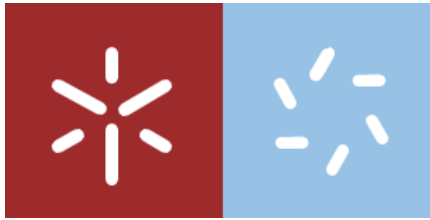




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Jéssica Zão Moreira

**Efeitos de microplásticos e do
fármaco fluorouracilo em
decompositores microbianos da
matéria orgânica nos rios**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Jéssica Zão Moreira

**Efeitos de microplásticos e do
fármaco fluorouracilo em
decompositores microbianos da
matéria orgânica nos rios**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biodiversidade,
Ecologia e Alterações Globais

Trabalho efetuado sob a orientação da
**Doutora Daniela Batista e da Professora
Doutora Fernanda Cássio**

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial

CC BY-NC

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

Agradecimentos

Agradeço à Daniela Batista e à professora Fernanda Cássio pela ajuda incansável de ambas. Agradeço, especialmente, à Daniela que esteve presente quando realizei a experiência de microcosmos e teve paciência e vontade para me ajudar, sempre com dedicação.

Agradeço igualmente aos meus pais Amélia e Fernando e à minha irmã Mariana por sempre acreditarem nas minhas capacidades enquanto estudante universitária apesar de, muitas vezes, o caminho ter sido desafiante.

Agradeço também à minha amiga Francisca pela motivação e por ter feito questão de estar sempre a par dos desenvolvimentos desta dissertação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado Pedro, por ter estado sempre lá para mim, desde uma palavra amiga até emprestar-me o seu computador quando não podia usar o meu.

A todos eles, um enorme obrigado. Por muitas coisas que diga ou faça, nada será suficiente para agradecer todo o apoio que me deram.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Efeitos de microplásticos e do fármaco fluorouracilo em decompositores microbianos da matéria orgânica nos rios

Resumo

A decomposição da matéria orgânica é um processo importante na reciclagem dos nutrientes e, como tal, desempenha um papel importante no funcionamento dos ecossistemas de água doce. Os principais responsáveis por este processo de decomposição são os fungos aquáticos designados como hifomicetos aquáticos. Estes microrganismos podem ser afetados pela presença de contaminantes na água como, por exemplo, os metais pesados, produtos farmacêuticos, nanoplásticos entre outros. Este estudo tem como objetivo avaliar os impactos dos nanoplásticos (NPs) e do medicamento anticâncer fluorouracilo (FU) no processo de decomposição da matéria orgânica vegetal por fungos aquáticos, avaliando a sua atividade e diversidade. Para tal, folhas de amieiro foram imersas num rio para possibilitar a colonização microbiana e, após 12 dias, foram expostas em microcosmos a nanoplásticos e a fluorouracilo, individualmente ou em mistura, durante 18 dias (fase de exposição). Subsequentemente, os contaminantes foram retirados do microcosmo e substituídos por água limpa e mantidos por 7 dias. Os nossos resultados mostraram que, na fase de exposição individual e misturas de NPs e FU, a perda de massa de folhas diminuiu significativamente. Uma estimulação da biomassa de fungos foi observada apenas para tratamentos expostos a FU e uma estimulação da taxa de esporulação foi observada na exposição a concentrações individuais maiores do que 1000 µg/L de FU. Na fase de recuperação observou-se um estímulo para alguns parâmetros analisados, nomeadamente na perda de massa das folhas, biomassa de fungos e taxa de esporulação. Algumas espécies de fungos aquáticos tornaram-se dominantes, (*Thriscelosporus* sp., *Articulospora tetracladia* e *Alatospora* sp.) e a estrutura da comunidade pela exposição aos contaminantes foi alterada em relação à fase de recuperação, uma vez que algumas espécies não foram encontradas na fase de exposição aos contaminantes. A mudança na composição de espécies neste estudo poderá representar uma mudança em direção na comunidade, que pode desempenhar um papel ecológico sob stress imposto por nanoplásticos e pelo fluorouracilo.

Os contaminantes ocorrem em misturas no meio ambiente. Os resultados destacam a importância de examinar o comportamento dos contaminantes não só individualmente mas, também, em misturas, de modo a determinar, de uma forma realista, os seus impactos no biota de água doce e nos processos dos ecossistemas por eles conduzidos. Estudos de ecotoxicidade ambiental, biorremediação e uma economia de plástico sustentável e circular, com estratégias baseadas em biotecnologia, são exemplos de soluções necessárias para minimizar os efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos.

Palavras chave: contaminantes; fluorouracilo; hifomicetos aquáticos; nanoplásticos.

Effects of microplastics and fluorouracil drug in microbial decomposers of organic matter in rivers

Abstract

The decomposition of organic matter is an important process in nutrient recycling and plays an important role in the functioning of freshwater ecosystems. The aquatic fungi called aquatic hyphomycetes are the main responsible for this decomposition process. These microorganisms can be affected by the presence of contaminants in the water, such as heavy metals, pharmaceuticals, nanoplastics, among others. This study aims to evaluate the impacts of nanoplastics (NPs) and the anticancer drug fluorouracil (FU) on the process of decomposition of plant organic matter by aquatic fungi, evaluating their activity and diversity. For this, alder leaves were immersed in a river to allow microbial colonization and, after 12 days, they were exposed in microcosms to nanoplastics and fluorouracil, individually or in a mixture, for 18 days (exposure phase). Subsequently, the contaminants were removed from the microcosm and replaced with clean water and kept for 7 days. Our results showed that, in the phase of individual exposure and mixtures of NPs and FU, the loss of leaf mass decreased significantly, a stimulation of fungal biomass was observed only for treatments exposed to FU and a stimulation of the sporulation rate was observed. on exposure to individual concentrations greater than 1000 µg/L of FU. In the recovery phase, a stimulus was observed for some parameters analyzed, namely in the loss of leaf mass, fungal biomass and sporulation rate. Some species of aquatic fungi became dominant, (*Thriscelosporus* sp., *Articulospora tetracladia* and *Alatospora* sp.) and the community structure by exposure to contaminants was altered in relation to the recovery phase, since some species were not found in the recovery phase. exposure to contaminants. The change in species composition in this study likely indicates a shift toward community, which may play an ecological role under stress imposed by nanoplastics and fluorouracil.

Contaminants occur in mixtures in the environment and our results highlight the importance of examining the behavior of contaminants individually and in mixtures in order to realistically determine their impacts on freshwater biota and also the ecosystem processes they drive. Environmental ecotoxicity studies, bioremediation and a sustainable and circular plastic economy and with biotechnology-based strategies are some of the necessary solutions to minimize the effects of contaminants in aquatic ecosystems.

Keywords: contaminants; fluorouracilo; aquatic hyphomycetes; nanoplastics.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Capítulo 1	1
1 - Introdução	1
1.1. Decomposição da matéria orgânica em ecossistemas de água doce	1
1.2. Papel do biota aquático na decomposição da matéria orgânica	2
1.3. Efeito dos nanoplásticos no biota aquático	3
1.4. Efeito do medicamento anticâncer fluorouracilo no biota aquático	5
1.5. Mistura de contaminantes nos ecossistemas aquáticos	7
1.6. Objetivo e esboço da tese	9
Capítulo 2	10
2- Materiais e métodos	10
2.1. Local de recolha da comunidade microbiana	10
2.2. Nano plásticos e o medicamento anticâncer fluorouracilo	10
2.3. Microcosmos	11
2.4. Recuperação da comunidade microbiana após exposição aos contaminantes	13
2.5. Perda de massa das folhas	13
2.6. Atividade da enzima β -glucosidase	13
2.7. Esporulação e biomassa fúngica	14
2.8. Análise estatística	14
Capítulo 3	15
3- Resultados	15
3.1. Efeitos da exposição aos nanoplásticos e ao fluorouracilo	15
3.1.1. Perda da massa de folhas	15
3.1.2. Atividade da enzima β -glucosidase	16
3.1.3. Biomassa de fungos	16
3.1.4. Taxa de esporulação dos fungos	17

3.2. Recuperação da exposição aos contaminantes	20
3.2.1. Perda da massa de folhas após libertação dos contaminantes	20
3.2.2. Atividade da enzima β -glucosidase após libertação dos contaminantes	20
3.2.3. Biomassa de fungos após libertação dos contaminantes	21
3.2.4. Taxa de esporulação dos fungos após libertação dos contaminantes.....	22
Capítulo 4.....	25
Discussão e conclusão	25
Perspetivas futuras	32
Referências	34

Índice de tabelas

Tabela 1- Parâmetros físico e químicos da água do rio Algeriz.....	10
Tabela 2- Tratamentos com nanoplásticos (NPs) e fluorouracilo (FU) em µg/L.	12
Tabela 3- Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 18 dias em microcosmos a diferentes concentrações de nanoplásticos (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L NPs) e fluorouracilo (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L FU). Misturas de 1 a 8, respectivamente (10 FU + 10 NPs; 10 FU + 100 NPs; 10 FU + 1000 NPs; 100 FU + 1000 NPs; 100 FU + 100 NPs; 1000 FU + 100 NPs; 1000 FU + 10 NPs; 1000 FU+ 1000 NPs).	18
Tabela 4- Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro após 18 dias de exposição a fluorouracilo (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L FU) e a nanoplásticos (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L NPs), libertadas do stress, lavadas e expostas a água limpa durante 7 dias. Misturas de 1 a 8, respectivamente (10 FU + 10 NPs; 10 FU + 100 NPs; 10 FU + 1000 NPs; 100 FU + 1000 NPs; 100 FU + 100 NPs; 1000 FU + 100 NPs; 1000 FU + 10 NPs; 1000 FU+ 1000 NPs).	23

Índice de figuras

Figura 1- Perda de massa de folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	15
Figura 2- Atividade da enzima β -glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	16
Figura 3- Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	17
Figura 4- Taxa de esporulação dos fungos aquáticos nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	19
Figura 5- Perda de massa de folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	20
Figura 6- Atividade da enzima β -glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e pré expostas por 25 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	21
Figura 7- Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e pré expostas por 25 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	22
Figura 8- Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 25 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).	24

Capítulo 1

1 - Introdução

1.1. Decomposição da matéria orgânica em ecossistemas de água doce

A vegetação a bordar os rios de floresta reduz a entrada de luz solar (Kałuza et al., 2020). Assim, nestes rios, os organismos dependem de matéria orgânica alóctona proveniente dos ecossistemas ribeirinhos como fonte de energia e carbono (Vannote et al., 1980; Minshall et al., 1985; Kominoski & Rosemond, 2012). A decomposição da matéria orgânica revela-se um processo importante na renovação de nutrientes e contribuindo positivamente para o funcionamento dos ecossistemas de água doce (Hättenschwiler, Tiunov & Scheu 2005; Findlay 2021; Handa et al., 2014; García-Palacios et al., 2016; Batista et al., 2017).

A decomposição da matéria orgânica apresenta três fases interdependentes, que podem se sobrepor no tempo: a lixiviação, o condicionamento microbiano, a fragmentação por invertebrados e a abrasão física (Ferreira et al., 2020). A lixiviação ocorre durante os primeiros dias (1 a 3 dias) após a entrada das folhas no rio e pensa-se que contribua para uma perda de cerca de 30% da massa foliar (Petersen & Cummins, 1974; Benfield, 1996). O condicionamento é a etapa em que as folhas são colonizadas por microrganismos, nomeadamente fungos e bactérias, facto que aumenta a palatabilidade das folhas para os invertebrados trituradores (Cummins, 1974). Devido à libertação de enzimas extracelulares, os fungos quebram os polímeros estruturais das células vegetais, assimilando e convertendo a matéria orgânica em dióxido de carbono e biomassa (Cummins & Klug, 1979). A fragmentação física e biótica das folhas, resultante da abrasão e pressão exercida pelo fluxo da água e da atividade dos invertebrados trituradores, conduz à libertação de matéria orgânica constituída por partículas finas (Cummins, 1974; Gessner et al., 1999). A fragmentação das folhas conduz ao aumento da área de exposição da folha ao meio ambiente, favorecendo assim a colonização microbiana. A taxa de perda de massa foliar por lixiviação e a duração desta fase estão dependentes das características da folha, que variam de acordo com a espécie de folha e com as condições ambientais, nas quais a lixiviação tende a ser maior em águas com temperaturas mais elevadas (Ferreira et al., 2020).

1.2. Papel do biota aquático na decomposição da matéria orgânica

Entre os micróbios aquáticos os fungos, em particular os hifomicetos aquáticos, são considerados como os principais decompositores da matéria orgânica vegetal devido à sua capacidade para produzir uma ampla gama de enzimas extracelulares (Dilly et al., 2004; Dilly et al., 2001; Osono 2017; Zhang et al., 2018) que ajudam a quebrar a lignocelulose das folhas que outros organismos são incapazes de decompor (Kjoller & Struwe 1982, Cooke & Rayner 1984, Berg & McClaugherty 2003, Bucher et al., 2004, Osono 2017, Zhang et al., 2018). Os fungos contribuem para o aumento da palatabilidade da folha e constituem uma potencial fonte de alimento para os invertebrados detritívoros (Gessner et al., 1999), estabelecendo, assim, um importante elo trófico entre as partículas grossas de matéria orgânica, como é o caso de restos de folha e de madeira, e os macroinvertebrados (Laitung et al., 2002). Os esporos, produzidos pelos fungos, apresentam formas tetraradiadas e sigmóides, o que lhes permite estabelecer vários pontos de contacto com os substratos. Além disso, estes esporos produzem mucilagem nas extremidades dos braços (Bärlocher, 1992), o que lhes facilita a fixação aos substratos que colonizam. Os hifomicetos aquáticos estão ainda adaptados a crescerem a temperaturas baixas como as encontradas em climas temperados durante o Outono e o Inverno (Suberkropp, 1984).

As bactérias, por sua vez, têm sido maioritariamente associadas à absorção e degradação de matéria orgânica dissolvida (DOM) (Kaplan & Newbold, 2003) enquanto as transformações de carbono em matéria orgânica particulada (CPOM) são principalmente um reflexo da capacidade degradativa do fungo (Baldy et al., 1995; Gessner, 1997). As bactérias tornam-se mais importantes nos últimos estágios da decomposição da folha, sendo que a sua contribuição para a ação microbiana na perda de massa da folha é geralmente baixa (até 14%) (Ferreira et al., 2020). A atividade dos invertebrados detritívoros na decomposição da matéria vegetal pode ser responsável por até 64% de perda de massa da folha (Ferreira et al., 2020). Existem, no entanto, rios onde os trituradores são naturalmente raros ou ausentes e onde a decomposição é principalmente assegurada por micróbios. O papel das algas é ainda pouco conhecido. Apesar de alguns estudos sugerirem que as algas podem estimular a decomposição da folha via iniciação microbiana, outros encontraram inibição ou nenhum efeito (Ferreira et al., 2020). Além disso, a concentração de nutrientes dissolvidos, partículas e disponibilidade em matéria orgânica dissolvida e a incidência de luz na água do rio influenciam o desenvolvimento de fungos, bactérias e algas em superfícies bentónicas. A temperatura e a dinâmica do fluxo de água são igualmente relevantes no

desenvolvimento de comunidades biológicas bentônicas (Hauer & Lamberti, 1996).

O processo de decomposição da matéria orgânica e os organismos envolvidos podem ser afetados pela presença de contaminantes na água, como por exemplo: os metais pesados. Contrariamente à maioria dos poluentes orgânicos, estes não são biodegradáveis podendo acumular-se nos tecidos vivos (Azevedo et al., 2009, Christophoridis et al., 2009, Song et al., 2013, Zhuang & Gao 2014, Lu et al., 2015). Numa experiência realizada por Du et al., (2017) é possível observar que nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) de três tamanhos diferentes (30, 90 e 200 nm) com a concentração de 100 mg/L afetaram negativamente o processo de decomposição de *Populus nigra* e houve uma diminuição significativa da biomassa microbiana e das suas atividades enzimáticas. Além disso, a biomassa microbiana, bem como a atividade das enzimas, variou consoante o tamanho das partículas. Batista et al., (2017a) observou que a decomposição da matéria orgânica é inibida, tal como a atividade (produção de enzimas e reprodução) dos organismos envolvidos como os fungos aquáticos quando expostos a concentrações ambientalmente realísticas de nanopartículas de prata e a nitrato de prata ($\mu\text{g/L}$).

Outro problema que afeta a decomposição da matéria orgânica por parte dos organismos é a eutrofização, uma vez que as algas limitam a penetração da luz e, conseqüentemente, reduzem o crescimento, podendo causar a morte de plantas. Diminui igualmente o acesso de predadores, que precisam de luz para capturar presas (Lehtiniemi et al., 2005), podendo levar a uma situação de hipóxia por parte dos organismos.

1.3. Efeito dos nanoplásticos no biota aquático

O uso de plásticos aumentou exponencialmente desde o século XIX, passando de 1,5 milhão de toneladas nos anos 50 para perto de 335 milhões de toneladas em 2016 (Larue et al., 2021). Todos os anos, apenas 6% dos resíduos plásticos do mundo são reciclados e cerca de 28% são descartados diretamente no meio ambiente, sendo o restante incinerado ou depositado em aterros. Os plásticos são pouco degradáveis e, por isso, são encontrados em todos os compartimentos ambientais, desde montanhas, rios e oceanos. Existem evidências de que os plásticos de tamanho mais pequeno ou mais velhos induzem uma maior toxicidade nos

organismos (Larue et al., 2021). Muitas das atividades diárias realizadas pelo Homem, como é o caso da lavagem de roupa, do uso de cremes e da pasta dos dentes, levam à libertação de plásticos no ambiente. As pastas dos dentes, por exemplo, podem conter mais de 4000 microesferas de plástico por cada 1,6 g. Uma vez que os micro e os nanoplásticos águas são difíceis de remover das águas residuais, acabam nos ecossistemas marinhos e de água doce (Boyle & Örmeci, 2020). Plásticos de tamanho micro são vetores de produtos químicos e contaminantes em ambientes aquáticos, acumulando-se nos organismos (Brennecke et al., 2016; Koelmans et al., 2016).

Hoje, a poluição por detritos e fragmentos de plástico foi reconhecida como um grande problema de qualidade da água em sistemas de água doce e marinha (Koelmans et al., 2015). As emissões de fontes terrestres alcançam primeiramente os rios, e as águas doces fornecem uma fonte importante da poluição marinha por plástico através do transporte fluvial. Além disso, alguns estudos encontraram concentrações de microplásticos em lagos e rios semelhantes ou maiores às encontradas em correntes oceânicas superficiais (por exemplo, Yonkos et al., 2014; Lechner et al., 2014; Mani et al., 2015), apesar da pesquisa sobre plásticos no ambiente marinho estar mais avançada do que no ambiente de água doce (Wagner et al., 2014). Apesar da vasta investigação sobre os plásticos no ambiente marinho, estudos indicam igualmente que os plásticos se acumulam facilmente em ambientes de água doce (Eerkes-Medrano et al., 2015; Baldwin et al., 2016). Eriksen et al., (2013) investigaram a contaminação por microplásticos da água superficial do Lago Erie, Huron e Superior oriental, localizado na América do Norte, onde foram encontradas uma média de 150, 503, 5391 e 2780 partículas/ km², respetivamente. Na Europa, Mani et al., (2015) realizaram amostragens em 11 locais do Rio Reno ao longo de um trecho de 820 km de Basileia, na Suíça, até Rotterdam, Holanda. Cada amostra recolhida continha microplásticos, 52364 - 3931062 partículas / km² com uma abundância média de 892.777 partículas / km. No lago Hovsgol localizado nas montanhas do norte da Mongólia, que faz parte de um Parque Nacional e é muito isolado da atividade antropogénica (apenas estando perto de duas aldeias com uma população de 5440 pessoas), Free et al., (2014) descobriram que as águas superficiais continham em média 20264 partículas / km², sendo que fragmentos (40%), filmes (38%) e fibras (21%) constituíram a maioria dos microplásticos recolhidos.

Os efeitos dos nanoplásticos (NPs) são ainda pouco conhecidos, em comparação com outras classes de tamanho de plástico e o seu estudo torna-se difícil devido à falta de métodos de deteção (Koelmans, 2015). Os microplásticos degradam-se no meio ambiente dando origem aos NPs (1µm), pela combinação de foto-oxidação por exposição aos raios ultravioleta, a altas temperaturas

e a humidade elevada (Andrady, 2011), e o seu crescente pequeno tamanho constitui uma ameaça mais significativa para a biota aquática do que os microplásticos. Estudos recentes mostraram que pequenas partículas de látex (<50 nm) podem acumular-se em peixes japoneses do arroz (testículos, fígado, sangue e cérebro) (Boyle & Örmeci, 2020) e que após uma exposição de 45 minutos, nanopartículas de 100 nm permanecem no corpo de *Mytilus edulis* e *Crassostrea virginica* por períodos mais longos que os microplásticos, e podem ser transportados para os órgãos digestivos (Lambert et al., 2017).

Em mexilhões (*M. edulis*), foi relatado uma redução da atividade de filtração (Besseling et al., 2014b). Nas algas, foi demonstrado que os NPs de poliestireno de 70 nm são capazes de reduzir a absorção de CO₂ e aumentar a produção de espécies reativas de oxigénio (Besseling et al., 2014b). Outros estudos mostraram que os NPs podem causar mudanças comportamentais, fisiológicas e metabólicas em peixes, como na carpa cruciana (*Carassius carassius*), inibição do crescimento em algas verdes (*Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.) e diminuição das taxas de fertilidade e reprodução em crustáceos *Daphnia magna* e *Tigriopus japonicus*. Recentemente, verificou-se que os NPs conseguem penetrar nas células vegetais (Boyle & Örmeci, 2020) e que a sua ingestão por larvas de peixe-zebra provoca neurotoxicidade e afeta a sua atividade locomotora (Mendoza et al., 2018).

1.4. Efeito do medicamento anticâncer fluorouracilo na biota aquática

Os produtos farmacêuticos constituem um problema a nível ambiental, inclusive no meio aquático. São considerados poluentes orgânicos persistentes, uma vez que entram no meio aquático predominantemente através dos efluentes de hospitais e das águas residuais de estações de tratamento, bem como lixiviados de aterros (Hernando et al., 2006). Certos grupos de produtos farmacêuticos são suspeitos de representar riscos para organismos não-alvo, mesmo em concentrações na gama das nano gramas por litro (Johnson et al., 2008).

O fluorouracilo (FU) é um agente anti-neoplásico que inibe a síntese e a função dos ácidos nucleicos. É usado para tratar diversos tipos de cancro, nomeadamente da mama, do cólon, do reto, do estômago e do pâncreas. Após a sua metabolização no fígado, os seus metabolitos, que são análogos ao uracilo, são incorporados no RNA e no DNA, interrompendo a função da timidilato

sintase ao bloquear o local de ligação para o monofosfato de desoxiuridina. Este medicamento tem baixa biodisponibilidade devido à sua rápida degradação e, durante a terapia do cancro, é administrado em combinação com outros fármacos para aumentar sua atividade (Longley et al., 2003).

Estudos realizados na década de 1970, nos EUA, revelaram a presença de vários produtos farmacêuticos em águas residuais (Nassour et al., 2020), sendo que a sua libertação nestas águas levantou preocupações relativamente a potenciais efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos (Johnson et al., 2008; Kümmerer, 2001). As águas residuais provenientes de hospitais e de esgotos domésticos mostraram ser fontes significativas de medicamentos anticancro nos ecossistemas aquáticos (Besse et al., 2012; Ferrando-Climent et al., 2014; Lai et al., 2018; Jureczko & Przystaś, 2019; Cristóvão et al., 2020). Por exemplo, efluentes hospitalares têm os maiores níveis de resíduos, com concentrações de ciclofosfamida (CP) variando entre 0,2 ng/L a 22,1 µg/L e frequências de deteção de 8% a 100% (Azuma et al., 2016; Catastini et al., 2008; Česen et al., 2016). Em águas residuais hospitalares no Brasil, as concentrações máximas encontradas de daunorrubicina (DAU), epirubicina (EPIR) e doxorrubicina (DOX) são respetivamente de 3,7 µg/L com frequências de deteção de 4,3%, 6,2 µg/L com frequências de deteção de 28,6% e 10,4 µg/L com frequências de deteção de 57,1% (Souza et al., 2018). Muitos medicamentos anticancro são poluentes orgânicos recalcitrantes, persistentes ou "pseudo-persistentes" (Buerge et al., 2006) e, muitas vezes, não são removidos por tratamentos secundários e terciários em estações de tratamento de águas residuais (ETARs), o que apresenta uma ameaça aos ecossistemas aquáticos (Olalla et al., 2018; Cristóvão et al., 2019; Yadav et al., 2020). Para além disso, os resultados mostraram que alguns medicamentos anticancro são hidrofílicos e pode persistir no ambiente aquático, como por exemplo a ifosfamida, ciclofosfamida e o fluorouracilo (Nassour et al., 2020). Apesar de ser limitada a quantidade de estudos sobre a toxicidade crónica, alguns testes mostraram que as concentrações detetadas na água foram maiores do que a concentração que provoca 50% do efeito (EC50). Isto implica que tais concentrações de medicamento anticancro na água provocam efeitos adversos a longo prazo ou/e quando eles estão presentes em misturas (Xie, 2012; Booker et al., 2014; Franquet-Griell et al., 2017; Santos et al., 2017). Num estudo, em *Xenopus laevis* foram observadas anormalidades após 120 h de exposição a fluorouracilo em concentrações de 50 a 1000 µg /L incluindo malformações intestinais, edema craniano e estagnação do desenvolvimento. O crescimento de embriões de peixes (*Pimephales promelas*) foi mais afetado pela exposição a fluorouracilo em

comparação com *X. laevis*, mostrando malformações mais graves para concentrações de exposição idênticas, sugerindo maior sensibilidade em comparação com as rãs (DeYoung et al., 1996). Num ensaio de toxicidade subcrônica, (estágio inicial de 33 dias teste de toxicidade) em peixe-zebra (*Danio rerio*), o valor NOEC foi de 1,0 mg /L (Kovács et al., 2016). Noutro estudo, o NOEC encontrado em ensaios de genotoxicidade (SCGE) após 24 h foi de 50,0 ng/L em *Daphnia magna* e em *Ceriodaphnia dubia* 6,0 ng/L, respetivamente (Parrella et al., 2015). Noutro estudo, o fluorouracilo não afetou a reprodução crónica de duas gerações teste com peixe zebra. No entanto, alterações hitopatológicas no fígado e rim e alguns efeitos genotóxicos, foram detetados com a menor concentração testada (10 ng/L). Misturas binárias das drogas fluorouracilo (FU), cisplatina (CisPt), etoposídeo (ET) e imatinibe (IM), em concentrações da ordem dos µg/L, foram responsáveis pela redução da descendência do crustáceo *Daphnia magna* (Parrella et al., 2014). Em algas e cianobactérias, os valores de NOEC foram maiores (10,0 e 120,0 mg /L, respetivamente) (Brezovšek et al., 2014).

1.5. Mistura de contaminantes nos ecossistemas aquáticos

Atualmente existe uma necessidade crescente de identificar as misturas de contaminantes no ambiente aquático e avaliar o seu potencial tóxico para os organismos aquáticos (Ribeiro et al., 2021). Os contaminantes como os NPs possuem a capacidade de absorver diferentes tipos de contaminantes orgânicos, como produtos farmacêuticos, podendo atuar como vetores desses contaminantes, quando ingeridos pelos organismos. Padrós et al., (2003) demonstraram que baixas doses de TBT (tributilestanho) (0,3 mg/Kg) injetadas intraperitonealmente em *Salvelinus alpinus* inibiram a ativação metabólica do BaP (benzaminopurina) através de uma alteração, dependente do tempo da indução da P4501A. Por sua vez, baixas doses de BaP (3 mg/Kg) parecem estimular o metabolismo de fase II do TBT e/ou sua excreção biliar. Wang et al., (2006),

sugerem que a exposição combinada ao TBT e BaP aumentam a vulnerabilidade do peixe *Salvelinus alpinu* ao stress oxidativo.

Os microplásticos, por exemplo, podem promover a bioacumulação de fármacos em organismos aquáticos como peixes e bivalves (Santos et al., 2021). Num estudo, Lu et al., (2018) expuseram o peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto a partículas de PS (partículas de polistereno) de 5 mm e a uma mistura de partículas e cádmio (10 mg/L) durante mais de 3 semanas de forma a estudar os efeitos da toxicidade crônica do cádmio via histopatologia, bem como stress oxidativo e genes funcionais. De acordo com este estudo, a presença de MPs aumentou a acumulação e toxicidade do Cd no fígado, intestino e brânquias do peixe-zebra. Num estudo, na microalga marinha (*Tetraselmis chuii*) exposta a MPs do pequeno tamanho (1 e 5 mm em diâmetro) e a produtos farmacêuticos nomeadamente procainamida ou doxiciclina, ou misturas de MPs com um dos fármacos, os resultados mostraram que as concentrações individuais de MPs não tiveram efeito significativo sobre a taxa de crescimento das algas, porém a toxicidade dos produtos farmacêuticos foi aumentada quando expostos em combinação com MPs (Triebkorn et al., 2019).

Noutro estudo realizado por Guilhermino et al., (2018) foi estudado o efeito de microplásticos e do medicamento florfenicol individualmente e em misturas em bivalves. Os bivalves foram expostos por 96 horas a florfenicol (1,8 e 7,1 mg/L), aos microplásticos (0,2 e 0,7 mg/L) e a misturas de ambos os contaminantes. As misturas de contaminantes causaram inibição da alimentação em 57-83% e o aumento das enzimas antioxidantes, mostraram induzir peroxidação lipídica e a atividade da enzima GST branquial. Foi, também, observada neurotoxicidade através da inibição de colinesterase cerebral (ChE) (44-57%) e inibição significativa de isocitrato desidrogenase (IDH) e indução de stress oxidativo. O efeito causado pela exposição das misturas de contaminantes contendo as maiores concentrações de microplásticos e florfenicol foi muito maior (83%) do que a soma dos efeitos causados pelos tratamentos atuando individualmente (40%).

No entanto, num estudo realizado por Oliveira (2018) observou-se que os efeitos causados pela exposição a MPs (0,13 mg/L) e mercúrio (0,03 mg/L), individualmente e em mistura, em vários biomarcadores, na espécie *Corbicula Fluminea* foram menores do que os efeitos induzidos pelas substâncias quando testadas individualmente. Neste trabalho foi realizada uma fase de recuperação aos contaminantes, no entanto os bivalves não recuperaram completamente da exposição aos MPs e ao mercúrio individualmente bem como em mistura. Após 8 dias de exposição à mistura foi observada uma diminuição significativa ($p \leq 0.05$) da taxa de filtração, das

atividades da glutathione redutase (GR), da glutathione peroxidase (GPx) e um aumento significativo da atividade da catalase (CAT) e dos níveis de peroxidação lipídica (LPO). O período de 6 dias em meio limpo revelou-se insuficiente para a recuperação completa dos bivalves às exposições a microplásticos, mercúrio e misturas, uma vez que se observou recuperação apenas em alguns biomarcadores. Assim, este estudo sugere que há antagonismo entre os dois poluentes nesta espécie.

1.6. Objetivo e esboço da tese

Para melhor entender os impactos dos nanoplasticos (NPs) e do medicamento anticancer fluorouracil (FU), individualmente ou em mistura, na decomposição da matéria orgânica por fungos de água doce, vários parâmetros de atividade e diversidade dos fungos aquáticos foram avaliados. O capítulo 1 fornece uma visão geral sobre a decomposição da matéria orgânica em rios e o biota associado a esse meso processo. O estado do conhecimento dos impactos dos NPs e do medicamento anticancer fluorouracil sobre o biota aquático também são abordados.

No capítulo 2, uma experiência em microcosmo foi realizada para avaliar os impactos dos NPs e do fluorouracil na decomposição por fungos de água doce presentes em rios. Para tal, folhas de amieiro foram imersas num rio no noroeste de Portugal para permitir a colonização microbiana. De seguida, as folhas colonizadas foram expostas a FU e NPs, individualmente ou em misturas. No capítulo 3, foram analisados os seguintes parâmetros funcionais: a perda de massa de folha, a taxa de esporulação, a biomassa dos fungos, a diversidade de espécies fúngicas e a avaliação da atividade da enzima β -glucosidase. Outro objetivo deste estudo foi perceber se estas comunidades microbianas teriam a capacidade de recuperar após exposição destes contaminantes. Para tal, após 18 dias de exposição a FU e NPs, as folhas colonizadas foram libertadas do stress, lavadas e expostas a água limpa durante 7 dias. Os parâmetros analisados foram os mesmos acima referidos.

Por fim, no capítulo 4, são apresentadas a discussão dos resultados obtidos, a conclusão e as perspetivas futuras.

Capítulo 2

2- Materiais e métodos

2.1. Local de recolha da comunidade microbiana

A comunidade microbiana foi recolhida num rio de baixa ordem (rio Algeriz, $41^{\circ} 58'63''N$ $8^{\circ} 22'513''W$). A vegetação ribeirinha era composta principalmente por amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) e o substrato do rio era composto por rochas e seixos. Os parâmetros físico-químicos foram medidos na água do rio, nomeadamente: a temperatura (12,4°C), o pH (6,5), a condutividade (36 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e o oxigénio dissolvido (124,4 %; 12,90 mg/l) com uma sonda multiparâmetrica de campo (Multiline F/set 3 no. 400327, WTW). Amostras de água do rio foram recolhidas e transportadas (4°C) para o laboratório e utilizadas em 24h para análises químicas, de forma a medir, por espectrofotometria, as concentrações de nitrato (Kit HACH, programa 8171), nitrito (kit HACH, programa 8507), amónia (kit HACH 8155) e fósforo (kit HACH, programa 8048) (tabela 1).

Tabela 1- Parâmetros físico e químicos da água do rio Algeriz.

Parâmetros	Valores
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	0,1
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	<0,1
N-NH ₃ ⁻ (mg/L)	>0,01
P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	>0,01

2.2. Nano plásticos e o medicamento anticancro fluorouracilo

Os nanoplasticos (NPs) utilizados na experiência são de poliestireno coloidal de baixa densidade (ALPHA Nanotech - Colloidal Polystyrene Nanospheres, low density, =100 nm) e o medicamento anticancro utilizado na experiência foi o 5-fluorouracilo (FU; $\geq 99\%$ HPLC grade) [2,4-Dihydroxy-5-fluoropyrimidine, CAS Number: 51-21-8] (Sigma-Aldrich).

2.3. Microcosmos

Folhas de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) foram recolhidas antes da abscisão e foram secas à temperatura ambiente em outubro de 2020. Posteriormente, as folhas foram lixiviadas em água desionizada antes de serem cortadas em discos de 12 mm de diâmetro. Conjuntos de 63 discos de folhas foram fechados em sacos de malha fina (0,5 mm, 16 × 20 cm) antes de serem imersos no rio, de forma a permitir a colonização microbiana e a impedir o acesso de invertebrados detritívoros. Após 12 dias, os sacos de folhas foram retirados do rio, colocados numa caixa térmica (4°C) e transportados para o laboratório para dar início às experiências de microcosmos. Os discos de folhas de cada saco foram lavados com água desionizada e colocados em frascos Erlenmeyer de 150 mL com 80 mL de água de fastio (Sílica - $9,6 \pm 2$ mg/L; pH (a 18 °C) - 6,0; Aniões: Hidrogenoc. (HCO_3^-) - $8,0 \pm 0,8$ mg/L; Cloreto (Cl^-) - $4,2 \pm 0,4$ mg/L; Sulfato (SO_4^{2-}) - $1,0 \pm 0,2$ mg/L; Catiões: Sódio (Na^+) - $4,1 \pm 0,4$ mg/L; Cálcio (Ca^{2+}) - $1,3 \pm 0,3$ mg/L; Potássio (K^+) - $0,6 \pm 0,1$ mg/L). Posteriormente, os microcosmos foram suplementados com concentrações de nanoplásticos e com fluorouracilo, individualmente ou em misturas, como se mostra na tabela 2. Um conjunto de microcosmos sem NPs ou fluorouracilo foi utilizado como controlo, e, para cada tratamento, foram realizadas 3 réplicas. Os microcosmos foram mantidos num agitador orbital (120 rpm) durante 25 dias a 16° graus, com renovação da água a cada 9 dias. As suspensões de esporos foram guardadas para a posterior contagem de esporos dos fungos aquáticos. Ao fim de 18 dias foram retirados discos de folhas para análise de parâmetros: atividade da enzima β -glucosidase, biomassa de fungos a partir de concentração de ergosterol e perda de massa das folhas. Os restantes discos foram utilizados na fase seguinte (secção 2.4) onde os contaminantes (NPs e FU) irão ser removidos para avaliar uma fase de recuperação pós-stress.

Tabela 2- Tratamentos com nanoplasticos (NPs) e fluorouracilo (FU) em µg/L.

Tratamento	Concentrações (µg/L)
1 FU	1
10 FU	10
100 FU	100
500 FU	500
1000 FU	1000
10000 FU	10000
1 NPs	1
10 NPs	10
100 NPs	100
500 NPs	500
1000 NPs	1000
10000 NPs	10000
10 FU + 10 NPs	10 + 10
10 FU + 100 NPs	10 + 100
10 FU + 1000 NPs	10 + 1000
100 FU + 1000 NPs	100 + 1000
100 FU + 100 NPs	100 + 100
1000 FU + 100 NPs	1000 + 100
1000 FU + 10 NPs	1000 + 10
1000 FU+ 1000 NPs	1000 + 1000

2.4. Recuperação da comunidade microbiana após exposição aos contaminantes

Ao fim de 18 dias, os microcosmos foram libertados do stress dos contaminantes, em que os discos de folhas de cada tratamento foram lavados com água desionizada para eliminação do contaminante e transferidas para microcosmos com água do fastio sem adição de contaminantes. Os microcosmos foram mantidos num agitador orbital (120 rpm), durante 7 dias a 16°. Após 7 dias foram retirados discos de folhas para análise dos seguintes parâmetros: atividade da enzima β -glucosidase, biomassa de fungos a partir de concentração de ergosterol e perda de massa das folhas.

2.5. Perda de massa das folhas

Os discos de folhas de cada microcosmo foram liofilizados (Christ alpha 2–4; B. Braun, Melsungen, Alemanha) durante, aproximadamente, 48h e em seguida foram pesados (\pm 0,001 g). Os conjuntos de discos de folhas antes da colonização de fungos foram usados para estimar o peso de massa seca inicial das folhas.

2.6. Atividade da enzima β -glucosidase

Uma vez que a enzima β -glucosidase está envolvida na degradação da celulose pelos fungos, a sua atividade foi medida para avaliar o efeito dos NPs e do contaminante FU nos fungos. Foi utilizado o substrato fluorescente, 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside (MUF; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), seguindo um protocolo de medição de atividade de enzimas extracelulares. Colocaram-se dois discos de folhas colonizadas em tubos de falcon de 15 mL com 4 mL de água e o substrato MUF da enzima foi adicionado a uma concentração final de 0,3 mM. Foram feitas soluções controlo (sem discos de folhas e sem substrato), e os padrões de MUF (0–100 μ M; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) preparados com água estéril. As amostras foram colocadas a agitar por 1h no escuro e, seguidamente, o tampão glicina foi adicionado (0,05 mM, pH 10,4; 4

mL) a cada amostra para parar a reação enzimática e maximizar a fluorescência de MUF. A fluorescência foi medida a 455 nm e a 365 nm (Thermo Scientific™ Fluoroskan Ascent™ FL).

2.7. Esporulação e biomassa fúngica

Foram recolhidas amostras de água dos microcosmos, contendo os esporos libertados pelos fungos que se encontravam nas folhas em decomposição. As suspensões de esporos foram fixadas com formaldeído (concentração de 2%) e, para evitar a aderência dos esporos aos frascos, foi adicionado Triton X-100. Os volumes apropriados dos meios foram filtrados e corados com azul de algodão a 0,05%. Os esporos dos fungos aquáticos foram contados (300 no mínimo) e identificados no microscópio ótico (400× Leica Biomed, Heerbrugg, Suíça) (Batista et al., 2017a). Conjuntos de cinco discos de folhas liofilizadas de cada microcosmo foram usados para determinar concentração de ergosterol como medida da biomassa fúngica nas folhas (Gessner, 2005). Para tal, os lipídios foram extraídos em 0,8% de solução KOH-metanol e aquecidos a 80 graus por 30 min. O ergosterol foi eluído em isopropanol e quantificado usando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, UltiMate3000 LCSystems, Thermo Scientific, CA, USA) com deteção do pico de ergosterol à absorvância de 282 nm. A eficiência de extração foi monitorizada usando uma série padrão de ergosterol (Fluka) em isopropanol.

2.8. Análise estatística

Para testar os efeitos individuais ou em mistura do fármaco fluorouracilo e nanoplásticos na perda de massa das folhas, da atividade enzimática, na biomassa de fungos e na taxa de esporulação, foram realizadas análises de um único fator (One-way-Anova) para concentrações individuais comparando tratamentos com o controlo, e análises de dois fatores (Two-way-Anovas) para o efeito de misturas dos dois contaminantes, seguidas de testes post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni (Zar, 2010). ANOVAs foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., San Diego, CA).

Capítulo 3

3- Resultados

3.1. Efeitos da exposição aos nanoplásticos e ao fluorouracilo

3.1.1. Perda da massa de folhas

As folhas de amieiro perderam cerca de 21,7% da sua massa após 18 dias de exposição aos contaminantes face ao controlo. A perda de massa foi significativamente afetada pela presença de NPs mas não de FU (Two-way ANOVA, $p= 0,02$ e $p= 0,73$ respetivamente), tendo havido um estímulo significativo da perda de massa com concentrações de 10 $\mu\text{g/L}$ de NPs (Fig.1 A). Nas misturas de contaminantes, houve uma diminuição da perda de massa e diferenças nas concentrações de 10 $\mu\text{g/L}$ FU e 100 $\mu\text{g/L}$ NPs. A interação entre FU e NPs, foi significativa (Two way ANOVA, $p < 0,001$; Fig.1 B).

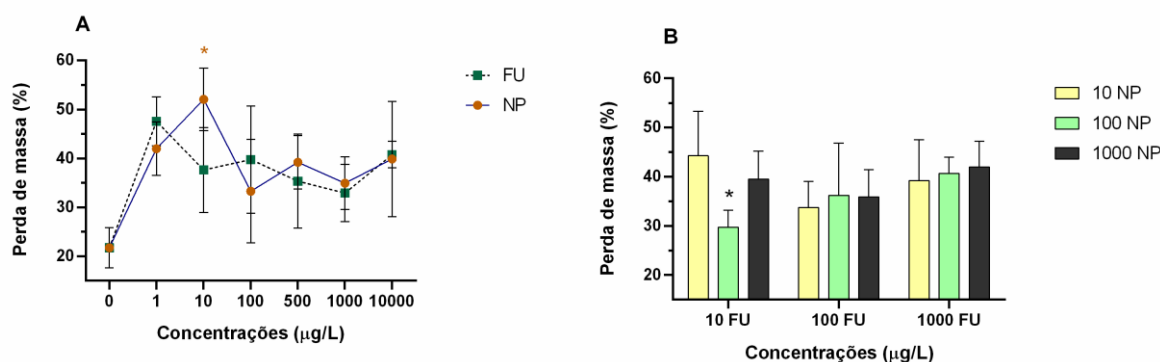


Figura 1- Perda de massa de folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.1.2. Atividade da enzima β -glucosidase

No tratamento controlo a atividade da enzima β -glucosidase foi de 3,38 $\mu\text{mol/g}$ folha seca/hora (Fig.2 A). Não houve estimulação nem inibição da atividade desta enzima nas comunidades microbianas expostas a cada um dos contaminantes (FU e NPs) individualmente ou em mistura (Two-way ANOVA, $p= 0,53$ e $p= 0,83$ respetivamente; Fig.2 A). Não existiu qualquer interação entre FU e NPs (Two-way ANOVA $p=0,03$; Fig.2).

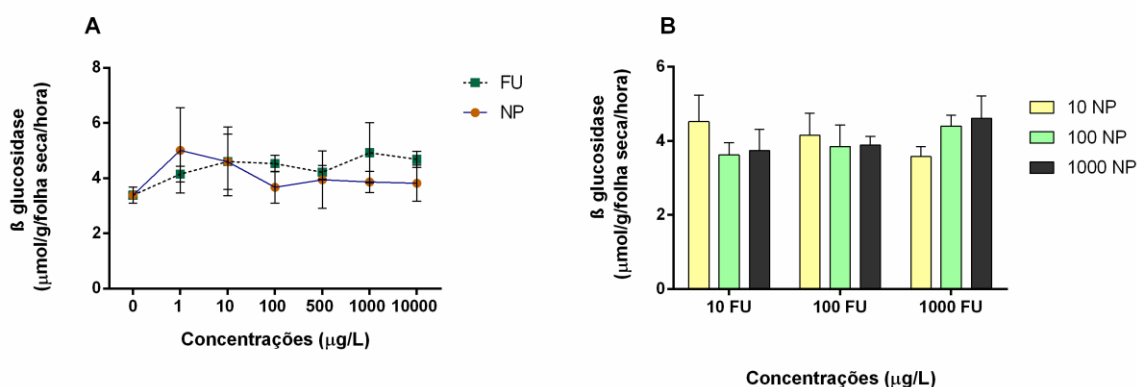


Figura 2- Atividade da enzima β -glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplasticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.1.3. Biomassa de fungos

No final de 18 dias de exposição aos contaminantes, o tratamento controlo mostrou uma concentração de ergosterol de 217,95 $\mu\text{g/g}$ de folha seca. A biomassa de fungos foi significativamente afetada pela presença de FU mas não de NPs (Two-way ANOVA, $p= 0,02$ e $p= 0,98$ respetivamente). Uma estimulação da biomassa de fungos foi observada na concentração de 10000 $\mu\text{g/L}$ de FU (Fig.3 A). As comunidades microbianas, quando expostas a misturas, não levaram a estimulação nem inibição deste parâmetro para FU e NPs (Two-way ANOVA $p=0,44$; Fig.3 B).

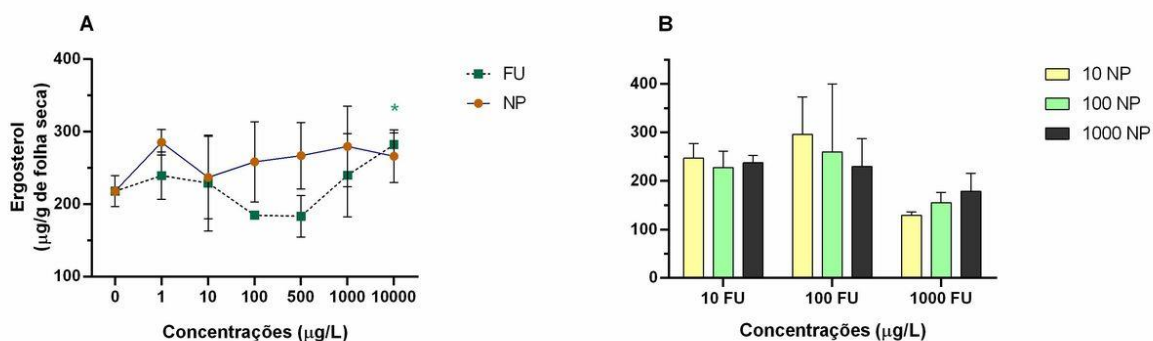


Figura 3- Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.1.4. Taxa de esporulação dos fungos

A partir da identificação de esporos de fungos aquáticos, observou-se que as espécies dominantes foram *Infundibura* sp. e *Lemonniera aquatica* tanto na presença individual dos contaminantes FU e NPs como em misturas. A espécie *Alatospora* sp. aumentou na presença de FU e de misturas, e a espécie *Anguillospora filiformis* apenas esteve presente na presença de FU. Observou-se ainda que a percentagem da espécie *Tetrachaetum elegans* manteve-se semelhante na presença de ambos os contaminantes e em misturas, no entanto, aumentou drasticamente na mistura com 1000 FU + 100 NPs ug/L (Tabela 3).

Tabela 3- Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 18 dias em microcosmos a diferentes concentrações de nanoplásticos (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L NPs) e fluorouracilo (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L FU). Misturas de 1 a 8, respectivamente (10 FU + 10 NPs; 10 FU + 100 NPs; 10 FU + 1000 NPs; 100 FU + 1000 NPs; 100 FU + 100 NPs; 1000 FU + 100 NPs; 1000 FU + 10 NPs; 1000 FU+ 1000 NPs).

	0	Nanoplásticos (µg/L)						Fluorouracilo (µg/L)						Misturas								
		1	10	100	500	1000	10000	1	10	100	500	1000	10000	1	2	3	4	5	6	7	8	
Espécie																						
<i>Alatospora</i> sp.	2.1	10.8	10.9	1.5	4.2	0.3	3.0	10.5	3.7	28.6	12.4	11.6	35	1.3	4.3	6.4	10.3	6.3	6.5	5.5	18.9	
<i>Anguillospora filiformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Articulospora tetracladia</i>	0.8	3.7	2.7	1.0	1.4	1.5	1.4	0.1	0.3	0.7	1.4	0.1	0.3	1.3	1.9	1.1	1.2	0.4	0.1	0.3	1.6	
<i>Infundibura</i> sp.	58.5	27.1	15.3	41.7	14.8	19.6	7.9	31	40.6	27.6	54.6	54.2	64.4	7	42.2	17.8	58.2	80.7	67.1	88.0	66.9	
<i>Lemonniera aquatica</i>	37.6	50	54.9	51.5	67.6	76.5	75.7	38.8	50	40.6	28.7	30.4	-	88.3	50.6	72.4	28.9	11.9	0.8	2.3	11.7	
<i>Tetrachaetum elegans</i>	0.5	0.8	1.2	1.3	1.2	0.4	0.7	2.1	1.6	0.9	1.4	1.0	0.3	0.8	0.7	1.3	0.4	0.2	24.3	-	0.1	
<i>Tricladium chaetocladium</i>	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	0.1	-	0.1	-	-	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1
<i>Tricladium splendens</i>	0.3	0.4	1.8	0.2	0.4	0.8	0.9	0.2	0.1	0.4	0.4	1.3	-	1.0	0.1	0.6	0.2	0.3	-	1.0	0.1	
<i>Triscelosporus</i>	0.2	7.3	13.1	2.8	10.3	0.9	10.2	17.3	3.3	1.2	1.1	1.4	0.1	0.3	0.1	0.2	0.7	0.1	1.0	2.3	0.7	
Nº de espécies	8	7	8	8	7	7	7	8	8	8	7	8	6	8	8	8	8	8	7	7	8	

Após 18 dias em microcosmos, a taxa de esporulação para o tratamento controlo foi de $1,48 \times 10^6$ esporos/mg de folha seca/dia. A taxa de esporulação foi significativamente afetada pela presença de FU. No entanto, não existiram diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos com NPs (Two-way ANOVA, $p < 0,001$ e $p = 0,08$ respetivamente; Fig.4 A). Uma estimulação da taxa de esporulação foi observada para tratamentos a partir de $1000 \mu\text{g/L}$ de FU (Fig.4 A). Observou-se uma estimulação nos tratamentos com misturas de $10 \mu\text{g/L}$ FU e $100 \mu\text{g/L}$ NPs; $10 \mu\text{g/L}$ FU e $1000 \mu\text{g/L}$ NPs e inibição nas concentrações de $100 \mu\text{g/L}$ FU e $100 \mu\text{g/L}$ NPs; $1000 \mu\text{g/L}$ FU e $10 \mu\text{g/L}$ NPs; $1000 \mu\text{g/L}$ FU e $1000 \mu\text{g/L}$ NPs (Two-way ANOVA $p < 0,01$; Fig.4 B).

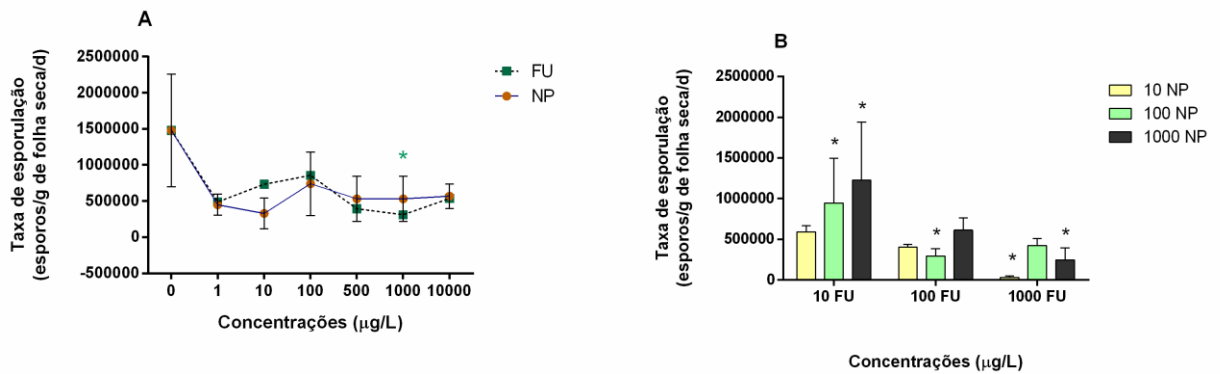


Figura 4- Taxa de esporulação dos fungos aquáticos nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplasticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.2. Recuperação da exposição aos contaminantes

3.2.1. Perda da massa de folhas após libertação dos contaminantes

Após 7 dias de recuperação, a perda de massa no tratamento controlo foi de 72%. Para este parâmetro, os tratamentos pré expostos a FU e NPs, individualmente ou em mistura, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo (Two-way ANOVA $p=0,78$ e $p=0,57$ respetivamente; Fig.5 A). Comparativamente com a fase de exposição aos contaminantes, existiu uma maior perda de massa na fase de recuperação, (7 dias) especialmente para o tratamento controlo (perda de massa de 50% em 7 dias).

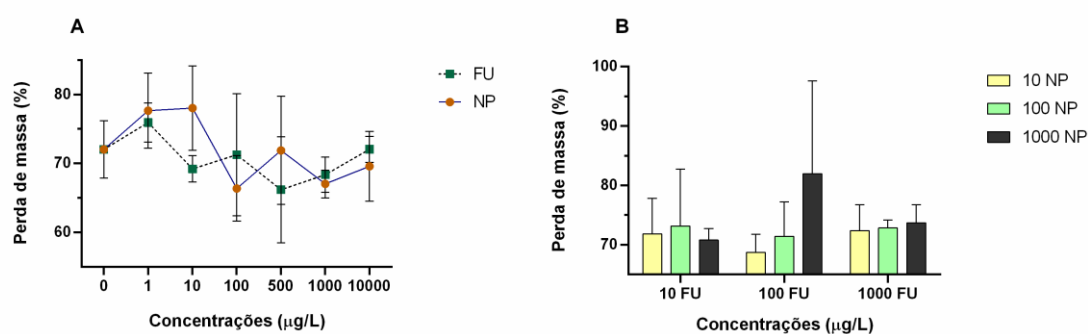


Figura 5- Perda de massa de folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e expostas por 18 dias a diferentes concentrações de nanoplásticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.2.2. Atividade da enzima β -glucosidase após libertação dos contaminantes

Após 7 dias de recuperação, a atividade da enzima β -glucosidase foi de $3,37 \mu\text{mol/g}$ folha seca/hora no tratamento controlo. A atividade da enzima não foi estimulada nem inibida em qualquer dos tratamentos pré expostos a FU e NPs, individualmente ou em mistura (Two-way ANOVA, $p= 0,67$ e $p= 0,82$ respetivamente; Fig.6 A). Comparativamente com a fase de exposição aos contaminantes, (FU e NPs), a atividade da enzima β -glucosidase foi muito semelhante.

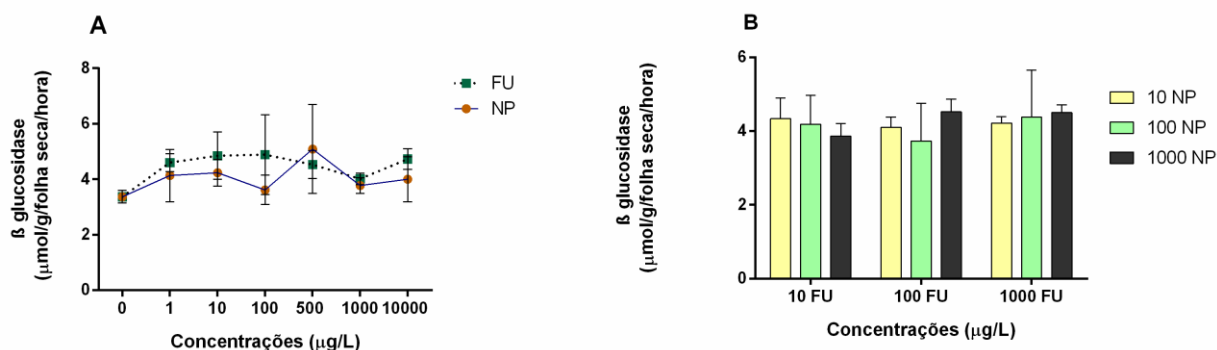


Figura 6- Atividade da enzima β -glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e pr e expostas por 25 dias a diferentes concentra es de nanopl asticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em rela a o ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.2.3. Biomassa de fungos ap os liberta a o dos contaminantes

No final da fase de recupera a o, a biomassa dos fungos, expressa por concentra a o de ergosterol, foi de 237,92 $\mu\text{g/g}$ de folha seca no controlo (Fig.7 A). Nos tratamentos pr e expostos a 10 $\mu\text{g/L}$ de NPs houve uma inibi a o da biomassa de fungos (two way ANOVA $p < 0,0001$; Fig.7 A). No entanto, nos tratamentos pr e expostos a 1000 $\mu\text{g/L}$ de FU e 1000 $\mu\text{g/L}$ de NPs houve uma estimula a o da biomassa de fungos (two way ANOVA $p < 0,0001$ e $p = 0,01$ respetivamente; Fig.7 A). Houve diferen as significativas em todos os tratamentos pr e expostos a mistura de contaminantes (Fig.7 B). Comparativamente com a fase de exposi a o aos contaminantes, (FU e NPs), houve uma estimula a o da biomassa dos hifomicetos aqu aticos durante os 7 dias de recupera a o.

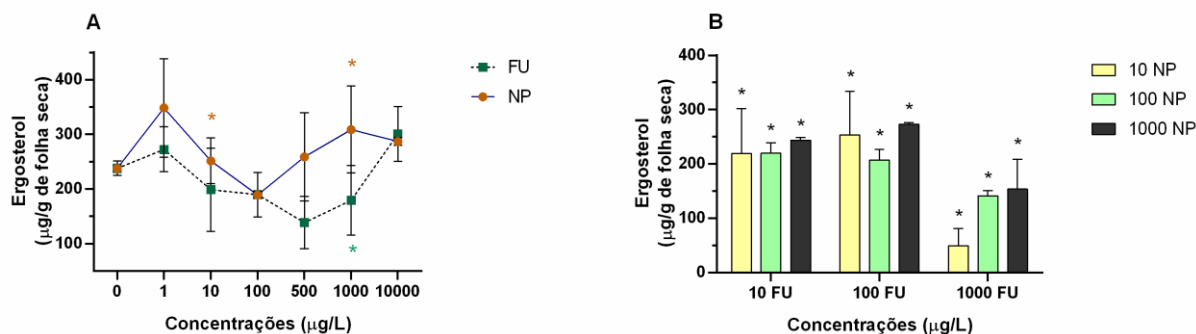


Figura 7- Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas por microrganismos no rio Algeriz e pré expostas por 25 dias a diferentes concentrações de nanoplasticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

3.2.4. Taxa de esporulação dos fungos após libertação dos contaminantes

A partir da identificação dos esporos de hifomicetos aquáticos foi possível encontrar as seguintes espécies que não foram encontradas na fase de exposição aos contaminantes: *Clavospora longibraciata*, *Lunulospora curvula*, *Triscelosporus acuminatos* e *Tetracladium setigerum*. As espécies dominantes nesta fase foram *Triscelosporus* sp., *Articulospora Tetracladia* e *Alatospora* sp. A espécie *Alatospora* sp. aumentou nos tratamentos pré expostos a FU, enquanto a espécie *Anguillospora filiformis* diminuiu. A espécie *Lunulospora curvula* apenas esteve presente nos tratamentos pré expostos a NPs e no controlo, tornando-se ausente nos tratamentos pré expostos a FU e em misturas. A espécie *Clavospora longibraciata* apenas esteve presente nos microcosmos pré expostos a misturas de 10 FU + 10 NPs µg/L. A espécie *Lemonniera aquatica* aumentou na pré presença de FU e, ainda mais, na pré presença de misturas de contaminantes (FU e NPs) (Tabela 4).

Tabela 4- Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro após 18 dias de exposição a fluorouracilo (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L FU) e a nanoplasticos (1, 10, 100, 500, 1000, 10000 µg/L NPs), libertadas do stress, lavadas e expostas a água limpa durante 7 dias. Misturas de 1 a 8, respectivamente (10 FU + 10 NPs; 10 FU + 100 NPs; 10 FU + 1000 NPs; 100 FU + 1000 NPs; 100 FU + 100 NPs; 1000 FU + 100 NPs; 1000 FU + 10 NPs; 1000 FU+ 1000 NPs).

Espécie	Nanoplásticos (concentração)							Fluorouracilo (concentração)						Misturas							
	0	1	10	100	500	1000	10000	1	10	100	500	1000	10000	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Alatospora</i> sp.	3.4	9.3	10	25.8	9	16.5	10.4	14.2	10.5	17.3	13.6	20.6	74.2	10.9	14.7	20.5	25	14.3	9.2	6.1	13.3
<i>Anguillospora filiformis</i>	-	-	-	0.3	0.4	0.1	1	0.5	0.4	-	-	-	-	0.4	0.1	0.6	0.3	4.2	0.3	1.8	-
<i>Articulospora tetracladia</i>	90.3	11.4	7.8	22.3	29.6	10.9	1.3	2.8	8.8	0.8	0.3	0.4	-	1.2	0.3	0.1	0.8	-	0.3	1.2	0.1
<i>Clavastospora longibraciata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Infundibura</i> sp.	-	1.1	0.1	5.2	1.1	7.6	0.1	0.8	4.6	4.6	6.5	4.3	16.6	0.4	0.4	0.7	0.9	2.8	3.2	36.2	1.7
<i>Lemonniera aquatica</i>	-	0.1	-	13.9	13.7	33.5	16	3.4	37	16.6	41.8	23.5	0.1	53.5	54.1	36.4	25.9	64.8	35.1	37.5	11.3
<i>Lunulospora curvula</i>	2.4	0.7	-	0.2	0.4	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tetrachaetum elegans</i>	0.8	3.7	1.4	4.3	1.1	3.4	1.6	8.9	2.2	0.1	-	0.2	0.2	1.1	1.8	1.5	6.2	4.2	-	3	0.3
<i>Tricladium chaetocladium</i>	-	-	0.6	0.3	0.1	0.1	-	0.6	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.2	-	0.1	0.2
<i>Tricladium splendens</i>	0.6	1.3	1	0.6	-	2.4	1.2	0.8	1.1	0.5	0.8	0.7	0.1	0.6	0.3	1.1	0.4	0.5	0.4	1.6	0.7
<i>Tetracladium setigerum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.8	-	-	-	0.1	-	-	-	-
<i>Triscelosphorus</i>	-	72.3	79	27	44.6	25.2	68.4	68	35.5	60.1	37	50.2	-	32	28.3	39	40.3	9.1	51.5	12.6	72.4
<i>Triscelosphorus acuminatus</i>	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nº de espécies	6	8	7	10	9	10	8	9	9	7	6	7	6	9	8	9	9	8	7	9	8

Após 7 dias de recuperação, a taxa de esporulação para o tratamento controlo foi de $1,24 \times 10^6$ esporos/mg de folha seca/dia (Fig.8 A). A taxa de esporulação foi significativamente afetada pela pré presença de FU (Two-way ANOVA $p= 0,02$), havendo estímulo da esporulação a partir do tratamento pré exposto a 500 $\mu\text{g/L}$. Pelo contrário, os tratamentos pré expostos a NPs não provocaram qualquer alteração na taxa de esporulação (Two-way ANOVA $p= 0,52$; Fig.8 A). Existiram diferenças significativas nos tratamentos pré expostos às misturas, uma vez que a esporulação foi estimulada no tratamento pré exposto a 100 FU e 1000 NPs $\mu\text{g/L}$ (Two-way ANOVA $p < 0,01$; Fig.8 B). Comparativamente com a fase de exposição aos contaminantes, (FU e NPs), houve uma estimulação da taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos.

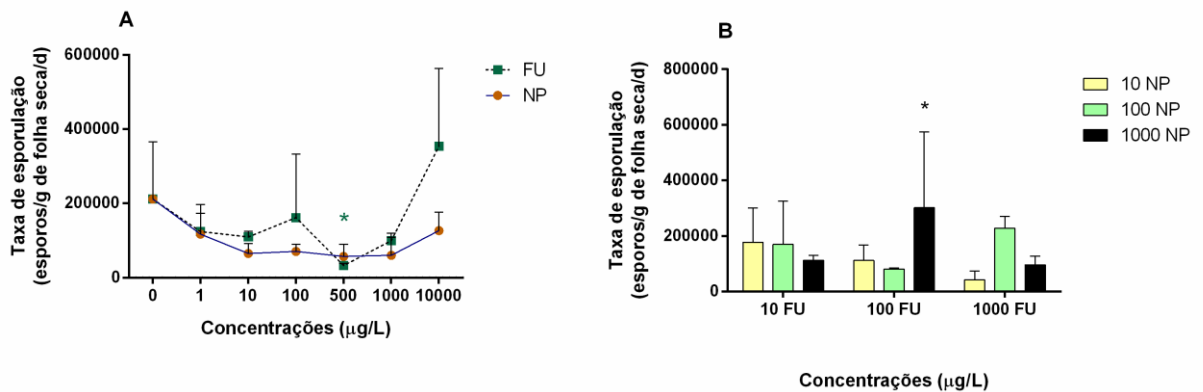


Figura 8- Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 25 dias a diferentes concentrações de nanoplasticos (NPs) e de fluorouracilo (FU) individualmente (A) e em misturas (B). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

Capítulo 4

Discussão e conclusão

Este estudo revelou que os nanoplásticos e o medicamento anticâncer fluorouracilo afetam o processo de decomposição da matéria orgânica dos rios, uma vez que alteram a estrutura da comunidade dos fungos presentes nas folhas em decomposição. O impacto destes contaminantes revelou-se mais pronunciado na perda de massa de folhas e na taxa de esporulação, comparativamente à atividade da enzima β -glucosidase e à biomassa de fungos. Na fase de exposição aos contaminantes, individualmente, as folhas de amieiro perderam 21,7% da sua massa face ao controlo (Fig.1 A), já na fase de recuperação aos contaminantes as folhas de amieiro perderam 72% da sua massa face ao controlo (Fig.5 A), indicando assim uma recuperação por parte dos hifomicetos aquáticos pré expostos aos contaminantes FU e NPs. Estes resultados indicam que as comunidades de fungos aquáticos podem recuperar da exposição aos contaminantes estudados.

A taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos aumentou da fase de exposição aos contaminantes para a fase de recuperação dos mesmos, tendo havido um estímulo acentuado a partir da pré exposição à concentração de 500 $\mu\text{g/L}$ (Fig.8 A). Na fase de recuperação, os microcosmos libertados dos contaminantes em misturas apresentaram um estímulo da taxa de esporulação na condição de pré exposição a 100 $\mu\text{g/L}$ FU e 1000 $\mu\text{g/L}$ NPs (Fig.8 B). Também na fase de libertação dos contaminantes foram encontradas espécies que não foram encontradas na fase de exposição aos contaminantes, nomeadamente *Clavospora longibraciata*, *Lunulospora curvula*, *Triscelosporus acuminatos* e *Tetracladium setigerum* (Tabela 4). Estes resultados sugerem que, se os contaminantes permanecerem nos rios, a dispersão e a sobrevivência dos fungos em águas doces poderão estar comprometidas com impactos na alimentação dos invertebrados que dependem da atividade dos fungos nos detritos das folhas (Batista et al., 2017a). Neste estudo observou-se que a exposição individual aos contaminantes foi variável por parte de fluorouracilo que estimulou, os nanoplásticos inibiram nos parâmetros dos fungos analisados e o efeito individual dos contaminantes foi maior do que o efeito destes em misturas.

Os efeitos dos stressores ambientais geralmente são testados individualmente. No entanto, na natureza, os organismos são frequentemente expostos a vários stressores em simultâneo,

podendo interagir produzindo impactos combinados sobre a biodiversidade e o funcionamento do ecossistema (Folt et al. 1999, Vinebrooke et al., 2004). Estudos demonstram que os nanomateriais afetam o funcionamento do ecossistema de água doce (Pradhan et al., 2011). Plásticos de tamanho micro e nano são vetores de produtos químicos contaminantes em ambientes aquáticos (Brennecke et al., 2016; Koelmans et al., 2016), induzindo toxicidade em toda a cadeia alimentar (Blair et al., 2017).

Neste estudo observou-se que na fase de exposição aos contaminantes as folhas de amieiro perderam 21,7% da sua massa face ao controlo (Fig.1 A), tendo havido um estímulo da perda de massa apenas pela presença de NPs (10 µg/L) individualmente e, em misturas, com uma diminuição significativa da perda de massa de folhas na presença de 10 µg/L FU e 100 µg/L NPs. Pelo contrário, na fase de recuperação, ou seja, onde se retiraram os contaminantes, as folhas de amieiro perderam 72% da sua massa face ao controlo e os tratamentos pré expostos a FU e NPs individualmente ou em mistura não apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo (Fig.5 A e B). A presença de contaminantes afetou a decomposição da matéria vegetal pelos microrganismos decompositores colocando este processo em causa, enquanto que perante a ausência de contaminantes este processo assemelha-se à perda de massa de folhas que acontece no ambiente natural. O que se observou está de acordo com Baldy et al., (2007) que refere que mudanças no estado trófico por causa das atividades humanas pode aumentar ou retardar a decomposição da matéria orgânica em rios, dependendo do equilíbrio entre a dependência de nutrientes e o efeito de substâncias tóxicas. Noutro estudo realizado por Du et al., (2022), concentrações de 1 e 100 µg/L de nanopartículas de polistereno tiveram efeitos adversos na decomposição de folhas em ecossistemas de água doce.

Os fungos aquáticos produzem uma variedade de enzimas extracelulares que degradam polissacarídeos complexos das paredes das células vegetais, incluindo: celulose, hemicelulose e lenhina, tornando o material da folha uma fonte mais apropriada de carbono e energia para os invertebrados trituradores (Suberkropp, 1998) que, por sua vez, transferem energia para níveis tróficos mais elevados (Graça & Canhoto, 2006). Neste estudo, esperava-se que a atividade da enzima β-glucosidase diminuísse na fase de exposição aos contaminantes e aumentasse na fase de recuperação. No entanto, observou-se que não houve estimulação nem inibição da atividade desta enzima, tanto individualmente como em misturas, quer nos fungos expostos quer libertados do stress dos contaminantes. No entanto, no estudo realizado por Batista et al., (2017b) observou-se que a atividade da enzima extracelular β-glucosidase dos fungos decompositores de água doce

foi inibida por concentrações aumentadas de nanopartículas de prata (AgNP) (25 e 100 mg/L⁻¹) (100; 50 e 60 nm). Contudo, as atividades enzimáticas (peroxidase e celobiohidrolase) do fungo da espécie *Aspergillus niger* foram inibidas por 10 e 100 µg/L de nanopartículas de polistereno (50–100 nm) (Du et al., 2022).

Uma possível explicação para o observado no neste estudo é que os fungos aquáticos possuem uma boa capacidade de produzir enzimas extracelulares na presença de concentrações muito baixas dos contaminantes estudados e/ou algumas espécies tolerantes asseguram as atividades enzimáticas. As alterações na estrutura das comunidades de fungos podem ter feito aumentar a contribuição de espécies mais tolerantes. Esterhuizen-Londt et al., (2016) examinaram a biotransformação do paracetamol por *Mucor hiemalis cepa* EH5 (DSM 14200) e mostrou que a absorção foi eficiente apenas em baixas concentrações (até 10 ng/mL) e, por um curto período de tempo (24 e 48 h). Outro estudo demonstrou que antidepressivos, como citalopram e fluoxetina, detetados em efluentes de ETARS (Kwon & Armbrust, 2006), foram eficientemente degradados por *Bjerkandera adusta* e *P. chrysosporium* (Rodarte-Morales et al., 2011), quando comparado com estratégias alternativas de degradação (Kwon & Armbrust, 2005). Outros medicamentos como diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno são rapidamente degradados pelo fungo *White rot*, atingindo níveis de degradação de 50% após 7 dias de incubação (Rodarte-Morales et al., 2011). Apesar da maior parte destes estudos serem realizados com fungos terrestres, não se pode descurar a possibilidade de os fungos aquáticos responsáveis pela degradação das folhas serem capazes de degradar certos compostos como as NPs ou FU. Assim sendo, deveriam existir mais estudos sobre como os contaminantes presentes em água doce afetam a atividade das enzimas de fungos, uma vez que alguns deles podem ser usados para a biorremediação de contaminantes. O ergosterol é um esteroide presente na membrana plasmática de fungos que possui um núcleo molecular com quatro anéis carbônicos, sendo produzido por fungos superiores e tem funções importantes na regulação da fluidez e integridade da membrana plasmática (Dupont et al., 2012). A medição do ergosterol costuma ser utilizada como procedimento clássico para medir a biomassa dos fungos filamentosos (Granade et al., 1985). Observou-se que o ergosterol na fase de exposição aos contaminantes (FU e NPs) foi significativamente estimulado pela presença de 10000 µg/L quando exposto a concentrações individuais dos contaminantes (Fig.3 A). A biomassa de fungos, quando exposta a misturas, não foi estimulada nem inibida (Fig.3 B). No entanto, na fase de recuperação da exposição aos contaminantes, foi inibida nos microcosmos pré expostos a 10 µg/L de NPs (Fig.7 A). No entanto, nos microcosmos pré expostos a 1000 µg/L de FU e 1000 µg/L de

NPs houve uma estimulação da biomassa de fungos (Fig.7 B). Em misturas houve uma estimulação em todas condições de pré exposição, e, face à fase de exposição de contaminantes, houve uma estimulação de biomassa de fungos na fase de recuperação.

Os poucos estudos relativos aos impactos de nanopartículas no processo de decomposição da matéria orgânica dos rios revelaram que a decomposição das folhas, da biomassa microbiana e da reprodução de fungos são inibidas pela exposição a nanopartículas de prata e prata iónica (Pradhan et al., 2011). Numa experiência com a alga verde *Scenedesmus obliquus* foi observado que a taxa de crescimento e o conteúdo de clorofila-a diminuiu significativamente após a exposição a 1 µg/L NPs (70 nm) (Besseling et al., 2014a). Também a co-exposição a micro/nano-plásticos e a outros poluentes pode resultar em danos oxidativos nos organismos. Além disso, o tamanho das partículas de plástico também afetou a toxicidade combinada (Bhagat et al., 2021; Magara et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Shi et al., 2020).

Observou-se que na fase de exposição aos contaminantes (FU e NPs), as espécies dominantes foram *Ifundibura* e *Lemonniera aquatica* tanto na presença individual aos contaminantes FU e NPs, exceto na concentração mais elevada de FU (10 mg/L), como em misturas (Tabela 3). Pelo contrário, na fase de recuperação aos contaminantes as espécies dominantes foram *Triscelosporus* sp., *Articulospora tetracladia* e *Alatospora* sp. A espécie *Anguillospora filiformis*, apenas esteve presente em microcosmos com FU na fase de exposição aos contaminantes. No entanto, na fase de recuperação dos mesmos, diminuiu na pré presença de FU (Tabela 4). Concluiu-se que a percentagem de espécies modificou-se da fase de exposição aos contaminantes para a fase de recuperação dos mesmos pois, nesta fase de recuperação foram encontradas as seguintes espécies que não foram encontradas na fase de exposição aos contaminantes: *Clavospora longibraciata*, *Lunulospora curvula*, *Triscelosporus acuminatos* e *Tetracladium setigerum*.

Já foi observado que a presença de contaminantes modifica a estrutura das comunidades de fungos. A mudança na composição em espécies sob stress provavelmente indica uma mudança em direção a uma comunidade que pode desempenhar um papel ecológico sob stress (Pradhan et al., 2011) como o observado no nosso estudo. A espécie fúngica dominante no trabalho realizado por (Pradhan et al., 2011) foi *A. tetracladia* uma vez que foi estimulada por exposição a todos os compostos, exceto à prata iónica. Além disso, a espécie codominante *Flagellospora* sp. foi inibida por exposição a metais nano ou iónicos, sendo substituída por *H. lugdunensis* nas maiores concentrações dos contaminantes. *A. tetracladia* e *H. lugdunensis* ocorrem em rios

contaminados com metais e algumas destas espécies mostraram-se resistentes a altas concentrações de metais (Pradhan et al., 2011).

Neste estudo foi observada, na fase de exposição aos contaminantes, uma estimulação da taxa de esporulação para tratamentos a partir de 1000 µg/L de FU mas não para tratamentos com NPs (Fig.4 A). No entanto, em misturas, existiu estimulação da esporulação (Fig.4 B). Também na fase de recuperação, a taxa de esporulação foi significativamente afetada nos tratamentos pré expostos a FU (>500 µg/L) (Fig.8 A). Comparativamente com a fase de exposição aos contaminantes, (FU e NPs), houve uma estimulação da taxa de esporulação dos hifomicetos. Apesar de krauss et al., (2001) terem estudado o efeito dos metais, também foi possível observar um efeito negativo na diversidade e na esporulação dos hifomicetos aquáticos. A taxa de esporulação é um dos parâmetros mais sensíveis para avaliar a toxicidade de certos compostos, uma vez que quando a produção reprodutiva fúngica é afetada, pode comprometer ainda mais a dispersão e sobrevivência de fungos em água doce com impactos para invertebrados que se alimentam de folhas e que dependem da atividade fúngica. Além disso, outros estudos apontam para a reprodução de hifomicetos aquáticos como uma medida sensível da qualidade da água com possíveis aplicações em programas de avaliação do estado dos ecossistemas de rio (Pradhan et al., 2011).

Neste estudo observou-se que durante a exposição individual aos contaminantes existirão estímulos por parte de fluorouracilo e inibição por parte dos nanoplásticos nos parâmetros analisados e o efeito individual dos contaminantes foi maior do que o efeito destes em misturas. Numa experiência realizada por Oliveira et al., (2018) onde foram estudados os efeitos de misturas de microplásticos e mercúrio na espécie *Corbicula fluminea* e a recuperação pós exposição, observou-se que a toxicidade da mistura de contaminantes foi menor do que a toxicidade induzida apenas pelos contaminantes individualmente, tal como observámos no nosso estudo. No entanto, os efeitos de cloreto de benzalcônio (BCA) individualmente e em mistura binária com o medicamento anticâncer fluorouracilo na alga *Pseudokirchneriella subcapitata* mostrou que os efeitos em mistura foram maiores do que os efeitos individuais (Elersek et al., 2018), contrariamente ao observado no nosso estudo.

Um estudo realizado por Guilhermino et al., (2018) estudou o efeito de microplásticos e do medicamento florfenicol individualmente e em misturas em bivalves. Os bivalves foram expostos por 96 horas a florfenicol (1,8 e 7,1 mg/L), aos microplásticos (0,2 e 0,7 mg/L) e a misturas de ambos os contaminantes. As misturas de contaminantes causaram inibição da alimentação em (57-83%) e aumento da atividade das enzimas antioxidantes, dos níveis de peroxidação lipídica e

da atividade da enzima GST branquial. Existiram também indícios de neurotoxicidade por parte da inibição de colinesterase cerebral (ChE) (44-57%) e inibição significativa de isocitrate dehydrogenase (IDH) e stress oxidativo. O efeito causado pela exposição das misturas de contaminantes contendo as maiores concentrações de microplásticos e florfenicol revelou-se muito superior (83%) à soma dos efeitos causados pelos tratamentos atuando individualmente (40%).

Na fase de recuperação, isto é, quando libertámos os microcosmos dos contaminantes, a perda de massa foliar, a biomassa de fungos e a taxa de esporulação foram parâmetros que após 7 dias recuperaram em relação à exposição aos contaminantes. No entanto, a atividade da enzima β -glucosidase manteve-se semelhante tanto na fase de exposição aos contaminantes, como na fase de recuperação dos mesmos, o que poderá ser contraditório em relação ao nosso estudo. No estudo de Oliveira et al., (2018) observou que na fase de recuperação aos contaminantes, os bivalves não recuperaram completamente da exposição aos microplásticos e ao mercúrio aplicados individualmente e em mistura. Após 8 dias de exposição à mistura foi observada uma diminuição significativa da taxa de filtração, das atividades da glutathione reductase (GR) e da glutathione peroxidase (GPx) e um aumento significativo da atividade da catalase (CAT) e dos níveis de peroxidação lipídica (LPO). O período de 6 dias em meio limpo revelou-se insuficiente para a recuperação completa dos bivalves à exposição a microplásticos, mercúrio e a misturas, uma vez que se observou recuperação apenas em alguns biomarcadores. Estas observações estão em concordância com o nosso estudo já que neste houve recuperação de todos os parâmetros analisados, com a exceção da enzima β -glucosidase.

Num estudo realizado por Batista et al., (2012), determinou-se os efeitos do cádmio e da temperatura na decomposição da matéria orgânica, na diversidade, na atividade de fungos aquáticos e no consumo de folhas por *Limnephilus* sp. Os animais foram expostos ao cádmio durante 4 dias e, em seguida, foram libertados do contaminante de forma a se alimentarem por 5 dias a 15° C. Concluíram neste estudo que no microcosmos de controlo, os trituradores consumiram 54% da massa foliar em 5 dias. Verificou-se também que o consumo de folhas pelos trituradores foi fortemente inibido pela pré-exposição a concentrações de cádmio de $>0,01 \text{ mg/L}^{-1}$. Na alimentação pós-exposição o consumo de folhas foi inibido em 50% na concentração de cádmio, verificando-se assim que os invertebrados não recuperaram na fase de recuperação ao contaminante, contrariamente ao que se observou no nosso estudo já que neste houve recuperação de todos os parâmetros analisados exceto da enzima β -glucosidase.

Uma vez que os contaminantes ocorrem, geralmente, no ambiente aquático em misturas

(Cleuvers, 2002; 2003) e como em alguns parâmetros dos fungos existiu recuperação da exposição, tanto individualmente como em misturas de contaminantes, os resultados destacam a importância de examinar o comportamento dos contaminantes, individualmente e em misturas, de forma a determinar, de forma realista, os seus impactos no biota de água doce mas, também, nos processos dos ecossistemas por eles conduzidos.

Perspetivas futuras

Os estudos de ecotoxicidade ambiental têm tido constituem um fator importante de na proteção do ambiente, uma vez que determinam os efeitos potenciais de contaminantes e outros stressores sobre indivíduos, populações e comunidades. É necessário compreender as respostas adaptativas de indivíduos aos stressores presentes no ambiente, principalmente contaminantes químicos, e os impactos nas mudanças comportamentais ao nível individual, populacional e da comunidade (Ford et al., 2021). Os estudos ecotoxicológicos são escassos (Webb, 2001) e apenas um número reduzido deles contém dados sobre a toxicidade em misturas de contaminantes. No entanto, estes estudos são muito importantes, uma vez que os contaminantes ocorrem geralmente no ambiente aquático em misturas (Cleuvers, 2002; 2003). Curvas de dose-resposta previstas das misturas de antibióticos são usadas com base nos modelos clássicos utilizados em toxicologia para prever a toxicidade esperada de misturas sob aditividade: Adição de Concentração (CA) e Independente Ação (IA), de forma a validar as interações de contaminantes previstas pelo Índice de Combinação (CI) nas diferentes misturas de contaminantes (González-Pleiter et al., 2013). Assim sendo, a modelagem ecotoxicológica realista deve incluir estimativas adequadas da probabilidade de funções dos vários parâmetros característicos da população dinâmica e as concentrações letais (LCs) devem ser interpretadas com cautela, de forma a estimar exposições sustentáveis no nível da população. Os modelos de simulação são uma ferramenta necessária e adequada para determinar os efeitos, quer em experiências de mesocosmo ou *in situ* (Ares, 2003).

Uma solução para minimizar os efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos é a biorremediação, um processo biológico de descontaminação que explora as diversas habilidades metabólicas dos microrganismos para converter contaminantes em produtos inofensivos por mineralização, geração de óxido de carbono e água ou por conversão em biomassa microbiana (Baggott 1993; Mentzer & Eber 1996). Contudo, mais estudos são necessários para desenvolver e projetar tecnologias de biorremediação que sejam apropriadas para locais tratando misturas complexas de contaminantes que não estão uniformemente dispersos no ambiente. Não há dúvida de que a biorremediação é uma necessidade do mundo atual e que esta pode levar à proteção e preservação dos recursos naturais. Também a designação, construção e operação de sistemas de esgoto adequados, especialmente em grandes cidades, desempenha um papel importante no controlo de águas residuais municipais que contém uma variedade de micropoluentes (incluindo antibióticos). A melhoria da eficiência do tratamento de águas residuais com tecnologia avançada, monitoramento rigoroso da qualidade do efluente e deteção oportuna de descargas não tratadas

de setores comerciais e industriais podem ajudar a prevenir incidentes graves de poluição e efeitos tóxicos a longo prazo (Anh, et al., 2021). Estratégias para resolver o problema da poluição dos microplásticos devem-se focar no controle da fonte comumente alcançado pela legislação e programas de conscientização ambiental, remediação e limpeza. Existem algumas medidas legislativas já em vigor para diminuir a libertação de microplásticos. Desde 2017, os EUA já proibiram a existência de esferas de microplástico usadas nos produtos cosméticos. Muitos outros países, incluindo Austrália, Canadá ou União Europeia (UE) estão também a pensar em implementar medidas eficazes no mesmo sentido. No entanto, as soluções baseadas em bioengenharia precisam de muita investigação para torná-las adequadas em larga escala. É, claramente, necessário avançar para uma economia de plástico sustentável e circular e de estratégias baseadas em biotecnologia (Picó & Barceló 2019).

Referências

- Altenburger, R., Brack, W., Burgess, R. M., Busch, W., Escher, B. I., Focks, A., Mark Hewitt, L., Jacobsen, B. N., de Alda, M. L., Ait-Aissa, S., Backhaus, T., Ginebreda, A., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Neale, P. A., Schulze, T., Schymanski, E. L., Teodorovic, I., & Krauss, M. (2019). Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-17.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Anh, H. Q., Le, T. P. Q., Da Le, N., Lu, X. X., Duong, T. T., Garnier, J., Newall, E.R., Zhang, S., Oh, N. H., Oeurng, C., Ekkawatpaint, C., Nguyen, T. D., Nguyen, Q.T., Nguyen, T.D., Nguyen, T.N., Tran, T.L., Kunisue, T., Tanoue R., Takahasi, S., Minh, T. B., Le, H., T., Pham, T.N.M., & Nguyen, T.A.H. (2021). Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives. *Science of The Total Environment*, 764, 142865, 1-16.
- Ares, J. (2003). Time and space issues in ecotoxicology: Population models, landscape pattern analysis, and long-range environmental chemistry. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(5), 945-957, 1-13.
- Azevedo, J. S., Serafim, A., Braga, E. S., Fávoro, D. I., & Bebianno, M. J. (2009). Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. *Ecotoxicology*, 18(8), 1001-1010.
- Azuma, T., Arima, N., Tsukada, A., Hiram, S., Matsuoka, R., Moriwake, R., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., Mino, Y., Hayashi, T., Fujita, Y., & Masada, M. (2016). Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Science of the Total Environment*, 548, 189-197.
- Baldy, V., Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1995). Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *Oikos*, 93-102.
- Baldy, V., Gobert, V., Guérol, F., Chauvet, E., Lambrigt, D., & Charcosset, J. Y. (2007). Leaf litter breakdown budgets in streams of various trophic status: effects of dissolved inorganic nutrients on microorganisms and invertebrates. *Freshwater Biology*, 52(7), 1322-1335.
- Baggott, J. E. (1993). Biodegradable lubricants. *Shell International Petroleum*.
- Baldwin, A. K., Corsi, S. R., & Mason, S. A. (2016). Plastic debris in 29 Great Lakes tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environmental science & technology*, 50, 10377-10385.
- Bärlocher, F. (1992). Research on aquatic hyphomycetes: historical background and overview. *In The ecology of aquatic hyphomycetes* (pp. 1-15). Springer, Berlin, Heidelberg.

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

Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2017a). How do physicochemical properties influence the toxicity of silver nanoparticles on freshwater decomposers of plant litter in streams?. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 148-155, 1-7.

Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2017b). Temperature modulates AgNP impacts on microbial decomposer activity. *Science of The Total Environment*, 601, 1324-1332, 1-9.

Benfield, E. F. (1996). Leaf breakdown in stream ecosystems. *Methods in stream ecology*, 579-590.

Berg, B., & MacCaugherty, C. (2003). Plant litter decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer Verlag.

Besse, J. P., Latour, J. F., & Garric, J. (2012). Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs?. *Environment international*: 39(1), 73-86.

Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., & Koelmans, A. A. (2014a). Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental science & technology*, 48(20), 12336-12343, 1-8.

Besseling, E., Foekema, E. M., & Koelmans, A. A. (2014b). Preliminary investigation of microplastic in the management area of water board rivierenland. Wageningen University, Wageningen, *The Netherlands*, 1-18.

Bhagat, J., Nishimura, N., & Shimada, Y. (2021). Toxicological interactions of microplastics/nanoplastics and environmental contaminants: Current knowledge and future perspectives. *Journal of hazardous materials*, 405, 123913.

Boyle, K., & Örmeci, B. (2020). Microplastics and nanoplastics in the freshwater and terrestrial environment: a review. *Water*, 12(9), 2633, 1-29.

Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195, 1-7.

Brezovšek, P., Eleršek, T., & Filipič, M. (2014). Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water research*, 52, 168-177.

Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M & Creer, S. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature communications*, 8(1), 1-11.

Blair, R. M., Waldron, S., Phoenix, V., & Gauchotte-Lindsay, C. (2017). Micro-and nanoplastic pollution of freshwater and wastewater treatment systems. *Springer Science Reviews*, 5(1), 19-30, 1-12.

- Booker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., & Williams, R. (2014). Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Science of the Total Environment*: 473, 159-170.
- Bucher, V. V. C., Hyde, K. D., Pointing, S. B., & Reddy, C. A. (2004). Production of wood decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by marine ascomycetes and their anamorphs. *Fungal Diversity*, 15, 1-14.
- Buerge, I. J., Buser, H. R., Poiger, T., & Müller, M. D. (2006). Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental science & technology*, 40(23), 7242-7250.
- Catastini, C., Mullot, J. U., Boukari, S., Mazellier, P., Levi, Y., Cervantes, P., & Ormsby, J. N. (2008). Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *European Journal of Water Quality*, 39, 171-180.
- Česen, M., Eleršek, T., Novak, M., Žegura, B., Kosjek, T., Filipič, M., & Heath, E. (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and their mixtures. *Environmental pollution*, 210, 192-201.
- Christophoridis, C., Dedepside, D., & Fytianos, K. (2009). Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. *Journal of hazardous materials*, 168(2-3), 1082-1091.
- Cleuvers, M. (2002). Aquatic ecotoxicology of selected pharmaceutical agents- algal and acute daphnia tests. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 14(2), 85-89.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology letters*, 142(3), 185-194.
- Cooke, R.C & Rayner, A.D.M. (1984). Ecology of saprotrophic fungi. London. *New York*.
- Cristóvão, M. B., Janssens, R., Yadav, A., Pandey, S., Luis, P., Van der Bruggen, B., Dubey, K.K., Mandal, M.K., Crespo, J.G., & Pereira, V. J. (2020). Predicted concentrations of anticancer drugs in the aquatic environment: What should we monitor and where should we treat? *Journal of Hazardous Materials*: 392, 122330.
- Cristóvão, M. B., Torrejais, J., Janssens, R., Luis, P., Van der Bruggen, B., Dubey, K. K., Mandal, M.K., Bronze, M.R., Crespo, J.G., & Pereira, V. J. (2019). Treatment of anticancer drugs in hospital and wastewater effluents using nanofiltration. *Separation and Purification Technology*: 224, 273-280.
- Cummins, K. W. (1974). Structure and function of stream ecosystems. *BioScience*, 24(11), 631-641.
- Cummins, K. W., & Klug, M. J. (1979). Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual review of ecology and systematics*, 10(1), 147-172.
- DeYoung, D. J., Bantle, J. A., Hull, M. A., & Burks, S. L. (1996). Differences in sensitivity to developmental toxicants as seen in *Xenopus* and *Pimephales* embryos. *Bulletin of environmental*

contamination and toxicology, 56(1), 143-150.

Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., & Munch, J. C. (2004). Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Applied and Environmental Microbiology*: 70(1), 468-474.

Dilly, O., Batseh, S., Rosenbroek, P., Buscot, F., & Munch, J.C. (2001). Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutationa* (Gaertn.) L.) forest soil. *Biology and Biochemistry*: 33 (7-8), 921-930.

Du, J., Zhang, Y., Cui, M., Yang, J., Lin, Z., & Zhang, H. (2017). Evidence for negative effects of ZnO nanoparticles on leaf litter decomposition in freshwater ecosystems. *Environmental Science: Nano*, 4(12), 2377-2387, 1-12.

Du, J., Qv, W., Niu, Y., Qv, M., Jin, K., Xie, J., & Li, Z. (2022). Nanoplastic pollution inhibits stream leaf decomposition through modulating microbial metabolic activity and fungal community structure. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127392, 1-9.

Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(9), 2961-2968.

Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., & Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water research*, 75, 63-82.

Elrsek, T., Ženko, M., & Filipič, M. (2018). Ecotoxicity of disinfectant benzalkonium chloride and its mixture with antineoplastic drug 5-fluorouracil towards alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *PeerJ*, 6, e4986, 1-14.

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 177-182.

Esterhuizen-Londt, M., Schwartz, K., & Pflugmacher, S. (2016). Using aquatic fungi for pharmaceutical bioremediation: Uptake of acetaminophen by *Mucor hiemalis* does not result in an enzymatic oxidative stress response. *Fungal biology*, 120(10), 1249-1257, 1-9.

Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2014). Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: from hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environmental Pollution*, 193, 216-223.

Ferreira, V., Elosegi, A., D Tieg, S., von Schiller, D., & Young, R. (2020). Organic matter decomposition and ecosystem metabolism as tools to assess the functional integrity of streams and rivers—a systematic review. *Water*, 12(12), 3523, 1-40.

Findlay, S. E. (2021). Organic matter decomposition. In *Fundamentals of ecosystem science* (pp. 81-102). Academic Press.

Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V., & Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and oceanography*, 44(3part2), 864-877.

- Ford, A. T., Ågerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, Sham, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchack, J.M., Iedesma, M., Melvin, S.D., Mohr, S., Padilla S., Pyle, G.G., Scholz S., Saaristo, M., Smit, E., Steevans, J.A., Berg, S.V.D., Kloas, W., Wong, B. B.M., Ziegler, M., & Maack, G. (2021). The role of behavioral ecotoxicology in environmental protection. *Environmental science & technology*: 55(9), 5620-5628.
- Franquet-Griell, H., Cornadó, D., Caixach, J., Ventura, F., & Lacorte, S. (2017). Determination of cytostatic drugs in Besòs River (NE Spain) and comparison with predicted environmental concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*: 24(7), 6492-6503.
- Free, C. M., Jensen, O. P., Mason, S. A., Eriksen, M., Williamson, N. J., & Boldgiv, B. (2014). High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine pollution bulletin*, 85(1), 156-163.
- García-Palacios, P., McKie, B. G., Handa, I. T., Frainer, A., & Hättenschwiler, S. (2016). The importance of litter traits and decomposers for litter decomposition: a comparison of aquatic and terrestrial ecosystems within and across biomes. *Functional Ecology*, 30(5), 819-829.
- Gessner, M. O., Chauvet, E., & Dobson, M. (1999). A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*, 377-384.
- Gessner, M.O. (2005). Ergosterol as a measure of fungal biomass. Methods to study litter decomposition. *A practical guide*. MAS Graça, F. Bärlocher and MO Gessner.
- Gessner, M. O. (1997). Fungal biomass, production and sporulation associated with particulate organic matter in streams. *Limnetica*: 13(2), 33-44.
- Gessner, M. O., & Newell, S. Y. (2002). Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. *Manual of environmental microbiology*, 2, 390-408.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., & Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water research*, 47(6), 2050-2064.
- Graça, M. A., & Canhoto, C. (2006). Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica*, 25(1-2), 001-10.
- Granade, T. C., Hehmann, M. F., & Artis, W. M. (1985). Monitoring of filamentous fungal growth by in situ microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density, and ¹⁴C incorporation: alternatives to mycelial dry weight. *Applied and Environmental Microbiology*: 49(1), 101-108.
- Guilhermino, L., Vieira, L. R., Ribeiro, D., Tavares, A. S., Cardoso, V., Alves, A., & Almeida, J. M. (2018). Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*. *Science of the Total Environment*, 622, 1131-1142, 1-12.
- Handa, I. T., Aerts, R., Berendse, F., Berg, M. P., Bruder, A., Butenschoen, O., Chauvet, E., Gessner, M.O., Jabiol, J., Makkonen, M., McKie, B. G., Malmqvist, B., Peeters, E.T.H.M., Scheu,

S., Schmid, B., Ruijven, J.V., Vos, V.C.A., & Hättenschwiler, S. (2014). Consequences of biodiversity loss for litter decomposition across biomes. *Nature*: 509(7499), 218-221.

Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V., & Scheu, S. (2005). Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*: 36, 191-218.

Hauer, F.R., & Lamberti, G.A (Eds.). (1996). *Methods in stream ecology*. Academic Press, 1-877.

Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*: 69(2), 334-342.

Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Guerraz, F, T., & Locher, F. (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *Journal of environmental management*, 103, 113-121.

Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Williams, R. J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., & Sumpter, J. P. (2008). Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348(1-2), 167-175.

Jureczko, M., & Przystaś, W. (2019). Ecotoxicity risk of presence of two cytostatic drugs: Bleomycin and vincristine and their binary mixture in aquatic environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 172, 210-215.

Kałuża, T., Sojka, M., Wróżyński, R., Jaskuła, J., Zaborowski, S., & Hämmerling, M. (2020). Modeling of river channel shading as a factor for changes in hydromorphological conditions of small lowland rivers. *Water*, 12(2), 527, 1-16.

Kaplan, L. A., & Newbold, J. D. (2003). The role of monomers in stream ecosystem metabolism. *In Aquatic Ecosystems* (pp. 97-119). Academic Press.

Kessler, R. (2010). INDUSTRY ISSUES: pharmaceutical factories as a source of drugs in water.

Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., & Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental science & technology*: 50, 3315-3326.

Koelmans, A. A. (2015). Modeling the role of microplastics in bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. A critical review. *Marine anthropogenic litter*, 309-324.

Kominoski, J. S., & Rosemond, A. D. (2012). Conservation from the bottom up: forecasting effects of global change on dynamics of organic matter and management needs for river networks. *Freshwater Science*, 31(1), 51-68.

Kovács, R., Csenki, Z., Bakos, K., Urbányi, B., Horváth, Á., Garaj-Vrhovac, V., Gajski, G., Gerić, M., Negreira, N., Lopes de Alda, M., Barceló, D., Heath, E., Kosjek, T., Žegura, B., Novak, M., Zajc, I., Baebler, Š., Rotter, A., Ramšak, Ž., & Filipič, M. (2015). Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. *Water research*: 77, 201-212.

- Krauss, G., Barlocher, F., Schreck, P., Wennrich, R., Glasser, W., & Krauss, G. J. (2001). Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedwigia*, 72(3-4), 419-428, 1-10.
- Kjøller, A., & Struwe, S. (1982). Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. *Oikos*, 391-422.
- Kovács, R., Bakos, K., Urbányi, B., Kövesi, J., Gazsi, G., Csepeli, A., Appl, A.J., Bencsik, D., Csenki, Z., & Horváth, Á. (2016). Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14718-14729.
- Kümmerer, K. (2001). Introduction: pharmaceuticals in the environment. In *Pharmaceuticals in the Environment* (pp. 1-8). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kümmerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the environment. *Annual review of environment and resources*: 35, 57-75.
- Kwon, J. W., & Armbrust, K. L. (2005). Degradation of citalopram by simulated sunlight. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24, 1618-1623.
- Kwon, J. W., & Armbrust, K. L. (2006). Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25, 2561-2568.
- Laitung, B., Pretty, J. L., Chauvet, E., & Dobson, M. (2002). Response of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology*: 47, 313-323.
- Lai, W. W. P., Lin, Y. C., Wang, Y. H., Guo, Y. L., & Lin, A. Y. C. (2018). Occurrence of emerging contaminants in aquaculture waters: cross-contamination between aquaculture systems and surrounding waters. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(8), 1-12.
- Lambert, S., Scherer, C., & Wagner, M. (2017). Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integrated environmental assessment and management*: 13(3), 470-475.
- Larue, C., Sarret, G., Castillo-Michel, H., & Pradas del Real, A. E. (2021). A critical review on the impacts of nanoplastics and microplastics on aquatic and terrestrial photosynthetic organisms. *Small*, 17(20), 2005834, 1-61.
- Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M., & Schludermann, E. (2014). The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environmental pollution*, 188, 177-181.
- Lehtiniemi, M., Engström-Öst, J., & Viitasalo, M. (2005). Turbidity decreases anti-predator behaviour in pike larvae, *Esox lucius*. *Environmental Biology of Fishes*, 73(1), 1-8.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*: 3(5), 330-338.
- Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and

- chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 202, 514-520.
- Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J., Sweetman, A. J., Jenkins, A., Ferrier, R. C., Li, H., Luo, W., & Wang, T. (2015). Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment international*, 77, 5-15.
- Magara, G., Elia, A.C., Syberg, K & Khan, F.R. (2018). Single contaminant and combined exposure of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of toxicology and environmental health, Part A*: 81 (16), 761-773.
- Mani, T., Hauk, A., Walter, U., & Burkhardt-Holm, P. (2015). Microplastics profile along the Rhine River. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.
- Mendoza, L. M. R., Karapanagioti, H., & Álvarez, N. R. (2018). Micro (nanoplastics) in the marine environment: current knowledge and gaps. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 47-51, 1-5.
- Mentzer, E., & Eber, D. (1996, November). Remediation of hydrocarbon contaminated sites. In A paper presented at 8th biennial international seminar on the petroleum industry and the Nigerian environment, November, Port Harcourt.
- Minshall, G. W., Cummins, K. W., Petersen, R. C., Cushing, C. E., Bruns, D. A., Sedell, J. R., & Vannote, R. L. (1985). Developments in stream ecosystem theory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*: 42(5), 1045-1055.
- Nassour, C., Barton, S. J., Nabhani-Gebara, S., Saab, Y., & Barker, J. (2020). Occurrence of anticancer drugs in the aquatic environment: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 1339-1347, 1-9.
- Olalla, A., Negreira, N., de Alda, M. L., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2018). A case study to identify priority cytostatic contaminants in hospital effluents. *Chemosphere*, 190, 417-430.
- Oliveira, P. A. C. (2018). Effects of environmental contaminants on the exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), 1-195.
- Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and environmental safety*, 164, 155-163, 1-9.
- Osono, T. (2017). Leaf litter decomposition of 12 tree species in a subtropical forest in Japan. *Ecological research*, 32(3), 413-422.
- Padrós, J., Pelletier, É., & Ribeiro, C. O. (2003). Metabolic interactions between low doses of benzo [a] pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicology and applied pharmacology*: 192(1), 45-55.
- Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., & Isidori, M. (2015). Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. *Journal of hazardous materials*, 286, 573-580.

- Parrella, A., Kundi, M., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., & Isidori, M. (2014). Toxicity of exposure to binary mixtures of four anti-neoplastic drugs in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic toxicology*, 157, 41-46.
- Petersen, R. C., & Cummins, K. W. (1974). Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater biology*: 4(4), 343-368.
- Pico, Y., & Barceló, D. (2019). Analysis and prevention of microplastics pollution in water: current perspectives and future directions. *ACS omega*, 4(4), 6709-6719, 1-11.
- Pradhan, A., Seena, S., Pascoal, C., & Cássio, F. (2011). Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams?. *Microbial ecology*, 62(1), 58-68, 1-11.
- Ribeiro, O. M., Pinto, M. Q., Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Carrola, J. S.(2021). A dáfnia como sensor da exocoxidade, *Revista de Ciência Elementar*, 9(02):044.
- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2011). Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1839-1846, 1-8.
- Santos, L. H., Rodriguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2021). Microplastics as vectors of pharmaceuticals in aquatic organisms—An overview of their environmental implications. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 3, 100079, 1-9.
- Santos, M. S., Franquet-Griell, H., Lacorte, S., Madeira, L. M., & Alves, A. (2017). Anticancer drugs in Portuguese surface waters—estimation of concentrations and identification of potentially priority drugs. *Chemosphere*, 184, 1250-1260.
- Shi, W., Han, Y., Sun, S., Tang, Y., Zhou, W., Du, X., & Liu, G. (2020). Immunotoxicities of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism. *Journal of hazardous materials*: 396, 122603.
- Song, S., Li, F., Li, J., & Liu, Q. (2013). Distribution and contamination risk assessment of dissolved trace metals in surface waters in the Yellow River Delta. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 19(6), 1514-1529.
- Souza, D. M., Reichert, J. F., & Martins, A. F. (2018). A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. *Chemosphere*, 201, 178-188.
- Suberkropp, K. (1984). Effect of temperature on seasonal occurrence of aquatic hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*: 82(1), 53-62.
- Suberkropp, K. (1992). Interactions with invertebrates. In *The ecology of aquatic hyphomycetes* (pp. 118-134). *Springer, Berlin, Heidelberg*.
- Suberkropp, K. F. (1998). Microorganisms and organic matter decomposition. *River ecology and management*.
- Triebkorn, R., Braunbeck, T., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Jekel, M., Knepper, T.P.,

- Krais, S., Müller, y., Pittroff, M., Ruhl, A.S., Schmiege, H., Schür, C., Stobel, C., Wagner, M., Zumbülte, N., & Köhler, H. R. (2019). Relevance of nano-and microplastics for freshwater ecosystems: a critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 375-392, 1-18.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*: 37(1), 130-137.
- Vinebrooke, D. R., L. Cottingham, K., Norberg, Marten Scheffer, J., I. Dodson, S., C. Maberly, S., & Sommer, U. (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: The role of species co-tolerance. *Oikos*, 104(3), 451-457, 1-8.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Dick Vethaak, A., Winther-Nielsen, M., & Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 1-9.
- Wang, C., Zhao, Y., Zheng, R., Ding, X., Wei, W., Zuo, Z., & Chen, Y. (2006). Effects of tributyltin, benzo [a] pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(3), 381-387.
- Webb, S.F., (2001). A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals I—collation of available ecotoxicity data. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment—Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer, Berlin, pp. 175–201.
- Xie, H. (2012). Occurrence, ecotoxicology, and treatment of anticancer agents as water contaminants. *J. Environ. Anal. Toxicol. S*, 2, 1-11.
- Yadav, A., Mandal, M. K., & Dubey, K. K. (2020). In vitro cytotoxicity study of cyclophosphamide, etoposide and paclitaxel on monocyte macrophage cell line raw 264.7. *Indian Journal of Microbiology*, 60(4), 511-517.
- Yonkos, L. T., Friedel, E. A., Perez-Reyes, A. C., Ghosal, S., & Arthur, C. D. (2014). Microplastics in four estuarine rivers in the Chesapeake Bay, USA. *Environmental science & technology*, 48(24), 14195-14202.
- Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*. 5th Edition, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, xiii, 1-944.
- Zhang, N., Li, Y., Wubet, T., Bruelheide, H., Liang, Y., Purahong, W., Buscot, F., & Ma, K. (2018). Tree species richness and fungi in freshly fallen leaf litter: Unique patterns of fungal species composition and their implications for enzymatic decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 120-126.
- Zhuang, W., & Gao, X. (2014). Integrated assessment of heavy metal pollution in the surface sediments of the Laizhou Bay and the coastal waters of the Zhangzi Island, China: comparison among typical marine sediment quality indices. *PLoS One*, 9(4), e94145.