doenças da videira (DGAV 2017). A azoxistrobina tem um tempo de meia-vida (hidrólise) na água de 31 dias, mas pode persistir até 6 meses no solo (A. Kalinin et al. 2002), e é tóxica para organismos de água doce, tanto para peixes como invertebrados (Adetutu et al. 2008). Encontraram-se também vestígios de azoxistrobina em produtos agrícolas para consumo humano, como é o caso das uvas (Lentza-Rizos et al. 2006).

1.3.2. Toxicidade de misturas

Os efeitos dos agentes de *stress* ambiental são normalmente testados individualmente, como é o caso dos ensaios usados para avaliar a toxicidade de pesticidas. No entanto, os organismos são frequentemente expostos a vários agentes de *stress* em simultâneo, que podem interagir produzindo impactos combinados na biodiversidade e no funcionamento dos ecossistemas (Folt et al. 1999; Vinebrooke et al. 2004).

Estudos com agentes de *stress* múltiplos são fundamentais para a compreensão de como os diferentes fatores podem interagir, e um cenário de *stress* múltiplo é ecologicamente mais relevante. Vários estudos demonstram que alguns tóxicos quando utilizados em conjunto têm um efeito mais pronunciado do que quando usados separadamente. É o caso da mistura do malatião (inseticida) com o procloraz (fungicida azólico) que é mais tóxica para aves do que o esperado tendo em conta a toxicidade dos compostos individuais (Walker et al. 1993), e da mistura de produtos químicos orgânicos industriais que em baixas concentrações se tornaram tóxicas para *Daphnia magna* (Deneer et al. 1988). Tendo em conta que as atividades agrícolas utilizam vários compostos químicos ao mesmo tempo, que têm como destino final os sistemas aquáticos, a avaliação das misturas de agroquímicos deve ser um requisito para a avaliação dos impactos das atividades agrícolas. No caso particular dos fungicidas, isto é particularmente importante porque é frequente a deteção de fungicidas em misturas complexas em rios (Bereswill et al. 2012). Contudo, a avaliação dos efeitos de fungicidas em misturas ainda é escassa, embora já haja evidência de que fungicidas em misturas podem ter efeitos adversos nas comunidades biológicas, mesmo quando a

concentração individual dos compostos é inferior à considerada tóxica (Castillo et al. 2006; Hayes et al. 2006; Relyea 2009). Zubrod e colaboradores (2014) testaram o efeito de misturas de fungicidas agrícolas na sobrevivência e no comportamento alimentar do invertebrado detritívoro *Gammarus fossarum*, concluindo que a função ecológica (decomposição da folhada) mediada por estes organismos foi claramente inibida em concentrações ambientalmente relevantes em águas superficiais em zonas de influência agrícola.

Diversos modelos estatísticos podem ser utilizados para estudar o efeito de agentes múltiplos de stress em organismos para avaliar se o efeito conjugado é semelhante, inferior ou superior ao efeito da soma ponderada dos efeitos individuais. O modelo de adição da concentração (CA) normalmente aplica-se a químicos que tenham o mesmo modo de ação (Loewe e Muischnek 1926) e assume que os efeitos de dois tóxicos são puramente aditivos, sendo o resultado final a soma dos seus efeitos individuais. O modelo de ação independente (IA) aplica-se a dois compostos com modos de ação diferentes e não interdependentes (Bliss 1939) e, por isso, assume que os seus efeitos individuais são independentes. Estes modelos (CA ou IA) são testados assumindo-se como hipótese nula que os tóxicos não interagem em mistura (figura 3) (Greco et al. 1992). No entanto, podem ocorrer interações tóxicocinéticas (absorção, biotransformação, eliminação) e tóxicodinâmicas (locais de ligação celulares) entre os tóxicos numa mistura, o que leva a efeitos de antagonismo (os efeitos observados na mistura são menores do que o estimado com base na soma dos efeitos individuais) ou de sinergismo (os efeitos observados na mistura são maiores do que o estimado com base na soma dos efeitos individuais) (Andersen e Dennison 2004). Por outras palavras, o modelo da ação independente (IA) testa se a probabilidade da resposta a um composto pode ser independente da probabilidade de resposta a outro composto, enquanto o modelo da adição da concentração (CA) testa se a toxicidade da mistura é a mesma que a toxicidade relativa dos compostos individuais. Mais recentemente, estes modelos foram adaptados de forma a abranger interações entre tóxicos para além do sinergismo ou do antagonismo. Jonker et al. (2005) propuseram que os desvios aos modelos de referência CA e IA podem seguir padrões mais complexos, como padrões de desvio dependentes da razão da dose (DR), ou padrões de desvio dependentes do nível da dose (DL) (figura 3). Isto sugere que sinergismo e antagonismo podem ocorrer numa mesma mistura, dependendo de qual é o tóxico dominante ou da concentração em que se encontram na mistura.

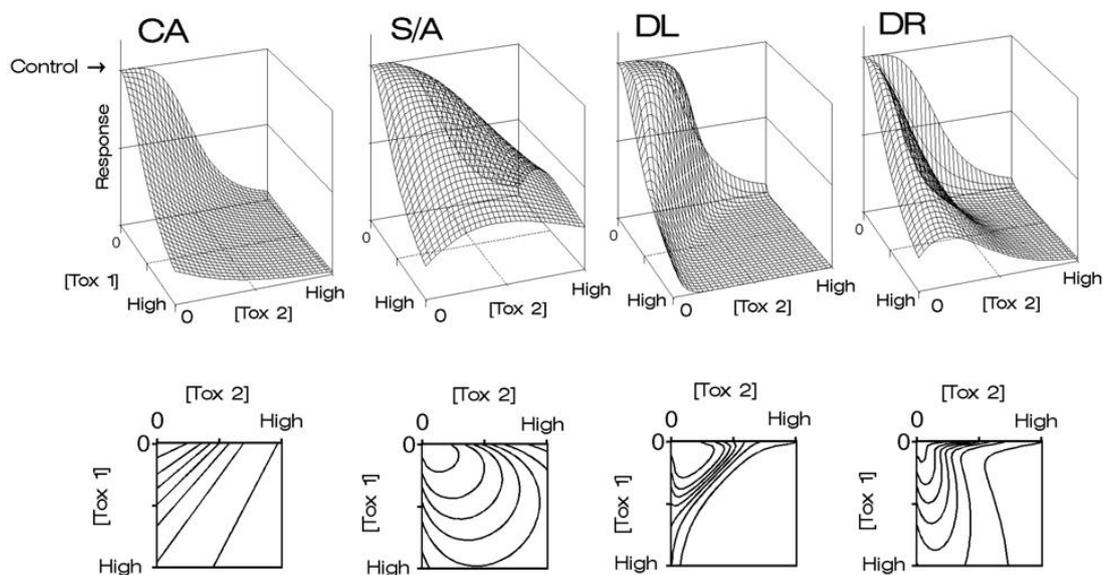


Figura 3 Respostas de toxicidade a misturas binárias que ilustram a adição da concentração e três padrões de desvio desta referência: nenhum desvio (CA), desvio antagônico (S/A), desvio dependente do nível de dose (DL) e desvio dependente da razão da dose (DR). Em cima: superfícies de resposta 3D. Em baixo: representação isobólica em 2D das superfícies de resposta (Jonker et al. 2005).

1.4. Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de fungicidas na comunidade microbiana de ecossistemas ribeirinhos, em particular nos fungos que intervêm no processo de decomposição da folhada. Como estas substâncias não ocorrem isoladamente nos sistemas aquáticos, pretendeu-se testar os seus efeitos isoladamente e em misturas binárias, tendo em conta o modo de ação de cada fungicida. Para tal, utilizou-se uma abordagem experimental recorrendo a microcosmos laboratoriais onde a comunidade microbiana foi exposta aos fungicidas selecionados. De forma a atingir este objetivo, realizaram-se duas fases experimentais, cujos objetivos específicos se apresentam abaixo.

Numa primeira fase experimental (Fase 1), avaliou-se o efeito individual dos fungicidas tebuconazol, clotrimazol, e azoxistrobina sobre a comunidade microbiana (taxa de esporulação e composição da comunidade) e sua atividade decompositora. Esta fase permitiu selecionar as concentrações mais relevantes e definir as condições do ensaio da segunda fase experimental.

Na segunda fase experimental (Fase 2), avaliou-se o efeito individual e em misturas binárias dos fungicidas tebuconazol, miclobutanil e azoxistrobina, tendo em conta os resultados obtidos na fase experimental anterior. As misturas binárias consistiram em combinar fungicidas com o mesmo modo de ação (tebuconazol + miclobutanil) ou com modos de ação diferentes (tebuconazol + azoxistrobina). Pretendeu-se identificar desvios aos modelos da ação independente (IA) ou da adição da concentração (CA) com base na comparação dos efeitos dos fungicidas isolados vs. em misturas binárias na comunidade de fungos (taxa de esporulação e riqueza em taxa).

Tendo em conta a revisão bibliográfica efetuada, espera-se um efeito negativo direto dos fungicidas na comunidade microbiana aquática e, conseqüentemente, uma diminuição na decomposição foliar.

2. Metodologia

A prossecução dos objetivos do trabalho envolveu duas fases sequenciais (Fase 1 e Fase 2) que diferiram no material biológico usado, na duração da experiência e nas substâncias testadas. Abaixo descrevem-se as diferenças entre as fases experimentais e os procedimentos comuns a ambas as fases.

2.1. Condicionamento das folhas

Na primeira fase experimental, utilizaram-se folhas de videira (*Vitis vinifera* L.) recolhidas no outono de 2006 e 2007 (imediatamente antes da abscisão) e secas à temperatura ambiente. As folhas foram lixiviadas em água desionizada durante 2 horas e cortadas em discos de 12 mm de diâmetro (figura 4-A), que foram divididos em 112 conjuntos de 80 discos e colocados em 112 sacos de malha fina (tamanho de poro de 0,5 mm) de forma a promover a colonização por microrganismos decompositores e evitar a entrada de invertebrados detritívoros (figura 4-B). Os discos de folhas cortados foram imersos num ecossistema natural, em outubro de 2017, durante 7 dias para concluir a lixiviação dos compostos solúveis e permitir a colonização por uma comunidade nativa de microrganismos (condicionamento).

Na segunda fase experimental, foram utilizadas folhas de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) – recolhidas no outono de 2017 imediatamente antes da abscisão e secas à temperatura ambiente. A troca do material biológico da primeira para a segunda fase deveu-se à rápida decomposição das folhas de videira durante a experiência, levando à escolha de um tipo de folhas com uma decomposição mais lenta (ver resultados – Secção 5.1). As folhas de amieiro foram lixiviadas e cortadas usando o procedimento descrito acima (figura 4-A). Foram colocados conjuntos de 70 discos em 131 sacos de malha fina (tamanho de poro de 0,5 mm; figura 4-B). Os discos de folhas cortados foram imersos num ecossistema natural, em julho de 2018, durante 13 dias para permitir a colonização microbiana.



Figura 4. Alguns detalhes do procedimento experimental: (A) Corte das folhas em discos de 12 mm. (B) Sacos devidamente selados contendo os discos de folhas. (C) Rio Oliveira, local de submersão dos sacos de folhas de forma a permitir a colonização por microrganismos nativos.

O local escolhido para a colonização por microrganismos nativos em ambas as fases foi o rio Oliveira ($41^{\circ}35'11.3''\text{N } 8^{\circ}13'31.5''\text{W}$) (figura 4-C), que se caracteriza por ser um rio permanente com impacto humano reduzido e sem fontes de contaminação detetadas (Pereira et al. 2016). A zona do rio escolhida tem como vegetação arbórea predominante o amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn), o carvalho (*Quercus robur* L.), castanheiro (*Castanea sativa* Mill), e terrenos na área adjacente cultivados com *Vitis vinifera* L.. O substrato era composto essencialmente por areia e seixos, sendo que a profundidade não excedia 1 metro. Aquando da imersão dos sacos, as propriedades físico-químicas da água do rio foram analisadas *in situ* (temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade), com recurso a uma sonda multiparamétrica (Multiline F/set 3 no. 400327, WTW). Foi também recolhida água do rio para a análise das seguintes variáveis em laboratório: nitratos (HACH kit, método de redução de cádmio), nitritos (HACH kit, método de diazotização), fosfatos (HACH kit, método do ácido ascórbico) e

amónia (HACH kit, método do salicilato), usando o fotómetro HACH DR/2000 (HACH, Loveland, CO). Na tabela 1 encontram-se os valores físico-químicos quantificados no rio Oliveira à data da imersão dos discos no local, em ambas as fases experimentais.

Para estimar a massa inicial (m_i) dos discos de folhas e posteriormente calcular a perda de massa foliar (ver secção 4.3), um conjunto de 4 (Fase 1) ou 3 (Fase 2) sacos foi recolhido 15 minutos depois da imersão.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do rio Oliveira em outubro de 2017 (fase 1) e julho de 2018 (fase 2)

Variável	Valor registado (Fase 1)	Valor registado (Fase 2)
Temperatura (°C)	12	13
pH	6,5	6,6
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	38	33
Oxigénio dissolvido (mg L^{-1})	6,9	6,9
NH_3 (mg N L^{-1})	0,3	<0.01
NO_3^- (mg N L^{-1})	0,22	0,22
PO_4^{3-} (mg P L^{-1})	0,09	0,19
NO_2^- (mg N L^{-1})	0,006	0,008

2.2. Microcosmos laboratoriais

Os sacos de folhas colonizadas foram retirados do rio e levados para o laboratório. Os discos de cada saco foram lavados com água desionizada e colocados em frascos Erlenmeyer de polipropileno estéreis de 250 mL, com 90 mL (Fase 1) ou 100 mL (Fase 2) de água mineral natural, cujas propriedades físico-químicas se apresentam na tabela 2. A estes microcosmos adicionaram-se concentrações crescentes de cada um dos fungicidas, como indicado abaixo. Os microcosmos foram colocados sob agitação a 140 rpm num agitador orbital Infors HT Orbitron (Infors HT, Suíça) a 16 °C, com fotoperíodo de 12 h escuridão e 12 h luz, durante todo o ensaio.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do lote de água mineral natural utilizada nos microcosmos (“Água do Fastio”).

Variável	Valor (Média ± SD)
Resíduo seco (a 180°C) (mg L ⁻¹)	34,0 ± 4
Sílica (mg L ⁻¹)	9,6 ± 2
pH (a 18°C)	6,0
HCO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	8,0 ± 0,8
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	4,2 ± 0,4
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	1,0 ± 0,2
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	4,1 ± 0,4
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	1,3 ± 0,3
K ⁺ (mg L ⁻¹)	0,6 ± 0,1

Na Fase 1, utilizou-se os fungicidas tebuconazol, clotrimazol ou azoxistrobina nas seguintes concentrações: 4,1; 10,4; 25,6; 64,0; 160; 400; 1000; 2500 µg L⁻¹. Estas concentrações foram escolhidas de forma a englobar as encontradas no ambiente e para posteriormente definir as concentrações a utilizar na segunda fase experimental.

Na Fase 2, os microcosmos foram deixados durante 2 dias em agitação a 140 rpm num agitador orbital Infors HT Orbitron (Infors HT, Suíça) a 16 °C, com fotoperíodo de 12 h em escuridão e 12 h de luz, de forma a permitir a aclimação dos microrganismos presentes nos discos. Após este período, adicionaram-se aos microcosmos concentrações crescentes de cada um dos fungicidas tebuconazol, miclobutanil e azoxistrobina (15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 µg L⁻¹) isoladamente ou em misturas binárias (azoxistrobina + tebuconazol ou miclobutanil + tebuconazol). Houve a necessidade de substituir o fármaco clotrimazol pelo agroquímico miclobutanil, pela baixa solubilidade do primeiro. As concentrações escolhidas pretenderam aumentar o espectro de concentrações usadas na primeira fase. As misturas de fungicidas foram escolhidas de forma a explorarem as combinações possíveis tendo em conta os valores de concentração ambientais mais relevantes, ou seja, combinações de concentrações mais baixas (figura 5).

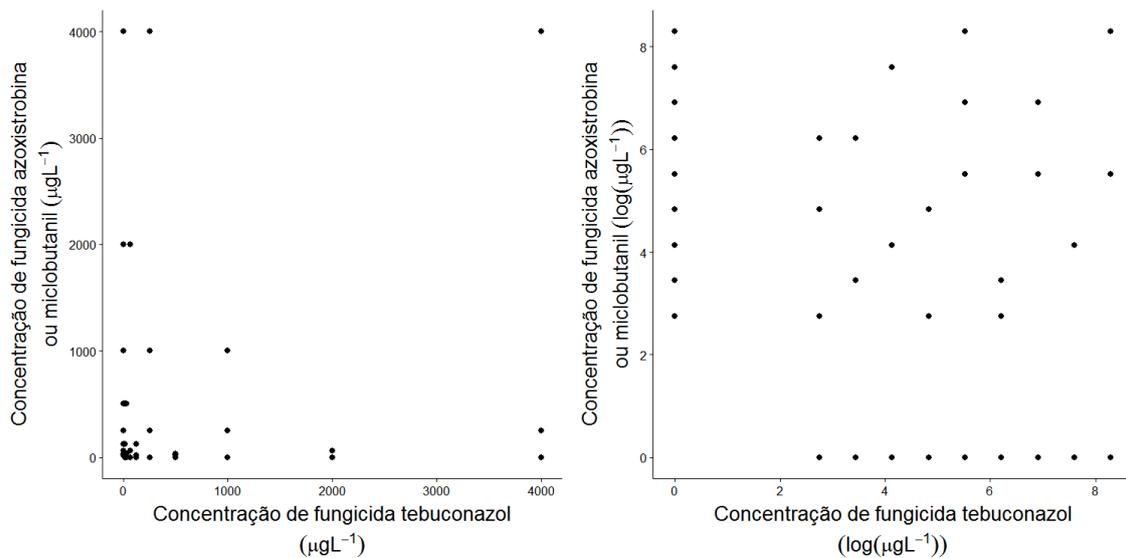


Figura 5. Representação das concentrações utilizadas no ensaio de misturas (fase 2) em escala real (esquerda) e em escala logarítmica (à direita; opção usada para melhorar a visualização das combinações binárias).

As quatro substâncias fungicidas (tabela 3) foram adquiridas à empresa Sigma Aldrich (Munique, Alemanha). Embora os fungicidas utilizados não apresentassem limitações de solubilidade nas gamas de valores testados, houve a necessidade de utilizar a acetona como solvente de forma a preparar soluções *stock* mais concentradas. Estas soluções foram então adicionadas a cada um dos microcosmos com uma micropipeta, garantido uma concentração final de acetona de 0,005% v/v na fase 1 e 0,01% v/v na fase 2 em todos os microcosmos. Por este motivo, foram utilizados dois controlos negativos, um sem e um com acetona. Para os microcosmos com apenas um fungicida (efeito isolado – fase 1 e 2) foram utilizadas 4 réplicas (fase 1) ou 3 réplicas (fase 2). Nos microcosmos com misturas binárias (fase 2) não foram utilizadas réplicas por motivos logísticos.

Tabela 3 Propriedades dos fungicidas tebuconazol, clotrimazol, azoxistrobina e miclobutanil adquiridos à Sigma Aldrich.

Nome do composto	Nº CAS	Fórmula molecular	Massa molar	Solubilidade em água
Tebuconazol	107534-96-3	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,82	36 mg L ⁻¹
Clotrimazol	23593-75-1	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂	344,84	29480 mg L ⁻¹
Azoxistrobina	131860-33-8	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,39	6 mg L ⁻¹
Miclobutanil	88671-89-0	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288,78	142 mg L ⁻¹

As soluções de cada microcosmo foram mudadas a cada 5 dias (fase 1) ou 7 dias (fase 2). Em cada uma das mudanças, foram recolhidos 40 mL de cada solução para garrafas plástico para posteriormente avaliar a comunidade fúngica. As soluções de cada unidade experimental foram sendo adicionadas sempre na mesma garrafa de plástico, constituindo uma amostra composta integrando os todos os tempos de recolha das suspensões de esporos (i.e., as diferentes mudanças de meio). A experiência foi conduzida até cerca de 50% de decomposição ser observada nos microcosmos do controlo. Na Fase 1 a experiência decorreu ao longo de 15 dias e na fase 2 ao longo de 23 dias. No fim da experiência, os discos de folhas foram armazenados a -20°C de forma a posteriormente avaliar a perda de massa foliar.

2.3. Perda de massa foliar

Os discos de cada microcosmo no final da experiência (ver secção 4.2) e os discos destinados a determinar a massa foliar inicial (ver secção 4.1) foram liofilizados (Liofilizador Christ Alpha 2-4 LD Plus, Alemanha) durante 48 h e pesados, com uma aproximação até 0,00001 g, para quantificar a massa foliar seca. A perda de massa foliar foi calculada segundo:

$$\%pmf = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100,$$

em que m_f é a massa foliar seca restante no final da experiência e m_i é a massa foliar seca inicial.

2.4. Esporulação

As amostras de cada microcosmo foram preservadas com formol (conc. final: 2% v/v) e Triton X-100 a 15% (conc. final: 0,1% v/v), de forma a impedir a germinação dos esporos e evitar a aderência destes às paredes das garrafas de plástico.

Para efetuar a identificação e contagem dos esporos (baseada na morfologia das conídias), um volume apropriado de cada suspensão de esporos foi filtrado através de uma membrana (Millipore 0,45 µm de tamanho de poro), e os esporos retidos na membrana foram corados com uma solução de azul de algodão em ácido láctico (concentração final = 0,05 %) (Gessner 2003; Bärlocher 2005). A identificação e contagem dos esporos foi efetuada ao microscópio ótico (ampliação 400x, Leica Biomed, Heerbrugg, Suíça), com recurso a literatura específica (Marvanová e Descals 1987; Gulis 2005). A taxa de esporulação foi estimada com base na fórmula:

$$\text{Taxa de esporulação} = \frac{n^{\circ} \text{ total de esporos}}{m_f} / \Delta t ,$$

onde m_f é a massa foliar seca final, e Δt o intervalo de tempo decorrido. Para efeitos de cálculo, considerou-se que o período em que ocorreu esporulação (Δt) foi de 15 (Fase 1) ou 23 dias (Fase 2).

2.5. Estrutura da comunidade

A identificação do tipo de esporos (baseada na morfologia das conídias) durante a contagem permitiu a análise da estrutura da comunidade. Foram obtidas listas dos *taxa* presentes para cada unidade experimental, bem como a respetiva abundância (nº total de *conidias* produzido), resultando numa matriz multivariável com a composição da comunidade. A riqueza (S) foi contabilizada como o número total de *taxa* e a uniformidade da distribuição de abundâncias dos *taxa* foi expressa pela equitabilidade de Pielou (J'):

$$J' = \frac{H'}{H_{max'}}$$

em que H' é o Índice de Shannon-Wiener e $H_{max'} = \log S$ (Legendre & Legendre 1998).

2.6. Análise estatística:

2.6.1. Efeitos individuais dos fungicidas (Fase 1 e 2)

De forma a determinar se cada um dos fungicidas afetou significativamente a taxa de esporulação, a perda de massa foliar, a riqueza em espécies e a equitabilidade foram ajustados modelos lineares com um preditor categórico (concentração de fungicida) aos dados. O ajuste dos modelos foi confirmado com base na análise gráfica de resíduos, que confirmou o modelo linear (vulgo ANOVA) como o modelo com melhor ajuste. Com base no modelo unifatorial ajustado, foi aplicado um contraste entre o controlo com e sem acetona, que revelou não haver diferença entre estes dois tratamentos na grande maioria das análises (anexo 1). Deste modo, ajustou-se um novo modelo linear reunindo os dois controlos num único grupo (sempre que estes não diferiam estatisticamente). Foi usado um teste de Dunnett para verificar quais os tratamentos (concentrações de fungicida) eram significativamente diferentes deste controlo agregado (Zar 1996).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para ordenar as unidades experimentais de acordo com a composição da comunidade fúngica (com base nas contagens de esporos). Antes de efetuar a análise, foi realizada uma transformação de Hellinger para melhorar o ajuste dos dados de abundância das espécies, reduzindo a importância das abundâncias mais elevadas e menorizando o problema dos duplos zeros (Gallagher e Legendre 2001).

Todas as análises até aqui mencionadas foram efetuadas no software R, versão 3.4.4 (R Core Team, 2018), usando a interface IDE R Studio versão 1.1.442 (R Studio Team, 2016).

2.6.2. Efeitos das misturas de fungicidas

De forma a testar a toxicidade das misturas foi utilizada uma adaptação do modelo MIXTOX (Jonker et al. 2005), que permite ajustar os dados aos modelos de referência. No caso da mistura com os fungicidas com o mesmo modo de ação (Tebuconazol vs Miclobutanil), o modelo de referência usado foi o CA (adição da concentração), ao passo que o modelo de referência IA (ação independente) foi usado como referência para a mistura com os fungicidas com modos de ação diferentes (Tebuconazol vs Azoxistrobina). Em ambos os casos, foi assumido como hipótese nula que não há

diferenças entre a toxicidade observada nas misturas e a toxicidade esperada a partir da toxicidade dos tóxicos individuais. O modelo MIXTOX permite calcular os possíveis desvios aos modelos de referência, calculando se os dados são melhor explicados por algum dos modelos alternativos testados (ver Introdução – Figura 3). Na prática, isto envolveu testar o modelo de referência (CA ou IA) com o modelo S/A (sinergismo ou antagonismo) com um teste de χ^2 (Jonker et al. 2005) e, posteriormente, com os modelos mais complexos (modelos dependentes da razão da dose – DR – e do nível da dose – DL). Só foram escolhidos os modelos mais complexos quando a adição de parâmetros extra melhorou significativamente o ajuste do modelo mais simples. Para testar a interação entre os tóxicos, foram estimados dois parâmetros (a e b) que nos dão informações acerca da possível interação entre os dois tóxicos, e a ser confirmada essa interação, os valores desses parâmetros revelam informação acerca do tipo de interação ocorrida (Anexo 2). Para apoiar os dados obtidos no modelo MIXTOX, foram construídos isobogramas da contribuição de cada tóxico na mistura.

As análises do efeito das misturas foram efetuadas no software Excel versão 1812, utilizando a função “MixToxFUNCTIONS.xla”, e o programa Statistica, versão 13 (TIBCO Software Inc. (2018)).

3. Resultados

3.1. Dados preliminares (fase experimental 1)

Nenhum dos fungicidas selecionados afetou a perda de massa foliar (Figura 6; Tabela 4). Verificou-se uma elevada variabilidade destes dados, confirmada visualmente pela heterogeneidade da extensão da decomposição entre discos de folhas dentro da mesma unidade experimental e entre unidades experimentais. A taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos não foi significativamente afetada pela azoxistrobina, mas foi significativamente estimulada pelo clotrimazol e pelo tebuconazol (Figura 6, tabela 4). No caso do clotrimazol, esta estimulação foi pontual, na concentração 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $P = 0,0306$), sem aparente relação dose-resposta. O tebuconazol estimulou a esporulação apenas nas concentrações mais baixas e intermédias (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$), regressando a valores próximos dos controlos nas concentrações mais altas de fungicida (Figura 6, Tabela 4).

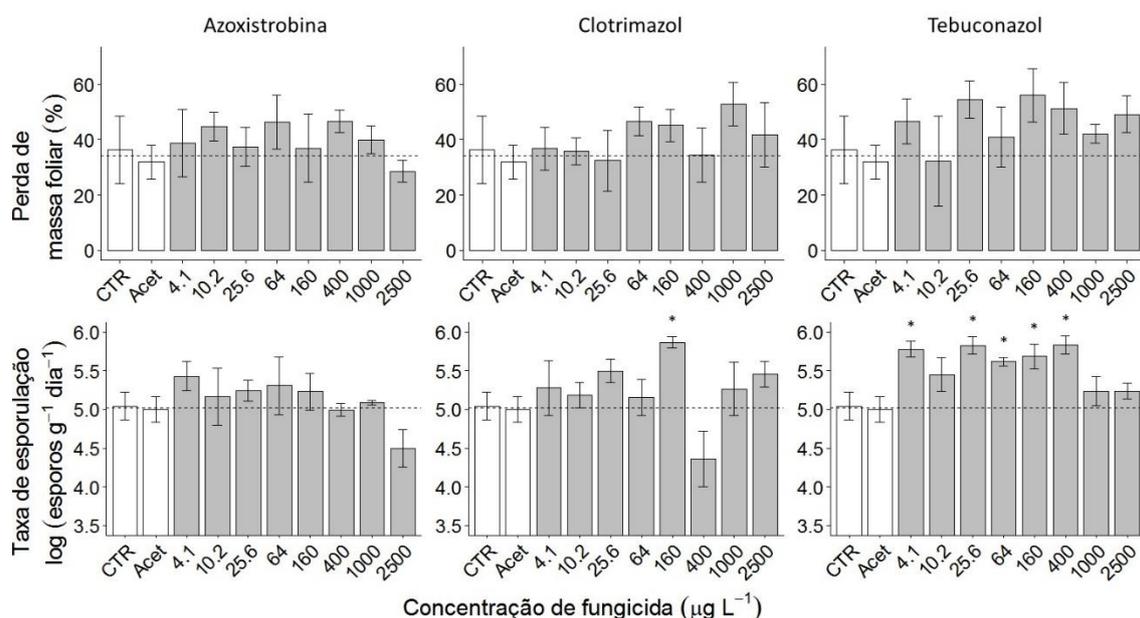


Figura 6. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na perda de massa foliar e na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos (em baixo). São apresentados os valores médios (barra vertical) e o respetivo erro padrão (barras de erro), bem como o valor médio agregado dos dois controlos (CTR + Acetona, linha a tracejado). O asterisco representa diferenças significativas relativamente ao controlo agregado (teste de Dunnett).

Tabela 4. Significância do modelo unifatorial usado para testar os efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na perda de massa dos discos de folhas, na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos, bem como na riqueza em taxa e na equitabilidade desta comunidade.

Variável de resposta	Azoxistrobina	Clotrimazol	Tebuconazol
Perda de massa foliar	$F_{8,31} = 0,557; P = 0,804$	$F_{8,31} = 0,73; P = 0,664$	$F_{8,31} = 0,966; P = 0,486$
Taxa de esporulação	$F_{8,31} = 1,50; P = 0,20$	$F_{8,30} = 3,43; P = 0,006$	$F_{8,31} = 5,70; P = 0,0001$
Riqueza	$F_{8,31} = 1,06; P = 0,415$	$F_{8,30} = 2,21; P = 0,06$	$F_{8,31} = 5,26; P = 0,00033$
Equitabilidade	$F_{8,31} = 2,10; P = 0,0671$	$F_{8,30} = 2,71; P = 0,02$	$F_{8,31} = 0,682; P = 0,704$

A riqueza da comunidade dos hifomicetos aquáticos foi significativamente afetada pelo tebuconazol (figura 7, tabela 4), tendo havido um aumento significativo na concentração de $4,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $P = 0,0233$). Adicionalmente, tanto na azoxistrobina como no tebuconazol verificou-se reduções subtis da riqueza nas concentrações mais elevadas, mas estas não foram significativas. O índice de equitabilidade foi significativamente afetado pelo clotrimazol (figura 7, tabela 4), verificado num decréscimo significativo na concentração de $10,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $P = 0,0386$). Embora a equitabilidade tenha sofrido uma redução em algumas concentrações de azoxistrobina, não se verificaram efeitos significativos para este composto nem para o tebuconazol. Não foram observadas alterações perceptíveis na composição da comunidade (figura 8).

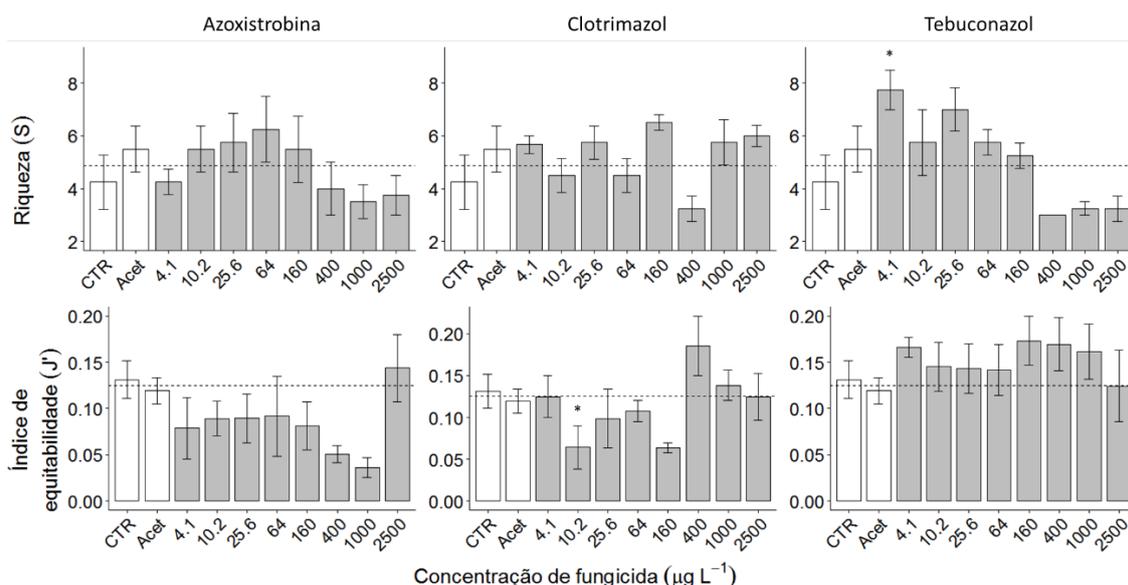


Figura 7. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na riqueza em espécies dos hifomicetos aquáticos e no índice de equitabilidade. São apresentados os valores médios (barra vertical) e o respetivo erro padrão (barras de erro), bem como o valor médio agregado dos dois controlos (CTR + Acetona, linha a tracejado). O asterisco representa diferenças significativas relativamente ao controlo agregado (teste de Dunnett).

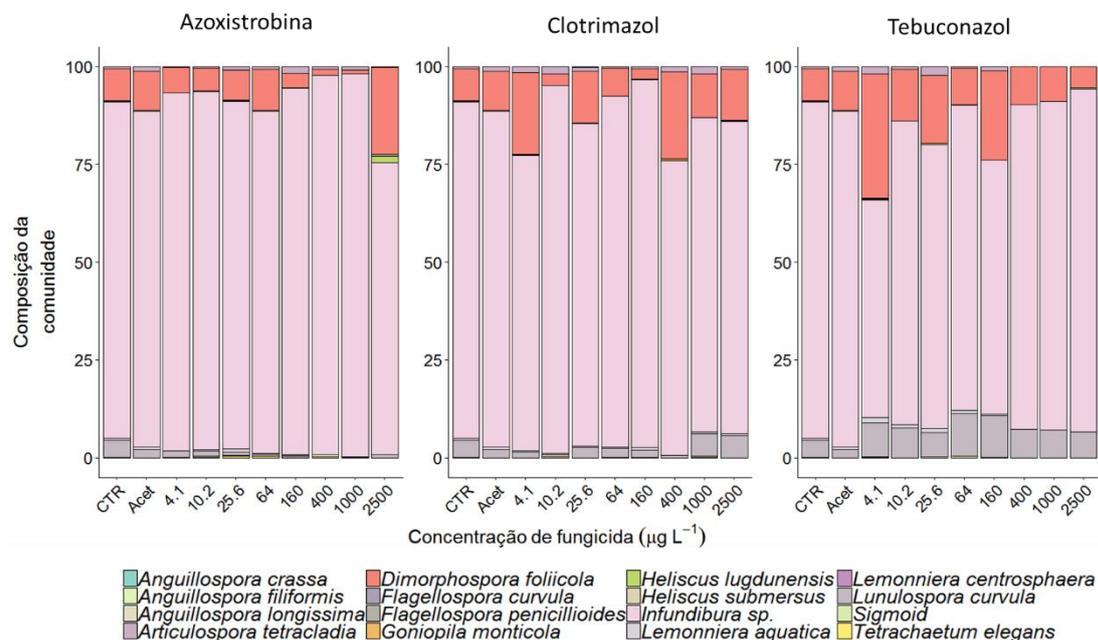


Figura 8. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol ou tebuconazol na composição relativa da comunidade dos hifomicetos aquáticos (contribuição percentual dos *taxa* mais representados). A percentagem relativa dos *taxa* foi calculada no agregado das quatro réplicas.

A ordenação das componentes principais (PCA) das oito concentrações de azoxistrobina e dos controlos, segundo os perfis de esporulação dos fungos aquáticos

(figura 9), mostraram que os eixos 1 e 2 explicaram 66% e 14% da variância total, respetivamente. Os gráficos de ordenação mostram que a separação das unidades experimentais ao longo do primeiro eixo representa uma combinação de importância crescente de *Infundibura* sp. e diminuição da importância de *Dimorphospora follicula*. Ao longo do segundo eixo há um aumento da importância de outras taxa menos abundantes (*Articulospora tetracladia*, *Lunulospora curvula*, *Lemonniera aquatica*). Não são visíveis padrões na distribuição, contudo há uma separação entre as concentrações mais baixas, como o controlo com acetona e c2 (10,4 $\mu\text{g L}^{-1}$; à esquerda, no diagrama), e as concentrações mais altas c6 e c7 (400 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; à direita, no diagrama), que refletem diferenças subtis na abundância de *D. follicula* e *Infundibura* sp..

Quanto ao clotrimazol, os perfis de esporulação dos fungos aquáticos (PCA, figura 9), mostraram que os eixos 1 e 2 explicaram 64% e 20% da variância total, respetivamente. A separação das unidades experimentais ao longo do primeiro eixo representa uma combinação de importância crescente de *D. follicula* e diminuição da importância de *Infundibura* sp. Ao longo do segundo eixo há um aumento da importância de outras taxa menos abundantes (*A. tetracladia*, *L. curvula*, *L. aquatica*). Não são claros padrões na distribuição das unidades experimentais em função do tratamento, o que significa uma variação algo aleatória da comunidade fúngica independentemente da concentração a que foi exposta.

A ordenação das unidades experimentais segundo perfis de esporulação dos fungos aquáticos expostos ao tebuconazole (PCA, figura 9) mostraram que os eixos 1 e 2 explicaram 69% e 17% da variância total, respetivamente. Os gráficos de ordenação mostram que a separação das unidades experimentais ao longo do primeiro eixo representa uma combinação de importância crescente de *Infundibura* sp. e diminuição da importância de *D. follicula*, *L. aquatica* e *A. tetracladia*. Ao longo do segundo eixo há um aumento da importância de *L. curvula*. O padrão que ressalta mais é o agrupamento de todos os controlos no 4º quadrante (maior importância de *Infundibura* sp. e menor importância de *D. follicula* e *L. aquatica*).

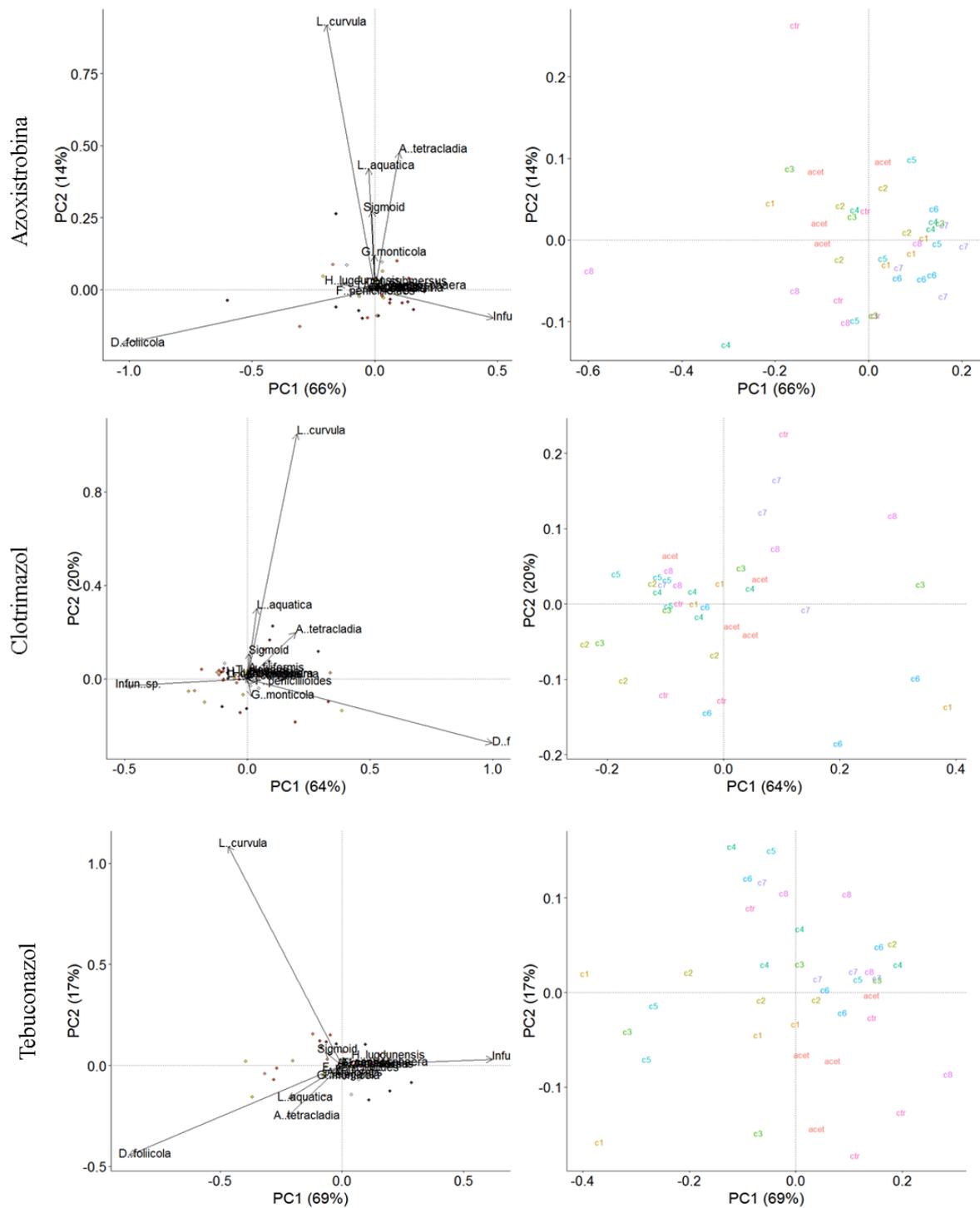


Figura 9. Gráficos de ordenação (PCA com transformação de Hellinger) de perfis da esporulação da comunidade de fungos exposta a concentrações crescentes de azoxistrobina, clotrimazol e tebuconazol. À esquerda estão representadas as unidades experimentais (círculos coloridos) e as espécies de fungos (setas). O painel da direita representa uma ampliação da mancha de pontos (unidades experimentais), identificadas pelas concentrações correspondentes (Ctr: controle; Acet: controle com acetona; C1: $4,1 \mu\text{g L}^{-1}$; C2: $10,4 \mu\text{g L}^{-1}$; C3: $25,6 \mu\text{g L}^{-1}$; C4: $64,0 \mu\text{g L}^{-1}$; C5: $160 \mu\text{g L}^{-1}$; C6: $400 \mu\text{g L}^{-1}$; C7: $1000 \mu\text{g L}^{-1}$; C8: $2500 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.2. Efeitos dos fungicidas isoladamente (fase experimental 2)

A perda de massa foliar foi significativamente reduzida na presença de azoxistrobina (Figura 10; Tabela 5), em quase todas as concentrações (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). Pelo contrário, o miclobutanil e o tebuconazol não causaram alterações na decomposição. A taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos foi significativamente inibida por todos os fungicidas (Figura 10; Tabela 5); esta inibição foi mais severa na azoxistrobina, pois o padrão inibitório é mais acentuado e aconteceu logo nas concentrações mais baixas (31,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$).

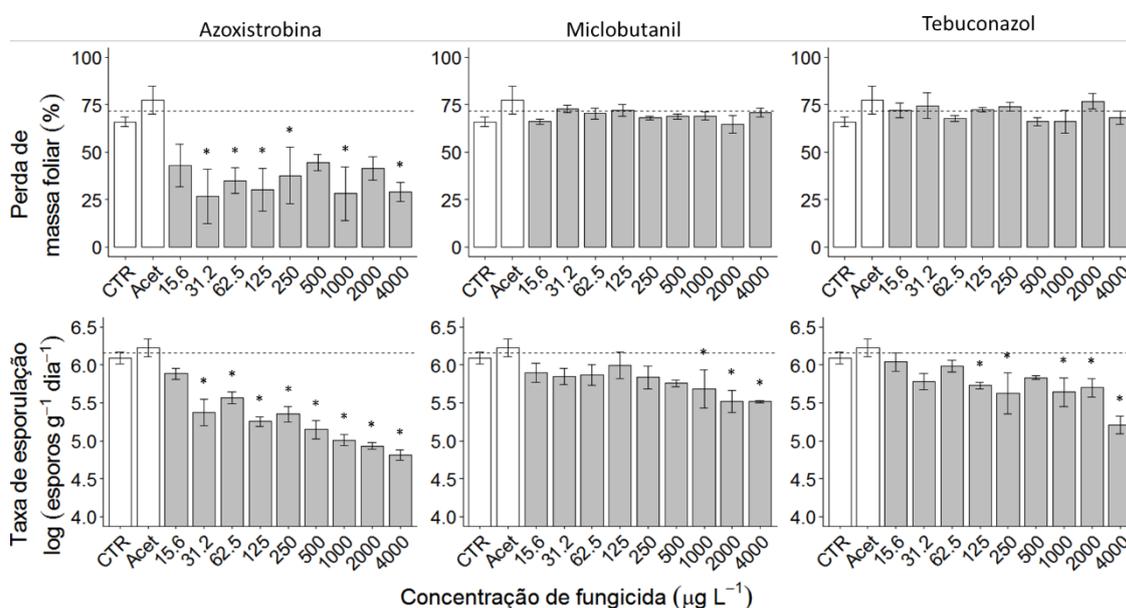


Figura 10. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na perda de massa foliar e na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos. São apresentados os valores médios (barra vertical) e o respetivo erro padrão (barras de erro), bem como o valor médio agregado dos dois controlos (CTR + Acetona, linha a tracejado). O asterisco representa diferenças significativas relativamente ao controlo agregado (teste de Dunnett).

Tabela 5. Significância do modelo unifatorial usado para testar os efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na perda de massa foliar dos discos de folhas, na taxa de esporulação da comunidade de hifomicetos aquáticos, bem como na riqueza em *taxa* e na equitabilidade desta comunidade.

Variável de resposta	Azoxistrobina	Miclobutanil	Tebuconazol
Perda de massa foliar	$F_{9,23} = 3,01; P = 0,0159$	$F_{10,22} = 1,26; P = 0,312$	$F_{9,23} = 0,691; P = 0,71$
Taxa de esporulação	$F_{9,23} = 26,4; P = 4,67e^{-10}$	$F_{9,23} = 2,87; P = 0,0199$	$F_{9,23} = 5,02; P = 0,000841$
Riqueza	$F_{9,23} = 8,1; P = 2,54e^{-05}$	$F_{9,23} = 8,076; P = 2,61e^{-05}$	$F_{9,23} = 10; P = 4,46e^{-06}$
Equitabilidade	$F_{9,23} = 5,98; P = 0,000253$	$F_{9,23} = 1,89; P = 0,889$	$F_{9,23} = 1,46; P = 0,221$

A riqueza da comunidade dos hifomicetos aquáticos também foi significativamente reduzida por todos os fungicidas (Figura 11; Tabela 5). Esta diminuição foi registada a partir de 31,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ no caso da azoxistrobina e do tebuconazol (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$), e a partir das 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ no caso do miclobutanil (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$). O índice de equitabilidade foi significativamente afetado apenas pela azoxistrobina (Figura 10, tabela 5), tendo-se verificado um aumento a partir das concentrações mais baixas (31,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) (teste de Dunnett, $P \leq 0,05$).

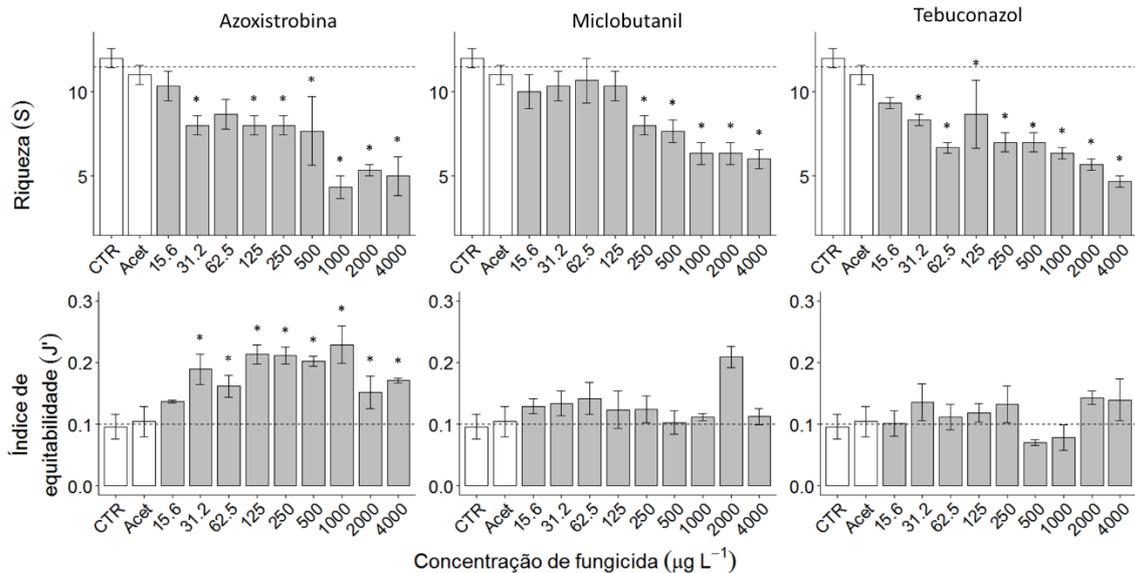


Figura 11. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na riqueza em *taxa* dos hifomicetos aquáticos e no índice de equitabilidade. São apresentados os valores médios (barra vertical) e o respetivo erro padrão (barras de erro), bem como o valor médio agregado dos dois controlos (CTR + Acetona, linha a tracejado). O asterisco representa diferenças significativas relativamente ao controlo agregado (teste de Dunnett).

No caso da aplicação do miclobutanil não foram observadas alterações claras da composição da comunidade (figura 12); contudo, no caso do tebuconazol e principalmente da azoxistrobina, observou-se uma alteração da contribuição relativa dos principais *taxa* (figura 12). Por um lado, verificou-se uma diminuição da importância da espécie *D. foliicola* (com consequente aumento da equitabilidade da comunidade, devido à forte dominância desta espécie) e um aumento da percentagem de *Infundibura* sp. nas concentrações intermédias de ambos os fungicidas. Por outro lado, conforme perceptível sobretudo na azoxistrobina, observou-se um aumento da contribuição relativa de *A. tetracladia* nessas concentrações. Curiosamente, o perfil da comunidade na concentração mais elevada de azoxistrobina e tebuconazol voltou a ser muito próximo do controlo. Embora não seja perceptível na Figura 10, registou-se um gradual

desaparecimento de espécies raras, ou que pouco contribuía para a abundância total (bandas mais pequenas do gráfico), e que é concordante com a diminuição de riqueza observada na presença de todos os fungicidas (figura 10).

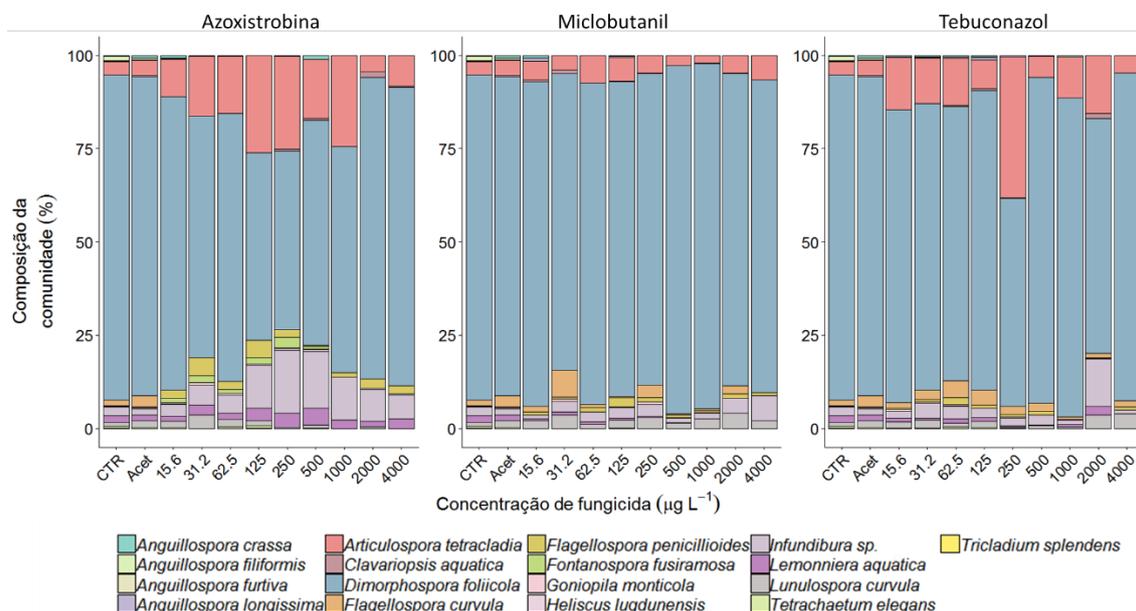


Figura 12. Efeitos da concentração dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil ou tebuconazol na composição relativa das comunidades dos hifomicetos aquáticos (contribuição percentual dos *taxa* mais representados). A percentagem relativa dos *taxa* foi calculada no agregado das quatro replicas.

A ordenação das componentes principais (PCA) das 9 concentrações de azoxistrobina e dos controlos, segundo perfis de esporulação dos fungos aquáticos (Figura 13), mostraram que os eixos 1 e 2 explicaram 52% e 14% da variância total, respetivamente. Os gráficos de ordenação mostram que o primeiro eixo representa uma importância crescente de *D. foliicola*, a qual estava associada às concentrações mais altas e aos controlos, e uma diminuição da importância de *A. tetracladia* que estava principalmente associada às concentrações intermédias. Ao longo do segundo eixo verificou-se um aumento da importância *Infundibura* sp., e uma diminuição da importância de *Flagellospora penicillioides*.

No caso do miclobutanil, as componentes principais (eixos 1 e 2) explicaram 52% e 15% da variância total, respetivamente (Figura 13). Os gráficos de ordenação mostram que o primeiro eixo representava uma importância crescente de *D. foliicola* e uma diminuição da importância de *A. tetracladia*. Ao longo do segundo eixo verificou-se

uma diminuição da importância de *Infundibura* sp.. O padrão de ordenação das unidades experimentais em função dos tratamentos não foi claro.

Relativamente ao tebuconazol, a PCA explicou 33% (eixo 1) e 23% (eixo 2) da variância total, respectivamente. Os gráficos de ordenação mostram que o primeiro eixo representa uma importância crescente de *D. follicula* e uma diminuição da importância de *F. curvula*. Ao longo do segundo eixo há um aumento da importância de *Articulospora tetracladia* e *Infundibura* sp.. Não são claros padrões na distribuição das unidades experimentais em função do tratamento, o que significa uma variação algo aleatória da comunidade fúngica independentemente da concentração a que foi exposta.

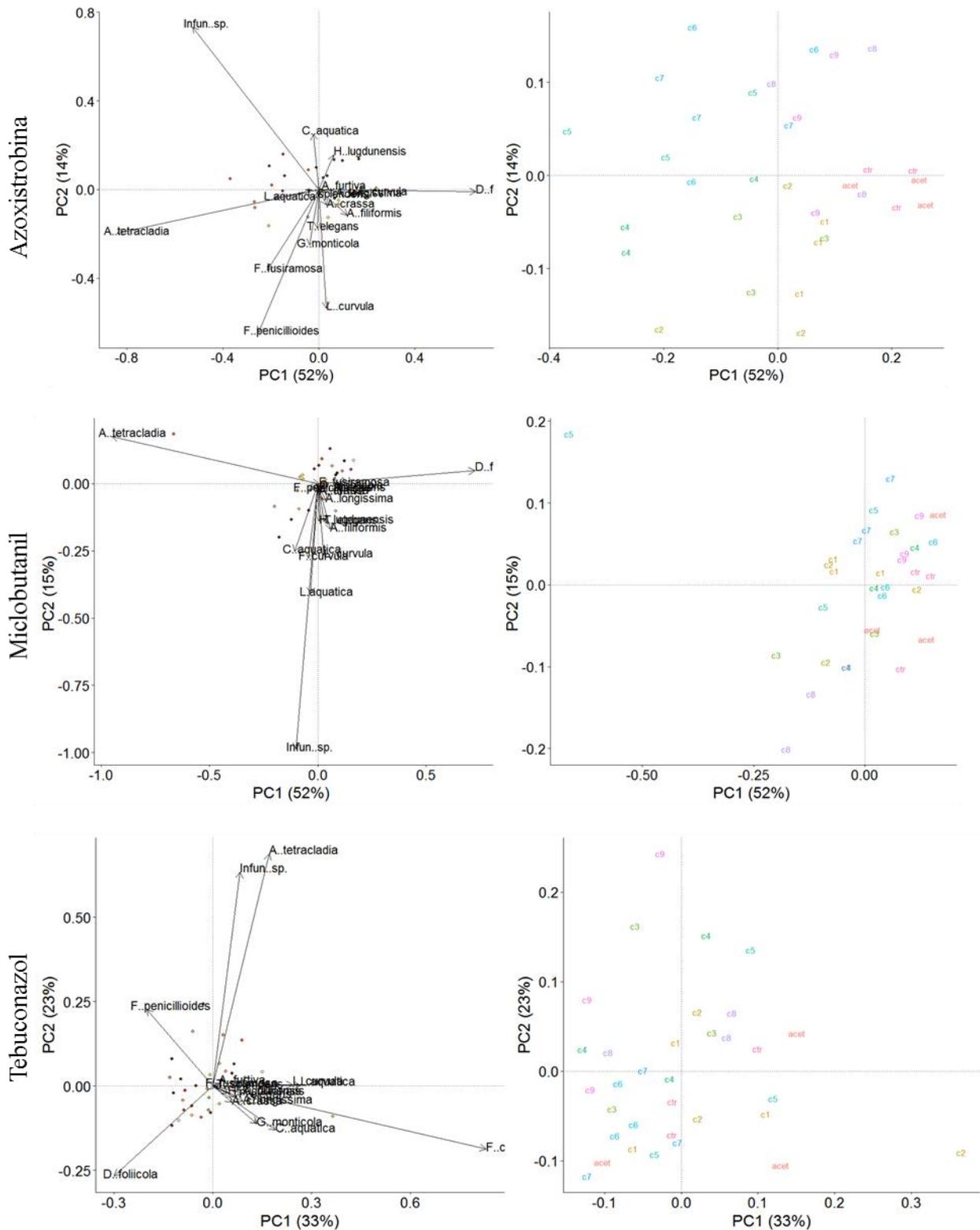


Figura 13 Gráficos de ordenação (PCA com transformação de Hellinger) de perfis de esporulação da comunidade de fungos exposta a concentrações crescentes de azoxistrobina, miclobutanil e tebuconazol. À esquerda estão representadas as unidades experimentais (círculos coloridos) e as espécies de fungos (setas). O painel da direita representa uma ampliação da mancha de pontos (unidades experimentais), identificadas pelas concentrações correspondentes: (Ctr: controlo; Acet: controlo com acetona; C1: 15,6 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2: 31,25 $\mu\text{g L}^{-1}$; C3: 62,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C4: 125 $\mu\text{g L}^{-1}$; C5: 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; C6: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; C7: 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; C8: 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$; C9: 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$).

3.3. Efeitos dos fungicidas em misturas (fase experimental 2)

3.3.1. Tebuconazol vs azoxistrobina

O estudo do efeito do tebuconazol e da azoxistrobina em misturas mostrou interação entre os tóxicos, como indicado pelos desvios ao modelo de ação independente (IA) para a taxa de esporulação ($\chi^2 = 15,6$; $P = 0.000077$; $a = 4.4$) e riqueza ($\chi^2 = 14,2$; $P = 0.00017$; $a = 2.6$). Os valores de a parecem sugerir uma interação do tipo antagônica, com a toxicidade das misturas a ser inferior à estimada a partir dos dados de toxicidade individual dos compostos (Figuras 14 e 15). Contudo, os efeitos destes fungicidas em mistura mostraram um padrão dependente da razão da dose (DR) para a taxa de esporulação ($\chi^2 = 19,4$; $P = 0.000064$; $a = -3.13$, $b = 13.1$), embora o ajuste do modelo DR tenha sido apenas marginalmente superior ($\chi^2 = 3,74$; $P = 0.053$) ao modelo mais simples de sinergismo/antagonismo (S/A). Este cenário interativo mais complexo não se verificou para a riqueza. No caso da esporulação, a toxicidade das misturas foi inferior à estimada a partir dos dados de toxicidade individual dos compostos (antagonismo), exceto quando a azoxistrobina se encontrava em concentrações mais altas, havendo uma tendência para o sinergismo neste caso (Figura 14).

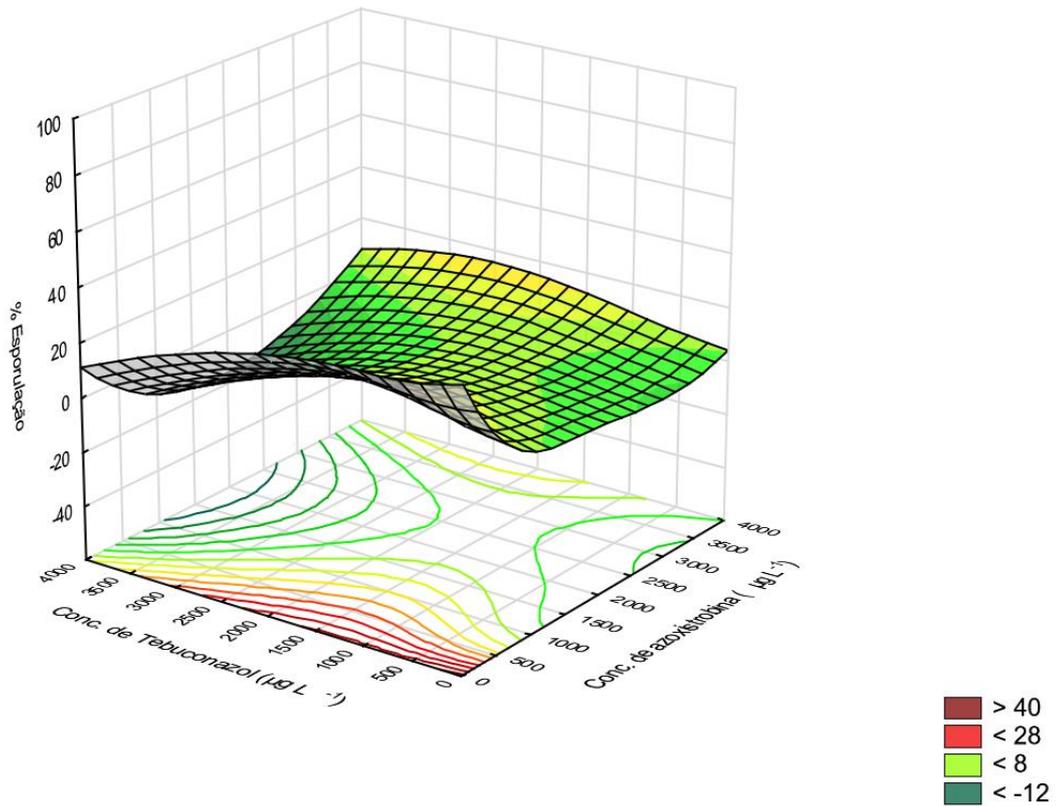


Figura 14 Representação de isobolas dos efeitos de interação do tebuconazol com a azoxistrobina na esporulação dos fungos (representado em % do controle – i.e. controle =100% da esporulação).

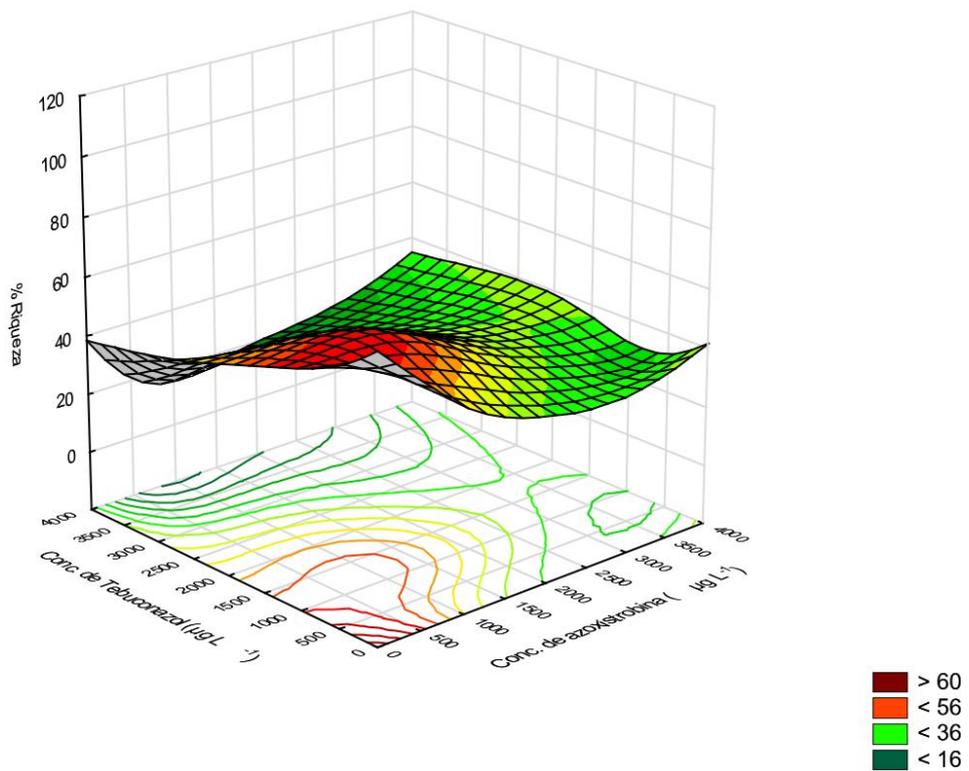


Figura 15 Representação de isobolas dos efeitos de interação (Antagonismo) do tebuconazol com a azoxistrobina na riqueza em espécie dos fungos, (representado em % do controle – i.e. controle =100% da riqueza).

3.3.2. Miclobutanil vs. Tebuconazol

O estudo do efeito das misturas de tebuconazol e miclobutanil não mostrou interação entre os tóxicos, em nenhum dos parâmetros analisados. O modelo da adição da concentração (CA) explica os resultados melhor do que qualquer outro dos modelos testados tanto para a esporulação ($\chi^2 = 1,3$; $P = 0.25$) como para a riqueza em espécies ($\chi^2 = 0,16$; $P = 0.68$).

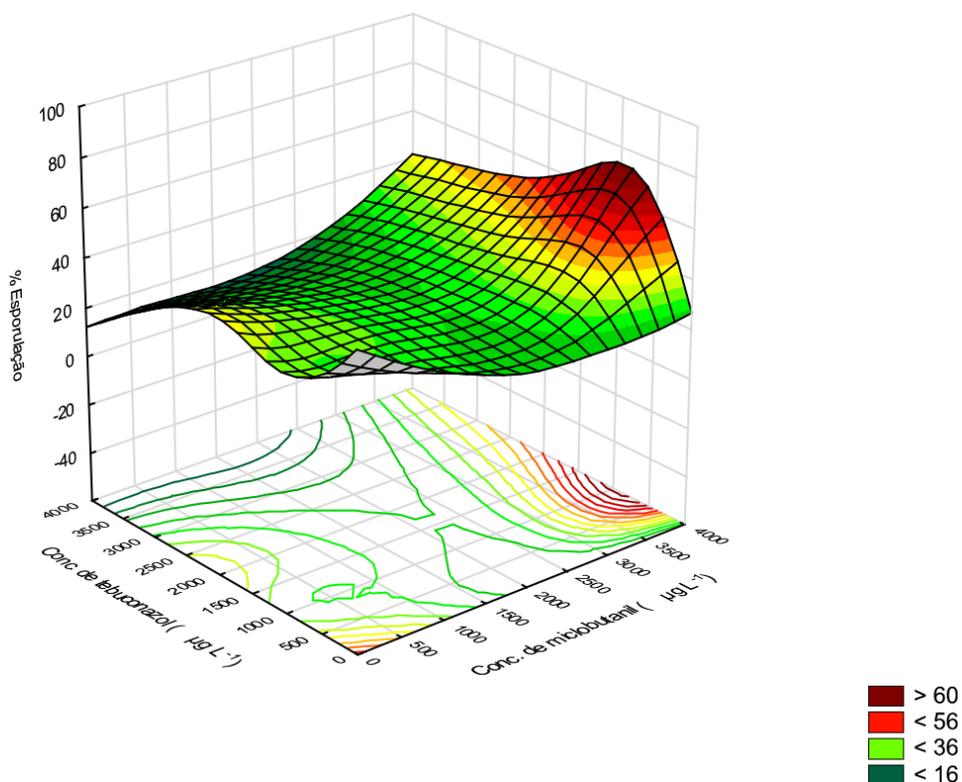


Figura 16 Representação de isobolas dos efeitos da mistura do tebuconazol com o miclobutanil na esporulação dos fungos (representado em % do controlo – i.e. controlo =100% da esporulação).

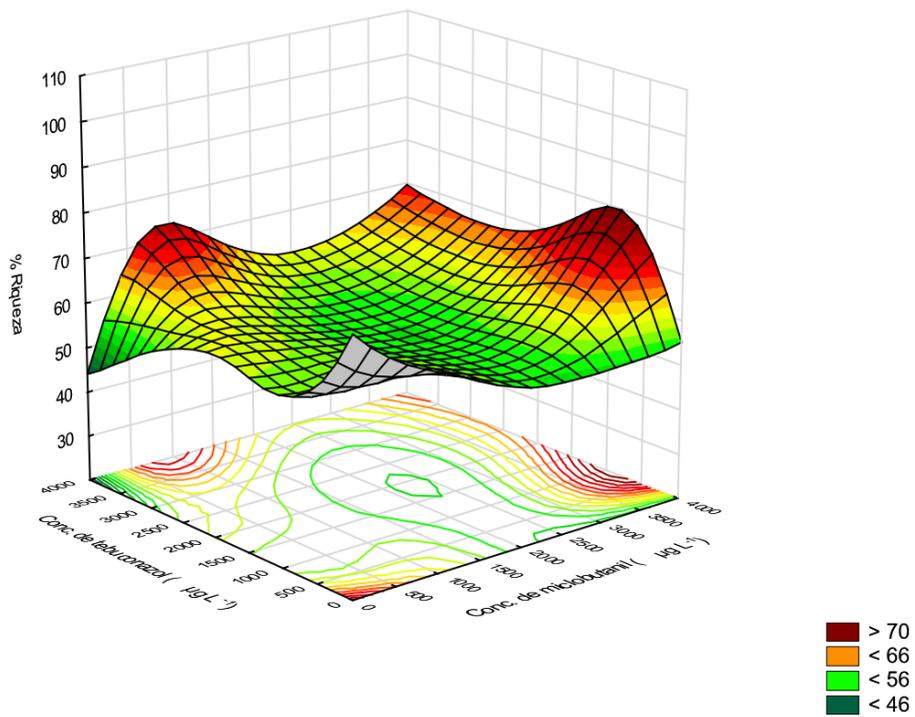


Figura 17 Representação de isobolas dos efeitos da mistura do tebuconazol com o miclobutanil na riqueza em espécies de fungos (representado em % do controlo – i.e. controlo =100% da riqueza).

4. Discussão dos resultados

4.1. Efeitos isolados dos fungicidas

Na primeira fase, testámos os efeitos dos fungicidas azoxistrobina, clotrimazol e tebuconazol na comunidade de fungos decompositores da folhada. Contudo, e ao contrário do que era previsível face ao descrito na literatura, não houve um efeito nocivo dos fungicidas para a comunidade fúngica, tendo até havido uma estimulação da esporulação dos fungos por parte do tebuconazol. Em contraste com estes resultados, alguns estudos já demonstraram que o tebuconazol pode diminuir a esporulação de fungos bem como a decomposição da folhada (Bundschuh et al. 2011; Zubrod et al. 2011). Mais recentemente Pimenta et al. (2017) verificou que o tebuconazol e o clotrimazol podem diminuir a esporulação até 92% e 77%, respetivamente, a concentrações de 1280 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os estudos sobre os efeitos da azoxistrobina no processo de decomposição são mais limitados; ainda assim Zubrod e colaboradores (2015) verificaram uma diminuição da decomposição da folhada quando exposta a concentrações de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, estes estudos da literatura foram feitos com recurso a folhas de amieiro *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., enquanto a nossa primeira experiência de decomposição foi feita recorrendo a folhas de videira. O tipo de folha usado como substrato pode explicar, em parte, o contraste entre os nossos resultados e os descritos na literatura.

No nosso estudo, verificou-se uma elevada variabilidade dos dados da massa foliar da videira, que foram confirmados visualmente pela heterogeneidade da extensão da decomposição entre discos de folhas dentro da mesma unidade experimental e entre unidades experimentais, o que pode ter mascarado eventuais efeitos dos fungicidas na decomposição. Por outro lado, os discos de folhas foram decompostos muito rapidamente, o que pode ter impedido que os efeitos chegassem efetivamente a acontecer. As folhas de videira foram escolhidas porque regularmente formam corredores ribeirinhos ao longo dos rios no norte de Portugal, como parte da alteração da paisagem decorrente da utilização do solo para a agricultura (e para a vinha, concretamente). Assim, as folhas de videira podem ser uma fonte de entrada de folhada nos rios; em algumas situações, podem também ser o foco de contaminação, se as folhas tiverem sido tratadas com fungicidas, tornando relevante a avaliação dos efeitos nesta espécie. Contudo, o baixo teor de lenhina (Nikolaidou et al. 2010), a par da elevada

diversidade e atividade fúngica encontrada em folhas de videira em comparação com as folhas de amieiro (Fernandes et al. 2012), pode também ter contribuído para a rápida decomposição e dificultado a detecção dos efeitos dos fungicidas.

Na segunda experiência, o desenho experimental foi modificado e recorreu-se ao amieiro como fonte de folhas para servir de substrato de colonização. Por outro lado, a gama de concentrações testada foi alargada, recorrendo a concentrações mais elevadas. Como consequência, fomos forçados a trocar o clotrimazol pelo miclobutanil, em virtude da reduzida solubilidade do primeiro no solvente orgânico utilizado (acetona). O miclobutanil é um agroquímico cujo modo de ação é similar ao tebuconazol e ao clotrimazol (inibição da biossíntese de ergosterol).

Deste modo, nesta segunda fase experimental, testámos os efeitos dos fungicidas azoxistrobina, miclobutanil e tebuconazol na comunidade de fungos decompositores da folhada de amieiro. Ao contrário da primeira experiência, observou-se efeitos dos fungicidas na comunidade de fungos decompositores. Todos os fungicidas testados afetaram a esporulação, mas a azoxistrobina afetou de forma mais severa - 49% de redução logo na primeira concentração ($15,6 \mu\text{g L}^{-1}$). A estrutura da comunidade de fungos, e especificamente a riqueza, foi afetada, mais severamente pela azoxistrobina e o tebuconazol, enquanto decomposição microbiana foi negativamente afetada apenas pela azoxistrobina. Realmente, o tebuconazol pode diminuir a esporulação até 92% a concentrações de $1280 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pimenta et al. 2017) enquanto a azoxistrobina pode diminuir a decomposição da folhada em cerca de 15 % a concentrações de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Zubrod et al. 2014). O efeito do miclobutanil não está reportado na literatura, mas tendo em conta o seu modo de ação semelhante ao tebuconazol seriam de esperar efeitos semelhantes nos dois fungicidas.

A azoxistrobina parece ter tido efeitos mais severos do que o tebuconazol e o miclobutanil, contudo é necessário perceber se a concentração mássica pode ser utilizada como medida de comparação entre os tóxicos testados. Como muitas interações intra-celulares são do tipo molécula-molécula ou molécula-recetor, reveste-se de alguma utilidade a comparação de concentrações molares. Convertendo a concentração mais baixa utilizada de fungicida ($15,6 \mu\text{g L}^{-1}$) em concentração molar, para cada um dos fungicidas, verifica-se que a concentração mais baixa aplicada foi $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ de azoxistrobina, $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ de miclobutanil e $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tebuconazol; as concentrações molares são, por isso, comparáveis entre os três tóxicos.

Deste modo, é válido considerar a azoxistrobina como efetivamente mais tóxica do que os fungicidas azólicos testados. O modo de ação da azoxistrobina envolve a interrupção da produção de energia, o que acaba por ser particularmente eficaz em estágios altamente exigentes do desenvolvimento de fungos (Bartlett et al. 2002), como a esporulação – que foi o fator mais afetado no caso da aplicação de azoxistrobina. Este contraste com os fungicidas azólicos que inibem a biossíntese de ergosterol é importante pois estes compostos azólicos não impedem a germinação, porque os fungos podem usar reservas de ergosterol ou um dos seus precursores armazenados dentro dos esporos (Bartlett et al. 2002). Algumas referências consideram que os compostos azol são essencialmente fungistáticos (Manavathu et al. 1998), e muitos fungos recuperam facilmente quando deixam de estar sob a ação deste tipo de compostos (Cuco et al. 2017b, Sousa 2018).

Os impactos observados na comunidade fúngica podem ter implicações ecológicas a curto e a longo prazo. No nosso estudo, a taxa de esporulação foi reduzida por todos os fungicidas aplicados durante 23 dias. Houve também uma diminuição do número de espécies, sugerindo que algumas espécies foram desaparecendo com a exposição aos fungicidas, ou a sua reprodução (esporulação) foi inibida. Embora a perda de espécies de fungos tenha sido associada a agentes de *stress* antrópicos, isso nem sempre foi acompanhado por alterações na decomposição foliar (por exemplo, Lecerf e Chauvet 2008). Efetivamente, o empobrecimento da comunidade fúngica e as reduzidas taxas de esporulação não foram acompanhados por uma diminuição da decomposição foliar no caso dos fungicidas azoles (tebuconazol e miclobutanil), sugerindo que a contribuição de algumas espécies poderá compensar a eliminação de outras. De facto, a redundância funcional entre espécies de fungos é um mecanismo importante de manter as funções ecológicas em rios sob *stress* (Pascoal et al. 2005). No caso da azoxistrobina, a diminuição da decomposição, associada ao aumento da equitabilidade, pode sugerir que a diminuição de espécies mais abundantes por ação do fungicida pode ter sido responsável pela diminuição da decomposição.

Na natureza, os rios podem estar sujeitos a exposições prolongadas e frequentes de fungicidas. Em Portugal, a azoxistrobina e o miclobutanil podem ser aplicados até 3 vezes por ano numa cultura, e o tebuconazol até quatro vezes por ano por cultura (DGAV 2013). Como tal, é muito provável que os sistemas aquáticos recebam estes fungicidas em cenários de exposição prolongada, ainda para mais tendo em conta que

estes tratamentos com fungicidas podem ser alvo de aplicações recorrentes), e que a sua persistência ambiental é relativamente longa. No caso da azoxistrobina, o seu tempo de meia vida (hidrólise) é cerca de 14 dias, do miclobutanil cerca de 30 dias e do tebuconazol cerca de 28 dias (Kegley et al. 2011). No caso da azoxistrobina, a sua aplicação prolongada ainda tem consequências mais graves, porque este fungicida afeta a decomposição da folhada, um processo vital nos ecossistemas, e embora a solubilidade deste fungicida não elevada (6 mg L^{-1}), o seu coeficiente de partição carbono orgânico / água é relativamente baixo ($K_{oc} = 423$), o que o torna propenso a ser transportado por lixiviação ou escoamento superficial, levando à contaminação das águas.

Neste estudo, os efeitos significativos dos compostos nas variáveis analisadas raramente ocorreram a concentrações encontradas no ambiente. No entanto, as concentrações de tebuconazol verificadas no ambiente $\sim 30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Kahle et al. 2008; Rasmussen et al. 2012) aproximam-se das concentrações às quais se verificaram efeitos tóxicos sobre a esporulação. Se considerarmos eventos extremos de lixiviação, normalmente associados a períodos de grande pluviosidade, a relevância dos nossos dados aumenta na medida em que as concentrações ambientais podem aumentar substancialmente nestes casos; no caso do tebuconazol, há registos de concentrações extremas perto de $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Elsaesser e Schulz 2008), que são níveis algo preocupantes. É ainda particularmente importante perceber se estes efeitos podem ser agravados em misturas complexas de fungicidas, uma vez que é frequente a deteção de mais do que uma substância fungicida em águas superficiais (Bereswill et al. 2012).

4.1. Efeitos dos fungicidas em misturas binárias

Os efeitos dos fungicidas em misturas com o mesmo modo de ação (miclobutanil vs. tebuconazol) seguiram o modelo da adição da concentração, tanto para os dados de riqueza como para os dados de esporulação, pelo que os efeitos destes tóxicos em misturas são iguais à soma dos seus efeitos individuais. Este era o cenário inicialmente hipotetizado para substâncias com o mesmo modo de ação, e representa um caso em que é possível prever a toxicidade da mistura dos compostos a partir das concentrações individuais. Para os tóxicos em misturas com modo de ação diferente (azoxistrobina vs. tebuconazol), os dados seguiram o modelo de antagonismo, tanto para os dados de riqueza como para os dados de esporulação, pelo que os efeitos destes tóxicos em

misturas foram inferiores à soma dos seus efeitos individuais. Contudo, persistem dúvidas quanto ao modelo com melhor ajuste neste caso, em virtude do modelo dependente da razão da dose também se ajustar relativamente bem aos dados. Os gráficos de isobolas parecem sugerir que em concentrações mais altas de azoxistrobina pode ocorrer sinergismo, em vez de antagonismo. Este cenário configura um padrão altamente dependente do contexto, e que justifica mais investigação no futuro.

As interações entre tóxicos numa mistura podem ocorrer por vários fatores, segundo (Spurgeon et al. 2010): 1) interação com fatores ambientais, que podem influenciar diferencialmente a exposição dos organismos aos químicos; 2) interação ao nível do local de contacto e entrada dos tóxicos no organismo e/ou capacidade de eliminação dos tóxicos; 3) interações que podem ocorrer no local alvo de ação do tóxico, onde um tóxico pode influenciar a capacidade de ligação de outro tóxico ao recetor. No caso da interação tebuconazol \times azoxistrobina, não é evidente qual dos cenários pode explicar o padrão de antagonismo observado, ou mesmo o hipotético câmbio de um cenário de antagonismo para um cenário de sinergismo.

Tendo em conta que a abordagem experimental utilizada controla os fatores ambientais, podemos excluir a primeira hipótese. A terceira hipótese é altamente improvável tendo em conta o alvo celular do tebuconazol (enzima lanosterol-14a-desmetilase na via de biossíntese do ergosterol) e o alvo da azoxistrobina (quinona transportadora de eletrões no complexo citocromo bc1 da cadeia respiratória na mitocôndria). Sendo provavelmente mais provável é que estejam implicados processos toxicocinéticos (associados com a absorção, metabolismo e excreção) que possam explicar os efeitos sinérgicos e antagonísticos observados. por exemplo, alguns trabalhos demonstraram que agroquímicos como o prochloraz, que é um fungicida azólico, inibiam a ação do complexo CYP1A (Antignac et al. 1990), o que tornava a destoxificação e a biotransformação de outros fungicidas mais difícil, quando aplicados conjuntamente (Cedergreen et al. 2006). O citocromo P450 (CYP1A) é uma família de proteínas que intervém em processos de destoxificação de químicos e na reparação de danos celulares induzidos pelos mesmos (Korsloot et al. 2007). Este mecanismo pode explicar o porquê de em concentrações mais altas os resultados entre azoxistrobina e o tebuconazol sugerirem sinérgismos, mas não explica o padrão mais geral de antagonismo.

4.2. Conclusão

Em suma, os resultados deste trabalho apontam para impactos do tebuconazol, miclobutanil e azoxistrobina nas cadeias alimentares detritívoras em rios. Entre estes, a azoxistrobina foi o composto mais preocupante por afetar a decomposição e por causar um decréscimo mais drástico na esporulação. Os efeitos em misturas para os compostos com o mesmo modo de ação não revelaram ser mais do que a soma das partes. Contudo, isto também significa que misturas complexas com muitos produtos químicos em baixas concentrações podem ser bastantes tóxicas. Os fungicidas do grupo de inibidores do ergosterol é uma das famílias de fungicidas mais utilizadas, pelo que a adição das concentrações dos vários compostos encontrados no ambiente pode levar a concentrações com impactos muito negativos. À soma dos vários agroquímicos, poderão acrescer também fármacos com modos de ação similares (como o clotrimazol). Os efeitos de antagonismo entre a azoxistrobina e o tebuconazol tornam claro que existe interação entre compostos. Isto implica a necessidade de perceber as interações entre os modos de ação destes fungicidas. O nosso estudo mostra a importância de analisar as interações de sinergismo/antagonismo entre tóxicos de forma a ter uma imagem real do efeito que os agentes de stress podem causar nas comunidades e nos processos ecológicos por estas desempenhados.

5. Bibliografia

- A. Kalinin V, V. Bykov K, Osman A (2002) Effects of azoxystrobin on soil microorganisms under laboratory conditions.
- Adetutu EM, Ball AS, Osborn AM (2008) Azoxystrobin and soil interactions: degradation and impact on soil bacterial and fungal communities. *J Appl Microbiol* 105:1777–1790. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03948.x
- Allan JD, Castillo MM (2007) Stream ecology: structure and function of running waters.
- Andersen ME, Dennison JE (2004) Mechanistic approaches for mixture risk assessments - Present capabilities with simple mixtures and future directions. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 16:1–11.
- Antignac E, Koch B, Grolier P, et al (1990) Prochloraz as potent inhibitor of benzo[a]pyrene metabolism and mutagenic activity in rat liver fractions. *Toxicol Lett* 54:309–15.
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, et al (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123:247–260.
- Armengol J, Gramaje D, Armengol J (2011) Importance and Impact of Fungal Trunk Pathogens in Young Vineyards. *Plant Dis* 95:1040–1055. doi: 10.1074/jbc.M309555200
- Balian E V, Segers HH, Martens K (2008) The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results The Freshwater Animal Diversity Assessment : an overview of the results. doi: 10.1007/s10750-007-9246-3
- Bärlocher F (2005) Sporulation by aquatic hyphomycetes. Em: *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide.*
- Barrett-Bee K, Dixon G (1995) Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents. *Acta Biochim. Pol.* 42:465–479.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, et al (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* 58:649–662. doi: 10.1002/ps.520

- Battaglin WA, Sandstrom MW, Kuivila KM, et al (2011) Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water Air Soil Pollut* 218:307–322. doi: 10.1007/s11270-010-0643-2
- Benfield EF (1998) Leaf breakdown in stream ecosystems. *Em: Methods in Stream Ecology*. pp 579–589
- Bereswill R, Golla B, Streloke M, Schulz R (2012) Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agric Ecosyst Environ* 146:81–92. doi: 10.1016/j.agee.2011.10.010
- Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26:585–615. doi: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
- Boxall ABA (2004) The environmental side effects of medication. *EMBO Rep* 5:1110–1116. doi: 10.1038/sj.embor.7400307
- Bundschuh M, Zubrod JP, Kosol S, et al (2011) Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquat Toxicol* 104:32–37. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.03.010
- Canhoto C, Graça M a. S (1996) Decomposition of *Eucalyptus globulus* leaves and three native leaf species (*Alnus glutinosa*, *Castanea sativa* and *Quercus faginea*) in a Portuguese low order stream. *Hydrobiologia* 333:79–85. doi: 10.1007/BF00017570
- Casas JJ, Gessner MO (1999) Leaf litter breakdown in a Mediterranean stream characterised by travertine precipitation. *Freshw Biol* 41:781–793. doi: 10.1046/j.1365-2427.1999.00417.x
- Castillo LE, Martínez E, Ruepert C, et al (2006) Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica. *Sci Total Environ* 367:418–432. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.02.052
- Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC (2006) Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat Toxicol* 78:243–52. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.03.007

- Cooper J, Dobson H (2007) The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.*
- Cuco AP, Abrantes N, Gonçalves F, et al (2017a) Interplay between fungicides and parasites: Tebuconazole, but not copper, suppresses infection in a *Daphnia-Metschnikowia* experimental model. *PLoS One* 12:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0172589
- Cuco AP, Santos JI, Abrantes N, et al (2017b) Concentration and timing of application reveal strong fungistatic effect of tebuconazole in a *Daphnia*-microparasitic yeast model. *Aquat Toxicol* 193:144–151. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.10.013
- Cuppen JGM, Van Den Brink PJ, Camps E, et al (2000) Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquat Toxicol* 48:233–250. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00036-3
- D. Vinebrooke R, L. Cottingham K, Norberg Marten Scheffer J, et al (2004) Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104:451–457. doi: 10.1111/j.0030-1299.2004.13255.x
- Deneer JW, Sinnige TL, Seinen W, Hermens JLM (1988) The joint acute toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations. *Aquat Toxicol*. doi: 10.1016/0166-445X(88)90017-3
- DGAV (2013) Plano de Ação Nacional – Contexto Nacional da Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos.
- Dodds Ashley ES, Lewis R, Lewis JS, et al (2006) Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin Infect Dis* 43:S28–S39. doi: 10.1086/504492
- Duarte S, Pascoal C, Cássio F, Bärlocher F (2006) Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia* 147:658–666. doi: 10.1007/s00442-005-0300-4
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, et al (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev* 81:163. doi: 10.1017/S1464793105006950
- Duffy J (2009) Why biodiversity is important to the functioning of real-world

- ecosystems. *Front Ecol Environ* 7:437–444. doi: 10.1890/070195
- Dunck B, Lima-Fernandes E, Cássio F, et al (2015) Responses of primary production, leaf litter decomposition and associated communities to stream eutrophication. *Environ Pollut* 202:32–40. doi: 10.1016/j.envpol.2015.03.014
- Durance I, Bruford MW, Chalmers R, et al (2016) *The Challenges of Linking Ecosystem Services to Biodiversity: Lessons from a Large-Scale Freshwater Study*, 1.^a edn. Elsevier Ltd.
- Elsaesser D, Schulz R (2008) Mitigation of fungicide pollution in vegetated agricultural surface waters: GIS modelling and monitoring in the field. *Conf Proceeding from SETAC Eur 18th Annu Meet* 406–407.
- Eurostat (2015) *Organic farming statistics*.
- Fernandes I, Pascoal C, Guimarães H, et al (2012) Higher temperature reduces the effects of litter quality on decomposition by aquatic fungi. *Freshw Biol*. doi: 10.1111/fwb.12004
- Folt CL, Chen CY, Moore M V, Burnaford J (1999) Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol Oceanogr* 44:864–877. doi: 10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0864
- Fuchs A, Drandarevski CA (1976) The likelihood of development of resistance to systemic fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Netherlands J Plant Pathol* 82:85–87. doi: 10.1007/BF01976954
- Gallagher ED, Legendre P (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data.
- Gessner MO (2003) Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams. *Fungal Divers Res Ser* 10:127–157.
- Gessner MO, Chauvet E, Dobson M, et al (1999) A Perspective on Leaf Litter Breakdown in Streams. *Nord Soc Oikos* 377–384.
- Gessner MO, Gulis V, Kuehn K a, et al (2007) Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Em: Environmental and Microbial Relationships*. pp 301–324
- Graça MAS (2001) The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - A

- review. *Int. Rev. Hydrobiol.* 86:383–393.
- Graça MAS, Canhoto C (2006) Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica* 25:1–10.
- Greco W, Unkelbach H-D, Pösch G, et al (1992) Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: The Saariselkä Agreement. *Arch. Complex Environ. Stud.* 4:65–69.
- Gulis V (2005) An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes. 153–167.
- Hanazato T (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: An ecological perspective. *Environ. Pollut.* 112:1–10.
- Hayes TB, Case P, Chui S, et al (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114:40–50. doi: 10.1289/ehp.8051
- Hof H (2001) Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2987–2990.
- Hooper DU, Chapin III FS, Ewel JJ (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75:3–35. doi: 10.1890/04-0922
- I.V.V (2016) Instituto do vinho e da vinha. <http://www.ivv.gov.pt/np4/estatistica/>.
- INE (2016) Agriculture statistics in 2015.
- Ittner LD, Junghans M, Werner I (2018) Aquatic fungi: a disregarded trophic level in ecological risk assessment of organic fungicides. *Front Environ Sci.* doi: 10.3389/fenvs.2018.00105
- Jonker MAJ, Vendsen CLS, Edaux JAJMB, et al (2005) Significance Testing of Synergistic / Antagonistic , Dose Level – Dependent , or Dose Ratio – Dependent Effects in Mixture Dose – Response Analysis. 24:2701–2713.
- Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, et al (2008) Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ Sci Technol* 42:7193–7200. doi: 10.1021/es8009309

- Kegley S, Hill B, Orme S, Choi AH (2014) Tebuconazole - PAN Pesticide Database. In: Pestic. Action Network, North Am. (Oakland, CA). http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35028.
- Kegley SE, Hill BR, Orme S, H. C (2011) PAN pesticide database, pesticide action network.
- Komárek M, Čadková E, Chrastny V, et al (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* 36:138–151.
- Kominoski JS, Hoellein TJ, Leroy CJ, et al (2010) Beyond species richness: Expanding biodiversity-ecosystem functioning theory in detritus-based streams. *River Res Appl* 26:67–75. doi: 10.1002/rra.1285
- Korsloot A, Gestel CAM van, Straalen. NM van (2007) Environmental Stress and Cellular Response in Arthropods. *Q Rev Biol* 82:42–43. doi: 10.1086/513335
- Lecerf A, Chauvet E (2008) Intraspecific variability in leaf traits strongly affects alder leaf decomposition in a stream. *Basic Appl Ecol* 9:598–605. doi: 10.1016/j.baae.2007.11.003
- Lecerf A, Richardson JS (2010) Biodiversity-ecosystem function research: Insights gained from streams. *River Res. Appl.* 26:45–54.
- Lentza-Rizos C, Avramides EJ, Kokkinaki K (2006) Residues of azoxystrobin from grapes to raisins. *J Agric Food Chem.* doi: 10.1021/jf051821w
- Lima-Fernandes E, Fernandes I, Pereira A, et al (2015) Eutrophication modulates plant-litter diversity effects on litter decomposition in streams. *Freshw Sci.* doi: 10.1086/679223
- Loewe S, Muischnek H (1926) Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 114:313–326. doi: 10.1007/BF01952257
- Loreau M (2010) Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:49–60. doi: 10.1098/rstb.2009.0155
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, et al (2001) Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* (80-) 294:804–808. doi: 10.1126/science.1064088

- Maltby L, Brock TCM, Van Den Brink PJ (2009) Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environ Sci Technol* 43:7556–7563. doi: 10.1021/es901461c
- Marvanová L, Descals E (1987) New taxa and new combinations of 'aquatic hyphomycetes'. *Trans Br Mycol Soc* 89:499–507. doi: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80084-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80084-0)
- McGrath MT (2004) What are Fungicides? *Plant Heal Instr.* doi: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01
- McKnight US, Rasmussen JJ, Kronvang B, et al (2015) Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environ Pollut* 200:64–76. doi: 10.1016/j.envpol.2015.02.015
- Neves M (2008) Pragas e doenças da vinha. Direção regional da agricultura e pescas do Centro. DRABL.
- NICIF (2006) Projeto Terrisc - Recuperação do património e da paisagem de socalcos.
- Nikolaidou AE, Pavlatou-Ve AK, Kostopoulou SK, et al (2010) Litter quality and decomposition of *Vitis vinifera* L. residues under organic and conventional farming systems. *Eur J Soil Biol.* doi: 10.1016/j.ejsobi.2010.03.001
- Pascoal C, Cássio F (2004) Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Appl Environ Microbiol* 70:5266–5273. doi: 10.1128/AEM.70.9.5266-5273.2004
- Pascoal C, Cássio F, Gomes P (2001) Leaf Breakdown Rates : a Measure of Water Quality ? 407–416.
- Pascoal C, Cássio F, Marcotegui A, et al (2005) Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river. *J North Am Benthol Soc* 24:784–797. doi: 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. *Microb Ecol* 59:84–93. doi: 10.1007/s00248-009-9567-z
- Pascoal C, Pinho M, Ca F, Gomes P (2003) Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown : studies on a polluted river. 2033–2044.

- Pereira A, Geraldes P, Lima-Fernandes E, et al (2016) Structural and functional measures of leaf-associated invertebrates and fungi as predictors of stream eutrophication. *Ecol Indic* 69:648–656. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.05.017
- Peschka M, Roberts PH, Knepper TP (2007) Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem* 389:959–968. doi: 10.1007/s00216-007-1480-z
- Pimenta AR, Work E, Cl M, et al (2017) The role of specialists vs . generalists in ecosystem processes under environmental stress.
- Postel S, Richter B (2003) Rivers for Life: Managing water for people and nature. *Ecol. Econ.* 55:306–307.
- Rasmussen JJ, Wiberg-Larsen P, Baattrup-Pedersen A, et al (2012) Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Sci Total Environ* 416:148–155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.057
- Read SJ, Moss ST, Jones EBG (1992) Attachment and germination of conidia. In: *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*.
- Relyea RA (2009) A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159:363–376. doi: 10.1007/s00442-008-1213-9
- Schindler MH, Gessner MO (2009) Functional leaf traits and biodiversity effects on litter decomposition in a stream. *Ecology*. doi: 10.1890/08-1597.1
- Smalling KL, Orlando JL (2011) Occurrence of pesticides in water and sediment from three central California coastal watersheds, 2008–2009.
- Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JLCM, et al (2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.02.038
- Stoate C, Báldi A, Beja P, et al (2009) Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe - A review. *J Environ Manage* 91:22–46. doi: 10.1016/j.jenvman.2009.07.005
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM (1979) Decomposition in terrestrial ecosystems. *Rev. Lit. Arts Am.* 5:12–24.

- Thind TS, Arora JK, Mohan C, Raj P (2004) Epidemiology of Powdery Mildew, Downy Mildew and Anthracnose Diseases of Grapevine. Em: Naqvi SAMH (ed) Diseases of Fruits and Vegetables Volume I: Diagnosis and Management. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 621–638
- Ulea E, Irimia N, Lipşa F (2012) INCIDENCE OF MAJOR FUNGAL DISEASES IN AMPELOGRAPHIC COLLECTION OF USAMV IAŞI, ROMANIA.
- Walker CH, Johnston GO, Dawson A (1993) Enhancement of toxicity due to the interaction of pollutants at the toxicokinetic level in birds. *Sci Total Environ.* doi: 10.1016/S0048-9697(05)80054-3
- Zubrod JP, Baudy P, Schulz R, Bundschuh M (2014) Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquat Toxicol* 150:133–143. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.002
- Zubrod JP, Bundschuh M, Feckler A, et al (2011) Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environ Toxicol Chem* 30:2718–2724. doi: 10.1002/etc.679
- Zubrod JP, Englert D, Feckler A, et al (2015a) Does the current fungicide risk assessment provide sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning? *Environ Sci Technol* 49:1173–1181. doi: 10.1021/es5050453
- Zubrod JP, Feckler A, Englert D, et al (2015b) Inorganic fungicides as routinely applied in organic and conventional agriculture can increase palatability but reduce microbial decomposition of leaf litter. *J Appl Ecol* 52:310–322. doi: 10.1111/1365-2664.12393

6. Anexos

Anexo 1

Tabela 1 Significância do modelo unifatorial usado para testar o contraste entre o controlo com e sem acetona (1ª fase experimental)

	Azoxistrobina	Clotrimazol	Tebuconazol
Taxa de esporulação	$F_{1,30} = 0,017; P = 0,90$	$F_{1,29} = 0,02; P = 0,90$	$F_{1,30} = 0,040; P = 0,84$
Riqueza	$F_{1,30} = 0,85; P = 0,363$	$F_{1,29} = 1,75; P = 0,20$	$F_{1,30} = 1,46; P = 0,24$
Equitabilidade	$F_{1,30} = 0,040; P = 0,84$	$F_{1,29} = 0,063; P = 0,80$	$F_{1,30} = 0,090; P = 0,766$
Perda de massa foliar	$F_{1,30} = 0,142; P = 0,709$	$F_{1,30} = 0,136; P = 0,715$	$F_{1,30} = 0,11; P = 0,742$

Tabela 2 Significância do modelo unifatorial usado para testar o contraste entre o controlo com e sem acetona (2ª fase experimental)

	Azoxistrobina	Miclobutanil	Tebuconazol
Taxa de esporulação	$F_{1,22} = 0,93; P = 0,345$	$F_{1,22} = 0,465; P = 0,5023$	$F_{1,22} = 0,501; P = 0,486$
Riqueza	$F_{1,22} = 0,596; P = 0,448$	$F_{1,22} = 0,786; P = 0,385$	$F_{1,22} = 1,900; P = 0,353$
Equitabilidade	$F_{1,22} = 0,079; P = 0,781$	$F_{1,22} = 0,048; P = 0,829$	$F_{1,22} = 0,035; P = 0,854$
Perda de massa foliar	$F_{1,22} = 0,682; P = 0,418$	$F_{1,22} = 0,237; P = 0,021$	$F_{1,22} = 3,68; P = 0,07$

Anexo 2

Interpretação de parâmetros adicionais substituídos nos modelos de referência de adição de concentração (CA) e ação independente (IA) que definem a forma funcional do padrão de desvio.

Padrão de desvio	Parâmetro a (CA e IA)	Parâmetro b (CA)	Parâmetro b (IA)
Sinergismo/antagonismo (S/A)	a>0: antagonismo a<0: sinergismo		
Dependente da razão da dose (DR)	a>0: antagonismo exceto quando o valor de b indica sinergismo a<0: sinergismo excepto quando o valor de b indica antagonismo	b>0: antagonismo quando a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo tóxico i b<0: sinergismo quando a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo tóxico i	
Dependente do nível da dose (DL)	a>0: antagonismo a um nível baixo de doses e sinergismo a um nível alto de doses a<0: sinergismo a um baixo nível de doses e antagonismo a um nível alto de doses	b>1: a mudança ocorre abaixo do valor de EC50 b=1: a mudança ocorre no valor de EC50 0<b<1: a mudança ocorre acima do valor de EC50 b<0: Não ocorre mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose	b>2: a mudança ocorre abaixo do valor de EC50 b=2: a mudança ocorre no valor de EC50 1<b<2: a mudança ocorre acima do valor de EC50 b<1: Não ocorre mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose