

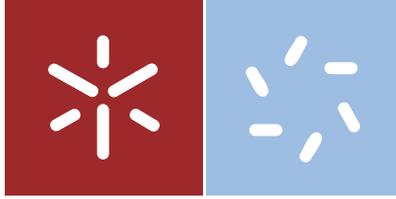


Vânia Alexandra Salgado de Sousa

Efeitos ecológicos do fungicida tebuconazole
num modelo hospedeiro-parasita em cenários
realistas

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Vânia Alexandra Salgado de Sousa

Efeitos ecológicos do fungicida tebuconazole
num modelo hospedeiro-parasita em cenários
realistas

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Bruno Branco Castro
Professora Doutora Fernanda Maria Fraga Mimoso
Gouveia Cássio

DECLARAÇÃO

Nome: Vânia Alexandra Salgado de Sousa

Endereço eletrónico: vania_sousa20@hotmail.com

Cartão de cidadão: 14670030 9 ZX7

Título da dissertação: Efeitos ecológicos do fungicida tebuconazole num modelo hospedeiro-parasita em cenários realistas.

Orientador: Professor Doutor Bruno Branco Castro

Co-orientador: Professora Doutora Fernanda Maria Fraga Mimoso Gouveia Cássio

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado em Ecologia

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

Universidade do Minho, 30 de Janeiro de 2018

(Vânia Alexandra Salgado de Sousa)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores por todo o acompanhamento e orientação ao longo deste trabalho. Ao Prof. Dr. Bruno Castro por todo o rigor que me exigiu, pelo apoio e incentivo quando tudo parecia estar perdido. Por ter partilhado comigo o seu vasto conhecimento em diversas áreas e por me ter “obrigado” a dar o meu melhor na execução deste trabalho. À Prof. Dra. Fernanda Cássio por todo o apoio, incentivo e por toda a partilha de conhecimento que me tornaram uma pessoa mais rica.

Ao grupo de Biodiversidade por toda a alegria e boa disposição nos dias de trabalho, pelas sugestões dadas e pelo espírito de camaradagem. Em especial ao Diogo Costa que me acompanhou nas manhãs intermináveis a contar ou ver as dáfnias ao microscópio, pelo companheirismo e boa disposição em todas as horas. À Ana Pinheira, por todos os momentos de descontração e alegria partilhados, pela linda amizade que se formou.

À minha família, especialmente aos meus pais e à minha avó, por todo o apoio emocional e financeiro, por presenciarem os bons e relevarem os maus momentos desta etapa da minha vida. Pelo interesse que demonstraram ao longo de todo o processo, não percebendo o que eu fazia, nem mesmo quando tentava explicar. Um obrigado nunca será suficiente.

À Ana Pereira, ao Ricardo, ao Isaías, à Andreia e à Chefe Né, por serem literalmente o meu clã. Por compreenderem as minhas ausências, por me incentivarem a ser sempre melhor. Pelas piadas, pelas palhaçadas, por tornarem este processo mais leve.

À Carina, por todas as palavras, atitudes e gestos de amizade, por ter sempre a palavra certa para me dizer, o incentivo certo para me fazer ir mais além. Eu sei que digo que amizades não se agradecem mas, para esta, nem mil obrigados são suficientes.

Ao Tiago Macedo, pela sua maneira racional de ver as coisas, por ser a minha voz da razão. Por me fazer ter os pés assentes na terra sem nunca deixar de me apoiar e incentivar.

Ao Tiago Pereira, por toda a preocupação, carinho e prestabilidade. Pela companhia nas horas sem fim nas salas 24h, pelo trabalho que me ajudou a fazer, pelo incentivo nas horas de desespero. Por ter sido o meu porto seguro na reta final do trabalho.

RESUMO

Efeitos do fungicida tebuconazole num modelo hospedeiro-parasita em cenários realistas

A interação entre a poluição e a doença é um campo de investigação ainda pouco explorado; no entanto, o contexto ambiental pode tornar mais ou menos provável a ocorrência e a dispersão de parasitas ou agentes patogénicos. Os fungicidas usados na agricultura são aplicados diretamente no ambiente e, por isso, colocam sob pressão muitos microrganismos não-alvo (nomeadamente fungos parasitas ou patogénicos) que ocorrem naturalmente nos ecossistemas agrícolas. O tebuconazole (fungicida azólico) tem um efeito antiparasítico comprovado a baixas concentrações no que toca à supressão da infeção no modelo *Daphnia* spp. (crustáceo de água doce) × *Metschnikowia bicuspidata* (levedura parasita). Numa tentativa de clarificar a relevância ecológica e a reversibilidade dos efeitos antiparasíticos do tebuconazole e de compreender que fases do ciclo de vida do microparasita *M. bicuspidata* são mais suscetíveis a este agroquímico, testou-se a influência do tempo de exposição a várias concentrações deste fungicida. Para isso, expôs-se em laboratório este modelo hospedeiro × parasita ao tebuconazole de forma contínua ou em exposições de duração variável (4 a 12 dias). Verificou-se que a presença de esporos no corpo do hospedeiro foi mais elevada nos tempos de exposição mais reduzidos e a concentrações mais baixas. Não foram observados sinais de infeção em períodos de exposição mais longos. Estes resultados confirmam que o tebuconazole tem um papel protetor (ou antiparasítico) para a saúde dos hospedeiros, sendo eficaz mesmo a concentrações reduzidas (< 13.5 µg/L) e em exposições relativamente curtas (< 8 dias). Isto é demonstrativo da ação do tebuconazole na prevenção da esporulação de *M. bicuspidata*, de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição. O mesmo padrão foi observado para a mortalidade dos hospedeiros que não apresentavam sinais de infeção (i.e., sem presença de esporos na cavidade corporal). Os dados de mortalidade sugerem que o parasita é capaz de causar dano no hospedeiro mesmo sem haver esporulação e que o efeito protetor do tebuconazole também é válido na fase de crescimento vegetativo de *M. bicuspidata*. Os resultados obtidos demonstram que o efeito deste agroquímico sobre um fungo não-alvo – e sobre a relação hospedeiro-parasita na qual este intervém – ocorre em cenários ecologicamente relevantes (baixas concentrações e tempos de exposição de apenas alguns dias).

ABSTRACT

Effects of the fungicide tebuconazole on a host-parasite model in realistic scenarios

The interaction between pollution and disease is a research field that is still poorly explored; however, the environmental context may influence the occurrence and dispersion of parasites or pathogens. Fungicides used in agriculture are directly applied to the environment and thus pressure many non-target microorganisms (notably parasitic or pathogenic fungi), which naturally occur in agroecosystems. Tebuconazole (an azole fungicide) has a proven antiparasitic effect at low concentrations by suppression of the infection in a *Daphnia* spp. (freshwater crustacean) × *Metschnikowia bicuspidata* (parasitic yeast) model. To clarify the ecological relevance and reversibility of the antiparasitic effects of tebuconazole and to understand which phases of the life cycle of *M. bicuspidata* are most susceptible to this agrochemical, the influence of exposure time at various concentrations of this fungicide was tested. For this, the model host × parasite system was exposed in the laboratory to tebuconazole continuously or in exposures of variable duration (4 to 12 days). The presence of spores in the host body was higher at the shorter exposure times and at lower concentrations. At longer exposure timings, no signs of infection were observed. These results confirm that tebuconazole has a protective (or antiparasitic) role on host health and is effective even at reduced concentrations ($< 13.5 \mu\text{g L}^{-1}$) and at relatively short (< 8 days) exposures. This is demonstrative of the action of tebuconazole in preventing sporulation of *M. bicuspidata*, which is dependent on concentration and exposure time. The same pattern was observed for the mortality of hosts that did not show signs of infection (i.e., no spores present in the body cavity). Mortality data suggest that the parasite can cause damage to the host even without sporulation and the protective effect of tebuconazole is also valid in the vegetative growth phase of *M. bicuspidata*. The results show that the effects of this agrochemical on a non-target fungus – and the host-parasite relationship in which it participates – can happen in ecologically relevant scenarios (low concentrations and short exposure times).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Contaminação ambiental por fungicidas	3
1.2. Poluição e dispersão de doenças.....	6
1.3. Interação parasitismo × fungicidas.....	9
1.4. <i>Daphnia</i> e os seus parasitas	10
1.5. Objetivo do estudo	14
2 - METODOLOGIAS	15
2.1. Modelo biológico.....	15
2.1.1. Hospedeiro (<i>Daphnia galeata</i> × <i>longispina</i>).....	15
2.1.2. Parasita (<i>Metschnikowia bicuspidata</i>).....	15
2.2. Manutenção de <i>Daphnia</i> em laboratório	16
2.2.1. Meios de cultura.....	17
2.2.2. Fonte de alimento: suspensão de microalgas <i>Raphidocelis subcapitata</i>	18
2.2.3. Rotinas de manutenção	20
2.3. Manutenção de <i>Metschnikowia bicuspidata</i> em laboratório.....	20
2.4. Tebuconazole: obtenção e preparação	21
2.5. Procedimento de infecção	21
2.6. Desenho experimental.....	22
2.6.1. Avaliação da suscetibilidade clonal de <i>Daphnia</i> ao parasita.....	22
2.6.2. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 1	24
2.6.3. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 2.....	26
2.7. Análise estatística	26
3 - RESULTADOS	28
3.1. Avaliação da suscetibilidade clonal de <i>Daphnia</i> ao parasita	28
3.2. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 1	29
3.3. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 2.....	32
4 - DISCUSSÃO	34
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6 - ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Ciclo de vida de <i>Daphnia</i> (Branchiopoda: Cladocera). Adaptado de Ebert (2005)	12
Fig. 2 - Estádios da infecção por <i>M. bicuspidata</i> em <i>Daphnia galeata × longispina</i> (retirado de Cuco et al. 2017 b). A – dáfnia não infetada; B – primeiros sinais do desenvolvimento da infecção (o corpo fica opaco com a presença de ascósporos); C – sinais tardios do desenvolvimento da infecção (cavidade corporal completamente preenchida com ascósporos); D – detalhe de ascósporos libertados por hospedeiros mortos.....	13
Fig. 3 - Relação entre a densidade ótica e a densidade celular de microalgas	19
Fig. 4 - Procedimento de infecção de <i>D. galeata × longispina</i> por <i>M. bicuspidata</i>	22
Fig. 5 - Desenho experimental e procedimento de infecção da primeira experiência relativa à suscetibilidade clonal.	23
Fig. 6 - Desenho experimental e procedimento de infecção da segunda experiência relativa à suscetibilidade clonal.....	23
Fig. 7 - Esquema do desenho experimental representando os estádios hipotéticos do ciclo de vida de <i>M. bicuspidata</i> (a amarelo, em cima) a par com os cenários de exposição ao fungicida tebuconazole (T8, T12, T16, TC e T0, em baixo) – ver texto. As linhas a tracejado nos tempos de exposição representam a retirada progressiva do tebuconazole (ver abaixo).....	24
Fig. 8 – Mortalidade (à esquerda) e presença de esporos de <i>M. bicuspidata</i> na cavidade corporal de diferentes clones do hospedeiro (à direita). As barras de erro correspondem ao desvio-padrão. 28	
Fig. 9 – Mortalidade (à esquerda) e presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro (à direita) por <i>M. bicuspidata</i> dos clones de <i>Daphnia</i> mais suscetíveis ao parasita. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.	29
Fig. 10 – Proporção de hospedeiros (<i>D. galeata × longispina</i>) infetados onde se observou a presença de esporos do parasita (<i>M. bicuspidata</i>). Os dados são apresentados em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16, ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 13.5 µg L ⁻¹ ; C2 = 27 µg L ⁻¹). Os pontos individuais (a preto) representam as observações em cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma	

técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole)30

Fig. 11 – Mortalidade (proporção de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal) em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16 ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 13.5 µg L⁻¹; C2 = 27 µg L⁻¹). Os pontos individuais (a preto) representam as réplicas de cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole)31

Fig. 12 – Proporção de hospedeiros (*D. galeata* × *longispina*) onde se observou a presença de esporos do parasita (*M. bicuspidata*). Os dados são apresentados em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16, ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 4 µg L⁻¹; C2 = 6 µg L⁻¹; C3 = 9 µg L⁻¹; C4 = 13.5 µg L⁻¹; C5 = 20.3 µg L⁻¹). Os pontos individuais (a preto) representam as observações em cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole)32

Fig. 13 – Mortalidade (proporção de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal) em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16 ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 4 µg L⁻¹; C2 = 6 µg L⁻¹; C3 = 9 µg L⁻¹; C4 = 13.5 µg L⁻¹; C5 = 20.3 µg L⁻¹). Os pontos individuais (a preto) representam as réplicas de cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole)33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de culturas (ordenada alfabeticamente) onde são aplicados compostos azólicos e onde é aplicado especificamente o tebuconazole (sombreado).	5
Tabela 2 – Componentes básicos e composição dos meios COMBO- <i>Daphnia</i> e COMBO- <i>algae</i>	18

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, as atividades humanas têm exercido uma enorme pressão sobre os ecossistemas, pondo em causa os recursos para as gerações futuras. Em particular, é preocupante a pressão antrópica sobre os recursos de água doce. A água doce é um dos recursos mais importantes para os humanos, uma vez que providencia uma série de serviços como a rega, pesca, produção de energia, eliminação de resíduos, entre outros (Dudgeon et al., 2006; Strayer & Dudgeon, 2010). Ainda mais preocupante é o facto da pressão humana ser feita nas escassas reservas de água potável, configurando um cenário de múltiplos agentes de stress (Vörösmarty et al., 2010). Desde sempre, a humanidade tem-se instalado muito perto dos cursos de água porque estes providenciam uma série de bens essenciais e de serviços. No entanto, esta riqueza tem-se tornado cada vez mais escassa devido à pressão demográfica. Cerca de 97,5% da disponibilidade mundial de água encontra-se nos oceanos (água salgada imprópria para consumo), 2,5% encontram-se em regiões polares ou subterrâneas, e somente 0,007% da água disponível é própria para consumo. Estes números demonstram a preciosidade deste recurso, que se localiza em parte nos rios, lagos e pântanos (National Geographic 2017). A água potável disponível no nosso planeta é essencial para o bem-estar humano mas também o é como suporte da biodiversidade, uma vez que os ecossistemas de água doce suportam cerca de 40% da diversidade global de peixes e 25% da diversidade global de vertebrados (Dudgeon et al., 2006). Alterações na biodiversidade dos ecossistemas aquáticos podem comprometer o provisionamento dos serviços dos ecossistemas acima referidos e que são essenciais à nossa existência (Cardinale et al., 2006). Por isso, é essencial preservar este recurso vital – e os seus bens e serviços associados – de pressões antrópicas como, por exemplo, a poluição.

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode alterar a dinâmica das comunidades que aí habitam, incluindo a sua composição e as funções desempenhadas pelos seres vivos (Knillmann et al., 2013). As principais fontes de poluição estão relacionadas com atividades industriais, agrícolas e domésticas (Scheren, Zanting, & Lemmens, 2000), nomeadamente, por descargas de resíduos tóxicos, esgotos domésticos, lixiviação de fertilizantes e pesticidas agrícolas, entre outros. Dentre as principais fontes de poluição referidas, a agricultura é das poucas que lança intencional e repetidamente compostos químicos no

ambiente (nomeadamente pesticidas). Estes poluentes são utilizados para prevenção de doenças e melhoria das culturas, práticas comuns e imprescindíveis para esta atividade (McGrath, 2004). A presença destes poluentes no meio aquático tem efeitos adversos para o mesmo e comprometem a saúde do ecossistema (Zubrod et al., 2014). Embora exista uma enorme pressão legislativa, que tem levado à substituição de compostos nocivos por outros ambientalmente mais favoráveis, o uso disseminado de muitas substâncias pode acarretar efeitos secundários e subtis sobre os ecossistemas aquáticos. É importante compreender esses efeitos em cenários de exposição ecologicamente relevantes.

Os efeitos dos poluentes não ocorrem isoladamente; os organismos aquáticos enfrentam estes agentes abióticos ao mesmo tempo que enfrentam agentes de stress biótico, como os seus competidores e inimigos naturais (predadores e parasitas). Existem vários estudos que documentam a existência de interações complexas entre agentes de stress bióticos e abióticos nas comunidades aquáticas (Buser, Spaak, & Wolinska, 2012; Folt et al., 1999; Hanazato & Dodson, 1995; Sih, Bell, & Kerby, 2004). Este tipo de interações pode alterar a sensibilidade dos organismos aquáticos aos contaminantes e modificar os processos ecológicos (Coors & De Meester, 2008; Hanlon et al., 2015; Loureiro et al., 2013). A doença é um exemplo de um processo que resulta de uma interação biótica, e cujo resultado pode ser influenciado pelas condições ambientais, nomeadamente a poluição. A doença desempenha um papel fundamental do ponto de vista evolutivo, uma vez que promove uma rápida evolução do hospedeiro e parasita/agente patogénico (Wolinska & King, 2009); do ponto de vista ecológico, os parasitas são reguladores das dinâmicas populacionais e influenciam a estrutura da comunidade dos hospedeiros (Marcogliese, 2004).

A existência de uma relação entre poluição e doença no ambiente aquático já é considerada desde os anos 80 (Mix, 1986; O'Connor & Huggett, 1988; Sindermann et al., 1982). A ocorrência de stress relacionado com a poluição juntamente com a presença de microrganismos patogénicos pode tornar mais provável (Snieszko, 1974) o aparecimento de surtos de doenças, uma vez que os contaminantes podem afetar a prevalência, intensidade e a patogenicidade de um parasita (Khan & Thulin, 1991), direta ou indiretamente (via interferência na suscetibilidade do hospedeiro). Contudo, sabe-se que a doença pode, também, ser desfavorecida pela presença de contaminantes (Hanlon et al., 2015). Incluem-se nesta categoria os compostos desenhados para combater pragas (parasitas ou agentes patogénicos), e que apresentam potencial para afetar comunidades naturais de organismos não-alvo que habitam os

ecossistemas vizinhos às explorações agrícolas. Entre estas armas químicas incluem-se as substâncias anti-helmínticas (McCarter, 2004; Wood, Liu, & Weller, 1996), anti-fúngicas (Denning, 2003; Wood, Como, & Dismukes, 1994) e anti-bacterianas (Gilbert et al., 2010; Evans, 1993). A utilização massiva destes compostos levou à sua presença ubíqua no ambiente, onde podem atuar sobre outros parasitas (que não os agentes de doença em humanos ou animais e plantas de cultivo), com consequências ecológicas ainda não totalmente compreendidas (Cuco et al., 2017 a). Dentre estes compostos, destacam-se os fungicidas usados na agricultura, pela sua aplicação diretamente no ambiente, o que coloca sob pressão muitos agentes patogénicos, parasitas fúngicos e fungos não-alvo que ocorrem naturalmente nas áreas envolventes às explorações agrícolas. A presente dissertação pretende abordar esta problemática, na perspetiva de uma melhor compreensão acerca da pressão exercida pelos pesticidas (nomeadamente os fungicidas, ver abaixo) sobre um modelo hospedeiro-parasita comum em sistemas lacustres.

1.1. Contaminação ambiental por fungicidas

Nas últimas décadas, a intensificação de atividades humanas como a agricultura e a indústria fez com que a ocorrência de contaminantes nos ecossistemas aquáticos seja frequente e que o seu impacto no ambiente seja cada vez mais preocupante. A necessidade de controlar as doenças durante o estabelecimento e desenvolvimento das culturas, de aumentar a sua produtividade e de melhorar a qualidade e o tempo de armazenamento das colheitas levou a um excessivo uso dos compostos químicos nos agroecossistemas (McGrath, 2004). Segundo EUROSTAT (2016), foram vendidas quase 400 000 toneladas de pesticidas nos 28 países pertencentes à União Europeia (EU), em 2014. Dentre estes, os fungicidas e os bactericidas foram os mais vendidos (cerca de 44%), seguidos dos herbicidas (cerca de 33%) e, por fim, os inseticidas, acaricidas e outros produtos (cerca de 23%). Em metade dos países da EU, os fungicidas e bactericidas dominaram as vendas de pesticidas, alcançando 1/3 das vendas efetuadas. Em Portugal, no ano de 2015, a tendência não foi diferente. Foram vendidas 12 889,2 toneladas de pesticidas em território nacional, sendo que as vendas foram dominadas pelos fungicidas (64%) (EUROSTAT, 2016; INE, 2015).

Nos ambientes aquáticos, a contaminação por pesticidas é um frequente agente de stress abiótico (Pedersen, Yeager, & Suffet, 2006; Wittmer et al., 2010) e pode causar efeitos negativos nas populações e nos processos do ecossistema (Zubrod et al., 2014). A entrada

destes contaminantes nestes ambientes depende do tipo de uso. Os pesticidas utilizados na agricultura entram nos ambientes aquáticos de várias formas, nomeadamente através da difusão das aplicações em spray (Barth et al., 2009), de fluidos das estações de tratamento de águas residuais (Bermúdez-Couso et al., 2007) e da lixiviação dos solos onde são usados (Wittmer et al., 2010). A lixiviação (transporte em águas de escorrência, superficial ou subterrânea) é particularmente importante, e está intimamente relacionada com os eventos de precipitação (Moe et al., 2013). Os eventos de chuva não são constantes ao longo do ano, alternando picos de precipitação com alturas em que esta é quase nula. Então, é previsível que haja também picos nas concentrações dos pesticidas no ambiente aquático (Handy, 1994). Podemos assim concluir que a exposição dos organismos a estes compostos ocorre num cenário intermitente.

Os fungicidas são compostos químicos biocidas ou organismos biológicos que matam ou inibem o crescimento e a reprodução (esporulação) de fungos (McGrath, 2004). Estes compostos matam os fungos pelo dano que causam nas suas membranas celulares, desativando enzimas críticas ou proteínas e pela interferência em processos chave como a respiração ou a produção de energia (Hutson & Miyamoto, 1999). Atendendo ao papel fundamental dos fungos na natureza, como decompositores (Hieber & Gessner, 2002), microparasitas (Rasconi, Jobard, & Sime-Ngando, 2011) ou simbioses (Asplund & Wardle, 2016; van der Heijden et al., 1998), é expectável que a presença de fungicidas de origem vária (medicamentos, agroquímicos, produtos de uso pessoal; Richter et al., 2013) ponha em risco a integridade dos ecossistemas aquáticos. Em parte, este risco deve-se ao potencial que estas substâncias têm em causar efeitos nos processos mediados por fungos, como a decomposição ou a doença. Nos testes padronizados para avaliar os efeitos ecológicos de fungicidas são normalmente usados organismos como os peixes, girinos, crustáceos, ou microalgas (Ankley, 2005; Junges et al., 2012; Zubrod et al., 2014), pelo que pouco se sabe acerca da sensibilidade das comunidades microbianas naturais. Contudo, sabe-se que estes contaminantes conseguem alterar, influenciando a estrutura da teia alimentar bem como as funções associadas (Montuelle et al., 2010; Rasmussen et al., 2012). Vários autores têm vindo a demonstrar que os fungos não-alvo são vulneráveis à contaminação ambiental por fungicidas, o que conduz a alterações nas dinâmicas populacionais (Cuco et al., 2017a; Dijksterhuis et al., 2011), na composição das comunidades (Boxall, 2004) e nos processos mediados por estes microrganismos (Zubrod et al., 2011).

Dentre os fungicidas, destacam-se os compostos azólicos, compostos anti-fúngicos altamente eficientes cujo modo de ação se baseia na inibição da biossíntese de ergosterol (Kahle et al., 2008), constituinte essencial da membrana citoplasmática dos fungos (Hof, 2001). O défice daí resultante compromete o crescimento e a reprodução dos fungos, reduzindo as taxas de infeção nas populações de hospedeiros (Klix, Verreet, & Beyer, 2007). Estes compostos são empregues em vários tipos de culturas (Tabela 1) para combater doenças como o oídio, míldio, alternariose, cercosporiose, helmintosporiose, entre outras (DGAV, sem data). Estas doenças são causadas por fungos ou por outros agentes que possuam ergosterol nas suas membranas, como os oomicetos (grupo de organismos anteriormente classificados no grupo dos fungos). O composto tebuconazole, por exemplo, é utilizado em várias culturas (e.g., na videira e na oliveira; Tabela 1) para combater doenças causadas por fungos e oomicetos como a podridão negra (fungo *Guignardia bidwelli*), o míldio (oomiceto *Plasmopara viticola*), o oídio (fungo *Uromyces necator*) e o olho de pavão (fungo *Cycloconium oleaginum*) (Bayer, 2009). A aplicação dos fungicidas, na maioria das vezes, necessita de ser feita antes de a doença ocorrer (preventivamente) ou ao primeiro aparecimento dos sintomas (McGrath, 2004).

Tabela 1 - Lista de culturas (ordenada alfabeticamente) onde são aplicados compostos azólicos e onde é aplicado especificamente o tebuconazole (sombreado).

Culturas onde são aplicados compostos azólicos	
Abóbora	Espargo
Alcachofra	Feijoeiro
Alho	Ginjeira
Alho francês	Macieira
Ameixeira	Marmeleiro
Aveia	Melancia
Bananeira	Meloeiro
Batateira	Milho
Beringela	Morangueiro
Beterraba sacarina	Nectarina

Cebola	Oliveira
Cenoura	Pepino
Centeio	Pereira
Cevada	Pessegueiro
Cerejeira	Pimenteiro
Citrinos	Tomateiro
Cornichons (picles)	Trigo
Courgette	Triticale
Damasqueiro	Videira
Ervilheira	

A presença de tebuconazole nos ecossistemas aquáticos tem vindo a aumentar (Montuelle et al., 2010), uma vez que este fungicida está a ser usado para combater as doenças e pragas anteriormente combatidas pelo *carbendazim*, cujo uso foi proibido (Comissão Europeia 1107/2009). Devido ao seu uso intensivo, os efeitos deste contaminante nas comunidades microbianas não-alvo têm sido estudados quer nos solos, quer nos ambientes aquáticos (Muñoz-Leoz et al., 2011; Zubrod et al., 2011), sendo que as comunidades mais suscetíveis parecem ser os fungos (Artigas et al., 2012; Bundschuh et al., 2011; Cuco et al., 2017a; Rasmussen et al., 2012). Apesar da sua permanência nas águas ser relativamente curta (tempo de meia vida de 28 dias), este composto persiste nos solos por mais de 597 dias (Kegley et al., 2014), o que vai fazer com que a sua presença nas águas seja recorrente (já que é lixiviado dos solos). Normalmente, as concentrações de tebuconazole detetadas no ambiente são baixas (menos de 10 µg L⁻¹). Contudo, podem ser detetadas grandes concentrações após grandes chuvadas (200 µg L⁻¹) (Zubrod et al., 2014).

1.2. Poluição e dispersão de doenças

Pode definir-se doença como o conjunto dos efeitos negativos que afetam a saúde de um determinado organismo hospedeiro causado por um agente patogénico ou parasita (Scholthof, 2007). A prevalência de um certo parasita é a proporção de indivíduos hospedeiros infetados e dá-nos uma medida de quão frequente é a doença (Cuco, 2016). Por sua vez, patogenicidade é a capacidade do parasita infetar um hospedeiro e causar dano, e engloba os

termos agressividade (capacidade do parasita invadir e se estabelecer no hospedeiro) e virulência (grau de dano causado pelo parasita no hospedeiro) (Thomas & Elkinton, 2004). Existe uma certa incoerência entre a definição de parasita e agente patogénico. Vários autores afirmam que agentes patogénicos são aqueles que provocam especificamente uma doença ao seu hospedeiro (Alberts et al., 2002; Dangl, Horvath, & Staskawicz, 2013; Lysenko et al., 2005). Do ponto de vista ecológico, um parasita é um organismo que passa a maior parte ou toda a sua vida em associação com um indivíduo hospedeiro, aproveitando-se deste para se alimentar e reproduzir (Price et al., 1986), provocando-lhe danos, como por exemplo o desenvolvimento de doenças ou até mesmo a sua morte (Price, 1980). Então, de acordo com esta definição, podemos assumir no âmbito do presente trabalho que parasita e agente patogénico são semelhantes do ponto de vista ecológico (usando a mesma definição alargada de parasita utilizada por Wolinska & King, 2009).

Os parasitas ou agentes patogénicos e a sua virulência têm um papel fulcral nas dinâmicas hospedeiro-parasita (May & Anderson, 1979) e na estrutura das comunidades, uma vez que podem causar a morte dos seus hospedeiros ou reduzir a sua fecundidade, bem como produzir efeitos evolutivos via seleção dependente da frequência (Wolinska, Lively, & Spaak, 2008). Por isso, pequenas alterações na prevalência ou na virulência de um parasita como resultado da interação com outros agentes de stress ambientais podem alterar significativamente a ecologia e evolução das interações hospedeiro-parasita (Coors & De Meester, 2008). A virulência de um certo parasita pode depender dos genótipos do hospedeiro e do parasita (Carius, Little, & Ebert, 2001), das rotas de transmissão (Restif & Kaltz, 2006) ou das condições ambientais, nomeadamente, a presença de contaminantes como os pesticidas (Coors & De Meester, 2008).

O ambiente é um agente determinante para a doença (Scholthof, 2007; Wolinska & King, 2009), pelo que a doença e a sua dispersão serão afetadas pelas condições ambientais, nomeadamente a presença de contaminantes (Cuco et al., 2017 b; Hanlon et al., 2015). Esta interação entre hospedeiro (e sua suscetibilidade), parasita (e sua virulência) e o ambiente é conhecida na literatura com o triângulo da doença (Francl, 2001; Scholthof, 2007). A interação entre a poluição e os parasitas pode ter várias consequências no que toca à dispersão de doenças: por um lado, os contaminantes podem causar efeitos negativos nas populações de hospedeiros favorecendo a dispersão da doença mas, por outro lado, estes agentes de stress químico podem ter efeitos positivos para o hospedeiro desfavorecendo a dispersão ou virulência

dos parasitas (Lafferty & Kuris, 1999). Os hidrocarbonetos do petróleo, por exemplo, parecem favorecer o parasitismo de espécies de ciliados, nemátodes e monogenes e desfavorecer o parasitismo por acantocéfalos e digenes (Khan, 1987). Um mecanismo potencial para este favorecimento da doença em ambientes contaminados pode passar pela redução da capacidade de resposta imunológica dos hospedeiros em resultado da presença de poluentes, uma hipótese que permitiria explicar a maior suscetibilidade do hospedeiro a alguns parasitas (Coors & De Meester, 2008; Mcdowell et al., 1999). Por exemplo, a principal defesa dos peixes contra parasitas das guelras é a produção de muco (Khan, 1987). Com a poluição petrolífera ou a resultante dos efluentes de fábricas de celulose, industriais e termais, a prevalência de parasitas ciliados aumenta (Esch et al., 1976; Khan, 1990; Lehtinen, 1989) aumentando a suscetibilidade dos peixes, uma vez que as condições tóxicas comprometem o seu sistema imunitário e a produção de muco (Khan, 1990). As chuvas ácidas, resultantes da poluição atmosférica, também afetam os parasitas e os seus hospedeiros (Leavitt et al., 1999), sendo que a prevalência de monogenes e digenes diminui com a acidez, enquanto a dos acantocéfalos pode aumentar (Lafferty, 1997). Marcogliese e Cone (1996) verificaram que a riqueza de parasitas da enguia amarela era proporcional à acidez do meio. A eutrofização (resultante de entradas de azoto e fósforo associados à agricultura, resíduos de esgotos, deposição atmosférica, entre outros) parece também contribuir para o aumento da infeção e a patologia de parasitas (Johnson & Carpenter, 2007; Lafferty & Holt, 2003; McKenzie & Townsend, 2007). Johnson et al. (2007) estudaram os efeitos da eutrofização na dispersão da doença em anfíbios causada pelo parasita *Ribeiroia ondatrae* e concluíram que o aumento de nutrientes promovia indiretamente a doença nos anfíbios através do aumento da densidade de hospedeiros intermédios (gastrópode) infetados e pelo aumento da produção de estádios de dispersão dos parasitas nesses hospedeiros. Estas evidências ilustram os efeitos complexos do triângulo da doença, com particular enfoque na influência da poluição aquática sobre a ocorrência e virulência dos parasitas.

Alguns poluentes podem ser tóxicos para os parasitas e não o serem para os seus hospedeiros. Neste caso, verifica-se a relação oposta à descrita nos casos de estudo acima (favorecimento do hospedeiro e diminuição da prevalência ou virulência da doença). É o caso de alguns agentes químicos, como o selénio, por exemplo, que é mais tóxico para as ténias do que para os seus peixes hospedeiros (Riggs, Lemly, & Esch, 1987). Os poluentes podem ser particularmente tóxicos para fases livres de parasitas (Evans, 1982). Siddal e Des Clers (1994)

verificaram que os metais presentes em lamas reduziam a sobrevivência dos estádios de cercária e miracídio, o que levava a uma baixa prevalência do digene *Zoogonoides viviparous* em caracóis. Estudos realizados com microparasitas verificaram também este efeito antiparasitário de alguns contaminantes. Por exemplo, Hanlon et al. (2015) constataram que, em locais relativamente prístinos (pouco afetados pelos humanos), o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* causava danos severos nas populações de girinos, ao passo que em locais contaminados por pesticidas a virulência deste parasita era consideravelmente diminuída. Conclui-se, portanto, que o efeito da poluição nas relações hospedeiro-parasita é dependente do contexto (ora beneficia o hospedeiro, ora beneficia o parasita), o que justifica a importância da investigação sobre este tema, no sentido de contribuir para o debate acerca da interação entre poluição e doença.

1.3. Interação parasitismo × fungicidas

Os efeitos da interação entre parasitas e fungicidas têm vindo a ser estudados e demonstrados por alguns autores. Hanlon et al. (2012, 2015) desenvolveram estudos com anfíbios e seus parasitas, verificando que, em laboratório, a exposição de girinos de *Lithobates sphenoccephalus* ao fungicida tiofanato de metilo facilitou o crescimento deste anfíbio, uma vez que este composto eliminava totalmente o parasita *Batrachochytrium dendrobatidis* (Hanlon et al., 2012). Contudo, os mesmos autores (Hanlon et al., 2015) demonstraram que a exposição ao mesmo fungicida em mesocosmos aquáticos resultou em mortalidade total dos girinos, como consequência de uma cascata trófica desencadeada pelo fungicida que reduziu a sobrevivência dos anfíbios. Blonar et al. (2010) verificaram que a exposição a zinco e a cobre (metais com propriedades biocidas, também utilizados como fungicidas) reduzia a sobrevivência e a fecundidade dos juvenis de ectoparasitas do salmão atlântico sem prejuízo para o hospedeiro. Cuco et al. (2017 b) demonstraram que os sinais da infeção de um fungo unicelular (levedura) microparasita foram suprimidos por concentrações ambientalmente relevantes (a partir de 6.25 µg L⁻¹) de um fungicida azólico (tebuconazole), no modelo hospedeiro-parasita *Daphnia* spp. × *Metschnikowia bicuspidata*. Na maior parte destes casos, a aplicação de fungicidas beneficiou o hospedeiro na medida em que afetou negativamente os seus parasitas. Este tipo de fenómenos poderá ser mais frequente do que o até agora reportado, mas não são ainda claras as consequências a longo prazo para as populações de hospedeiro e parasita. Também não é claro, ainda, o impacto dos fungicidas em fungos aquáticos não-alvo, uma vez que a maioria da

literatura, até ao momento, se tem focado nas comunidades de hifomicetos aquáticos (Bundsuh et al., 2011; Flores et al., 2014; Zubrod et al., 2015). Desta forma, a informação existente acerca dos efeitos destes contaminantes nos modelos hospedeiro-parasita e até mesmo na saúde humana é escassa, o que torna estudos como o da presente dissertação essenciais para uma melhor compreensão desta matéria. É importante, também, perceber a existência ou não de um emparelhamento do tempo de exposição/aplicação dos fungicidas com os estádios de desenvolvimento do agente patogénico/parasitas (uns podem ser mais ou menos sensíveis que outros) para uma melhor avaliação do efeito interativo da poluição e doença em cenários de exposição intermitente aos tóxicos. Todos estes aspetos devem ser levados em conta quando se desenham experiências como as apresentadas neste estudo.

1.4. *Daphnia* e os seus parasitas

O modelo experimental constituído por *Daphnia* e seus parasitas é utilizado para estudar interações epidemiológicas, evolutivas e genéticas entre parasitas e hospedeiros (Ebert, 2008). Este modelo tem como vantagens o facto de ser possível controlar a identidade e variabilidade genética do hospedeiro e o facto destes crustáceos terem diversos parasitas (ver abaixo) que podem ser mantidos em culturas com os hospedeiros (Ebert, 2008). Neste modelo, o fator com um efeito mais significativo no resultado da infeção é a compatibilidade genética entre os genótipos do hospedeiro e do parasita (Ebert, 2008). Existe uma forte variação da resistência a parasitas por diferentes clones dos hospedeiros (Ebert, 1994; Mitchell et al., 2005). Por outro lado, também existem fatores não genéticos que podem determinar o sucesso do parasitismo. Os que se destacam são a dependência da dose das infeções (Regoes et al., 2003), os efeitos maternos (Mitchell & Read, 2005) e o ambiente abiótico, particularmente a temperatura (Ebert, 2005; Yan & Larsson, 1988) mas também os contaminantes (Civitello et al., 2012; Coors et al., 2008; Cuco et al., 2017 a).

Os organismos do género *Daphnia* são crustáceos transparentes com dimensões entre 1 e 5 mm que podem ser encontrados em água doce em todo o globo (Ebert, 2008). Alimentam-se de fitoplâncton (principalmente microalgas planctónicas) que filtram da coluna de água e, por sua vez, servem de alimento para os peixes e alguns invertebrados. Desempenham um papel preponderante no controlo da produtividade primária (como filtradores) e da transparência da água (Lampert, 2006). São, por isso, considerados organismos chave na transferência de

energia nas teias alimentares aquáticas (Castro, Consciência, & Gonçalves, 2007; Cuco et al., 2016). São capazes de ajustar o seu desenvolvimento e o seu metabolismo face às condições ambientais (Castro, Consciência, & Gonçalves, 2007) e, por isso, as suas respostas a perturbações podem ter um impacto nos processos dos ecossistemas (Antunes, Castro, & Gonçalves, 2004; Fischer, Pomati, & Eggen, 2013). É possível manter linhagens de *Daphnia* em laboratório por tempo indefinido (Ebert, 2008) e a sua estratégia reprodutiva permite o controlo de fatores genéticos e ambientais (Cuco et al., 2016). Estes organismos reproduzem-se por partenogénese cíclica (Ebert, 2005), alternando entre reprodução sexuada e assexuada (Fig. 1), consoante as condições do meio. Quando as condições são favoráveis, *Daphnia* produz descendentes fêmeas geneticamente idênticas (Miner et al., 2012). Contrariamente, quando as condições são desfavoráveis, produz ovos dormentes revestidos por uma cápsula resistente, denominada ephippium (Lampert, 2006).

Os organismos do género *Daphnia* são crustáceos transparentes com dimensões entre 1 e 5 mm que podem ser encontrados em água doce em todo o globo (Ebert, 2008). Alimentam-se de fitoplâncton (principalmente microalgas planctónicas) que filtram da coluna de água e, por sua vez, servem de alimento para os peixes e alguns invertebrados. Desempenham um papel preponderante no controlo da produtividade primária (como filtradores) e da transparência da água (Lampert, 2006). São, por isso, considerados organismos chave na transferência de energia nas teias alimentares aquáticas (Castro, Consciência, & Gonçalves, 2007; Cuco et al., 2016). São capazes de ajustar o seu desenvolvimento e o seu metabolismo face às condições ambientais (Castro, Consciência, & Gonçalves, 2007) e, por isso, as suas respostas a perturbações podem ter um impacto nos processos dos ecossistemas (Antunes, Castro, & Gonçalves, 2004; Fischer, Pomati, & Eggen, 2013). É possível manter linhagens de *Daphnia* em laboratório por tempo indefinido (Ebert, 2008) e a sua estratégia reprodutiva permite o controlo de fatores genéticos e ambientais (Cuco et al., 2016). Estes organismos reproduzem-se por partenogénese cíclica (Ebert, 2005), alternando entre reprodução sexuada e assexuada (Fig. 1), consoante as condições do meio. Quando as condições são favoráveis, *Daphnia* produz descendentes fêmeas geneticamente idênticas (Miner et al., 2012). Contrariamente, quando as condições são desfavoráveis, produz ovos dormentes revestidos por uma cápsula resistente, denominada ephippium (Lampert, 2006).

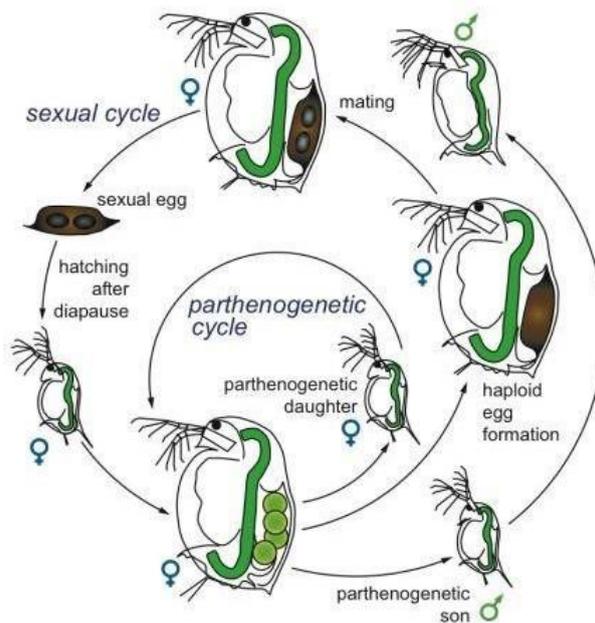


Fig. 1 - Ciclo de vida de *Daphnia* (Branchiopoda: Cladocera). Adaptado de Ebert (2005).

Daphnia é parasitada por muitos organismos de diversos grupos taxonômicos, entre os quais bactérias, fungos, oomicetos, nemátodes, céstodes e microsporídeos (Ebert, 2005). Estes seres causam infecções crônicas que, se não forem combatidas no 1º ou 2º dia após a infecção, podem causar danos diversos no hospedeiro (Ebert, 2008). Por exemplo, enquanto um microsporídeo do epitélio intestinal reduz o tempo de vida e a fecundidade do hospedeiro, outros parasitas (como por exemplo, *Pasteuria ramosa*) provocam danos muito mais severos como a extinção local quase total da espécie de hospedeiro em questão (Ebert, Zschokke-Rohringer, & Carius, 2000). Alguns destes parasitas podem ser mantidos em laboratório, incubando-os dentro do hospedeiro e cultivando o hospedeiro de forma cíclica (ver acima).

O fungo unicelular *Metschnikowia bicuspidata* é um microparásita de *Daphnia* (Naumov, 2011) que usa a energia do corpo do hospedeiro para se reproduzir (Hall et al., 2009). O ciclo de vida desta levedura tem início quando os ascósporos haploides, em forma de agulha (Fig. 2), são filtrados pelos hospedeiros. O formato dos esporos permite que estes penetrem a parede do tubo digestivo do seu hospedeiro, germinando de seguida no interior da cavidade corporal de *Daphnia*. A levedura reproduz-se então assexuadamente na hemolinfa de *Daphnia*, formando células vegetativas esféricas (haploides). Após o crescimento vegetativo, dá-se a esporulação pouco antes da morte do hospedeiro, que cobre a cavidade corporal de *Daphnia* com ascósporos

(visíveis microscopicamente; Fig. 2). Após a morte do hospedeiro, os ascósporos são libertados para o meio (transmissão horizontal do parasita), dando início a um novo ciclo de infecção e transmissão. Os efeitos negativos causados por este fungo nas populações de hospedeiros dependem do tamanho e do timing das epidemias. Quando estas epidemias são grandes o suficiente, podem moldar a composição das populações de hospedeiros (Hall et al., 2011). A ocorrência deste tipo de doença tem um papel fundamental nas dinâmicas ecológicas de populações naturais de *Daphnia* (Duffy & Sivars-Becker, 2007; Hall et al., 2011). Uma vez infectados, a esperança de vida dos pequenos crustáceos diminui, já que o parasita mata o hospedeiro ao fim de 2 a 3 semanas. Até morrer por ação do parasita, o hospedeiro continua capaz de se reproduzir mas a sua fecundidade pode diminuir nos estádios tardios da infecção (Ebert, 2005; Hall et al., 2006).

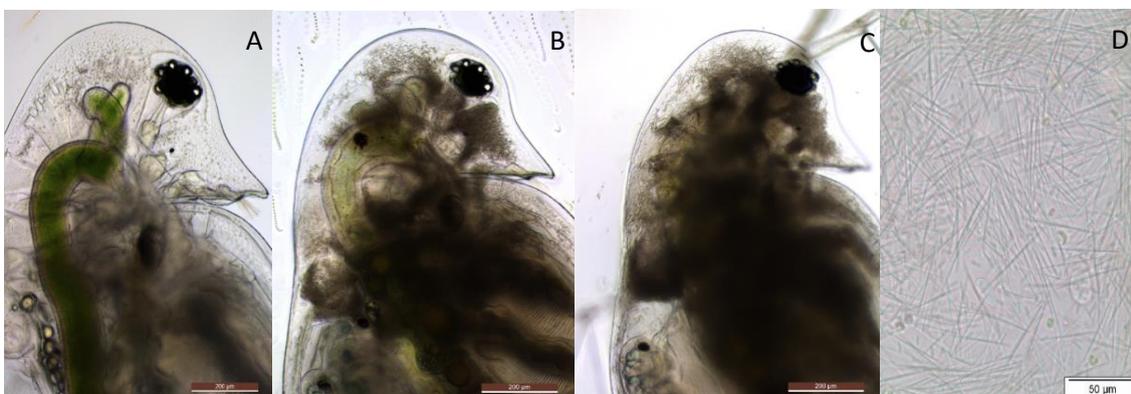


Fig. 2 - Estádios da infecção por *M. bicuspidata* em *Daphnia galeata* × *longispina* (retirado de Cuco et al. 2017 a). A – dáfnia não infectada; B – primeiros sinais do desenvolvimento da infecção (o corpo fica opaco com a presença de ascósporos); C – sinais tardios do desenvolvimento da infecção (cavidade corporal completamente preenchida com ascósporos); D – detalhe de ascósporos libertados por hospedeiros mortos.

Vários estudos foram realizados com o intuito de compreender a influência dos contaminantes no modelo *Daphnia*-parasita. Coors e De Meester (2008) testaram potenciais interações entre três fatores de stress (predação, parasitismo e exposição ao inseticida carbarilo) e concluíram que a exposição ao carbarilo interagiu sinergicamente com o parasita no que respeita à sobrevivência (isto é, aumentou a suscetibilidade do hospedeiro ao parasita), sugerindo uma atividade imuno-moduladora do inseticida. Buser et al. (2012) encontraram mudanças significativas na composição taxonómica e clonal em populações experimentais de *Daphnia* causadas pelo parasita *Metschnikowia* sp. e também pela exposição a um inseticida

(diazinon). Cuco et al. (2017 a) demonstraram o efeito antiparasítico do fungicida tebuconazole a baixas concentrações no modelo *Daphnia* spp. x *Metschnikowia bicuspidata*. Posteriormente, estes autores verificaram uma supressão drástica da infecção conforme o cenário de exposição ao tebuconazole, sendo necessária uma concentração ligeiramente superior para conseguir obter o mesmo efeito nos casos em que este era aplicado tardiamente (Cuco et al. 2017b). Neste trabalho, Cuco et al. (2017b) hipotetizaram que o tebuconazole inibe a esporulação de *M. bicuspidata*, uma vez que este fungicida foi eficaz na prevenção de sinais de infecção (presença de esporos no hospedeiro) mesmo quando aplicado tardiamente. Tendo em conta estes resultados, é importante perceber se efetivamente o tebuconazole só inibe a esporulação ou se tem influência noutra fase do ciclo de vida do parasita, para uma melhor compreensão dos efeitos causados por este fungicida no modelo estudado.

1.5. Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo foi testar a influência do tempo de exposição a várias concentrações do fungicida tebuconazole (um fungicida azólico), numa tentativa de clarificar a relevância ecológica e a reversibilidade dos efeitos antiparasíticos observados por Cuco et al. (2017a; 2017b). Para isto, o modelo que será utilizado será o sistema hospedeiro-parasita (*Daphnia galeata* x *longispina* - *Metschnikowia bicuspidata*). Deste modo, pretende-se comparar o sucesso da infecção e a virulência do parasita quando o modelo biológico não está exposto ao tebuconazole, quando está exposto de forma contínua (exposição acompanha todo o ciclo de vida do parasita), e quando a exposição é curta (4 dias), média (8 dias) ou longa (12 dias). Assim, será possível esclarecer quais os cenários mais relevantes em termos da anteriormente observada supressão da infecção, bem como compreender quais os momentos do ciclo de vida do microparasita (ver ponto 2.1.2) mais suscetíveis a este agroquímico (ver metodologia).

2 METODOLOGIAS

2.1. Modelo biológico

2.1.1. Hospedeiro (*Daphnia galeata* × *longispina*)

O hospedeiro utilizado neste estudo foi um microcrustáceo zooplanctónico que pertence à família Daphniidae e ao género *Daphnia* (ordem Cladocera). O complexo *Daphnia longispina* inclui as espécies *D. longispina* (sensu Petrusek et al., 2008), *D. lacustris*, *D. cucullata*, *D. galeata*, *D. umbra*, *D. mendotae*, *D. dentifera* e *D. thorata*, bem como os seus híbridos. Na Europa, *D. longispina*, *D. galeata* e *D. cucullata* são as espécies mais frequentes e é comum coexistirem e hibridizarem, sendo que os seus híbridos produzem descendência viável; as espécies parentais e seus híbridos apenas são distinguíveis geneticamente (Petrusek et al., 2008). Neste estudo, o modelo utilizado foi o clone AMM_12 (*Daphnia galeata* × *longispina*), um híbrido isolado do lago Ammersee (Alemanha) e já usado em estudos anteriores (Buser et al., 2012; Cuco et al., 2017 b; Yin et al., 2011).

Segundo Ebert (2008), todas as espécies do género *Daphnia* produzem a sua primeira ninhada (até 20 ovos) entre os 7 e os 15 dias, a 20°C, dependendo da quantidade e qualidade do alimento. A sua taxa de crescimento é também proporcional à qualidade e quantidade de alimento. Depois da primeira postura, estes organismos produzem ovos a cada 3-4 dias, coincidindo com a muda do exosqueleto (carapaça). O ótimo de temperatura para *Daphnia* varia entre os 20 e os 25°C, podendo, contudo, crescer numa gama entre os 2 e os 30°C. O seu modo de reprodução e a pequena dimensão apresentam-se como vantagens para a sua manutenção e manipulação em laboratório. O facto de produzir linhagens clonais permite a sua manutenção durante várias gerações, controlando a sua variabilidade genética. *Daphnia* tem um ciclo de vida curto e um elevado número de neonatos por ninhada, o que permite a obtenção de um elevado número de indivíduos para iniciar ensaios laboratoriais. A capacidade destes organismos responderem rapidamente a alterações ambientais é uma vantagem em testes de avaliação da saúde dos ecossistemas (Lampert, 2006).

2.1.2. Parasita (*Metschnikowia bicuspidata*)

O género *Metschnikowia*, originalmente descrito por Metschnikoff como *Monospora* (Metschnikoff, 1884), está dividido em três grupos de espécies que formam ascósporos em forma de agulha: o primeiro compreende as espécies aquáticas, o segundo as espécies terrestres, e o terceiro as espécies que produzem ascósporos grandes (Naumov, 2011).

Produtora de ascósporos de pequena dimensão, *M. bicuspidata* pertence ao primeiro grupo (Naumov, 2011). Este género, e em particular *M. bicuspidata*, encontra-se distribuído mundialmente (Moore & Strom, 2003). Para este trabalho, obtivemos suspensões de ascósporos deste parasita, que foram gentilmente cedidas por Justyna Wolinska (IGB – Berlim), permitindo o estabelecimento de culturas nos laboratórios do Dep. Biologia da UM (ver ponto 2.3). Os ascósporos originais vieram de uma cultura laboratorial implementada a partir de um isolado do lago Ammersee.

A levedura *M. bicuspidata* é um endoparasita e, por isso, necessita de estar dentro da cavidade corporal do hospedeiro para conseguir reproduzir-se (Hall et al., 2009); até hoje, não foi possível manter a totalidade do seu ciclo de vida em laboratório. Isto implica que, para a manutenção de culturas em laboratório e produção de ascósporos, seja necessária uma cultura de hospedeiros infetados para garantir a transmissão cíclica do parasita. Os hospedeiros infetados provenientes dessa cultura são usados como fonte de ascósporos para as experiências (ver ponto 2.3). Em laboratório, é possível manipular hospedeiros infetados bem como manter o controlo da eficiência da transmissão e da dose que deve ser administrada, o que é importante quando se pretende testar outras variáveis (Ebert et al., 2000).

2.2. Manutenção de *Daphnia* em laboratório

A manutenção de *Daphnia* em laboratório requer um meio de cultura e fontes de alimento adequados, e depende de rotinas laboratoriais programadas. Apesar de os meios de cultura naturais serem mais realistas, apresentam inúmeras desvantagens no cultivo de animais de água doce. Em contraste, os meios de cultura sintéticos originam vários problemas pela sua artificialidade. Os meios semissintéticos representam um compromisso que, no caso de *Daphnia*, se tem revelado extremamente satisfatório (Loureiro et al., 2011); por esse motivo, foi essa a escolha para este trabalho. Relativamente à fonte de alimento, a maioria dos investigadores que usa este modelo biológico utiliza microalgas verdes, nomeadamente *Scenedesmus* sp. e *Ankistrodesmus* sp. (Gomez et al., 2012), *Scenedesmus obliquus* (Hesse et al., 2012), *Raphidocelis subcapitata* (Cuco et al., 2016), ou *Chlorella vulgaris* (Grintzalis et al., 2017). Para tal, torna-se necessário também cultivar estes organismos microscópicos, que têm requisitos próprios.

2.2.1. Meios de cultura

Neste trabalho experimental utilizaram-se dois tipos de meios de cultura: um para o cultivo de *Daphnia* (COMBO-*Daphnia*) e outro para o cultivo de microalgas (COMBO-*algae*), os quais derivam de um meio combinado (COMBO) para cultivar microalgas e zooplâncton (Kilham et al., 1998). O meio COMBO é utilizado para o cultivo de vários organismos de água doce. É um meio sintético já que é definido quimicamente e requer concentrações fixas de vários iões fundamentais que são adicionados, em solução, a água desmineralizada, de osmose reversa ou água ultrapura. A sua receita original deriva do meio Elendt M4/M7 (meio ótimo para cultivar *Daphnia* a longo termo) e do meio WC de Guillard (receita original utilizada para culturas de microalgas de água doce), sendo que o seu rácio molar Ca:Mg (1.7:1) é mais realista (Naddy et al., 2002; Welsh et al., 2000) do que de outras águas reconstituídas (ex: “ASTM hard water”, descrito por ASTM, 1980; USEPA, 2002) e não prejudica o crescimento de microalgas (Kilham et al., 1998). Para o cultivo de *Daphnia*, surgiu uma variante (H-H COMBO) com um teor mais elevado de cálcio, magnésio e bicarbonato (dureza aproximada 110-115 mg CaCO₃ L⁻¹), que permite cultivar e realizar experiências em peixes, microalgas e zooplâncton (Baer & Goulden, 1998). A variante aqui descrita (COMBO-*Daphnia*) conjuga os componentes básicos do meio H-H COMBO com um extrato orgânico e uma solução de selénio. O selénio é um suplemento extremamente importante para a manutenção de *Daphnia* (Keating & Dagbusan, 1984) e o extrato orgânico proporciona oligoelementos essenciais à saúde das culturas no longo termo (Loureiro et al., 2011).

Os componentes básicos do meio COMBO-*Daphnia* são as soluções de CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, NaHCO₃ e KCl e uma solução combinadas das vitaminas cianocobalamina (B12), biotina (H) e tiamina-HCl (B1), que devem ser adicionados a água desionizada (Tabela 2). O aditivo orgânico utilizado é um extrato da alga *Ascophyllum nodosum* que é adicionado diretamente nos frascos de cultura, numa proporção de 4 mL por L de meio. A concentração da suspensão do aditivo referido foi sempre normalizada através do acerto da sua absorvância a 400 nm, numa diluição de 1:10 (com água desionizada), para valores entre 0.600-0.630. O meio de cultura foi preparado em grandes volumes (tipicamente 20 L; ver ANEXO 1) e misturado através de agitação ou arejamento, de forma a promover a distribuição uniforme dos sais em solução e a estabilização do pH (entre 7 e 8).

Para o cultivo de microalgas, foi utilizada a variante COMBO-*algae* cuja composição é idêntica à do meio COMBO original, com pequenas alterações e inclusão de tampão TES (pKa a

20°C = 7.5) (Smith & Foy, 1974). O meio em questão foi autoclavado de modo a eliminar bactérias ou outros microrganismos que possam interferir o crescimento das microalgas.

Tabela 2 – Componentes básicos e composição dos meios COMBO-*Daphnia* e COMBO-*algae*.

Componente	Composição	
	COMBO- <i>Daphnia</i>	COMBO- <i>algae</i>
CaCl ₂ .2H ₂ O	110.28 mg/L	36.76 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	110.91 mg/L	36.97 mg/L
NaHCO ₃	126.00 mg/L	12.60 mg/L
KCl	7.45 mg/L	-
K ₂ HPO ₄	-	8.71 mg/L
NaNO ₃	-	85.01 mg/L
H ₃ BO ₃	-	1.00 mg/L
SeO ₂	1.5 µg/L	-
sol. combinada de micronutrientes	-	4.360 mg/L
• Na ₂ .EDTA.2H ₂ O		1.000 mg/L
• FeCl ₃ .6H ₂ O		0.001 mg/L
• CuSO ₄ .5H ₂ O		0.022 mg/L
• ZnSO ₄ .7H ₂ O		0.012 mg/L
• CoCl ₂ .6H ₂ O		0.180 mg/L
• MnCl ₂ .4H ₂ O		0.006 mg/L
• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		
sol. combinada de vitaminas		
• Cianocobalamina (B12)	0.55 µg/L	0.55 µg/L
• Biotina (H)	0.5 µg/L	0.5 µg/L
• Tiamina-HCl (B1)	100 µg/L	100 µg/L
aditivo orgânico (extrato da alga <i>Ascophyllum nodosum</i>)	4 mL/L	-
TES	-	115 mg/L

2.2.2. Fonte de alimento: suspensão de microalgas *Raphidocelis subcapitata*

Para a preparação da suspensão de microalgas realizou-se a inoculação das mesmas em meio de cultura COMBO-*algae* através de um inóculo previamente preparado. A suspensão de algas foi deixada a crescer durante 7-8 dias (fase de crescimento exponencial); nesse período, o meio foi permanentemente arejado com a ajuda de um compressor (para evitar a deposição

das células e garantir um fluxo permanente de CO₂) e exposto à luz para promover o crescimento das microalgas. O ar providenciado pelo compressor foi filtrado a montante com recurso a um filtro de seringa de 0.2 µm.

Após este período, procedeu-se à centrifugação do meio (centrífuga B. Braun Sigma 4K10) a 7500 rpm durante 5 minutos, a 20°C, de forma a concentrar as microalgas. Depois ressuspendeu-se o sedimento em meio COMBO-*Daphnia*, obtendo-se assim uma suspensão concentrada de *R. subcapitata* para utilizar como fonte de alimento nas culturas e experiências com *Daphnia* spp.. Antes de usar, a concentração desta suspensão foi normalizada através do acerto da sua densidade ótica a 440 nm, numa diluição de 1:10 (com meio COMBO-*Daphnia*), para valores entre os 0.700-0.900 (idealmente acima dos 0.800).

De modo a determinar a quantidade exata de suspensão que se deveria dar aos organismos, construiu-se uma reta de calibração com base na relação entre a densidade celular de microalgas e a densidade ótica a 440 nm. Para tal, efetuaram-se diluições de várias suspensões de microalgas e procedeu-se à medição da densidade ótica com um espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20) e à contagem do número de células presentes (de forma a estimar a densidade celular) com uma câmara de Neubauer. Foram contadas pelo menos 400 células por amostra. Deste modo, foi possível obter uma relação robusta entre a densidade ótica e a densidade celular (Fig. 3), que permite estimar a densidade celular a partir da simples medida de densidade ótica das suspensões algais preparadas.

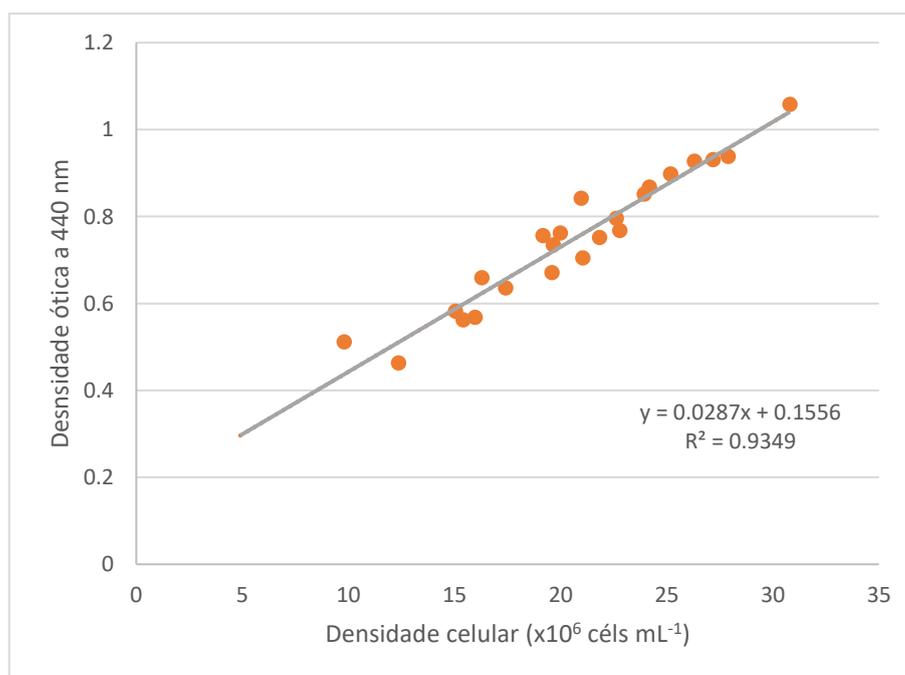


Fig. 3 - Relação entre a densidade ótica e a densidade celular de microalgas.

2.2.3. Rotinas de manutenção

As culturas de *Daphnia* foram mantidas no meio de cultura COMBO-*Daphnia* (ver acima), numa sala com a temperatura controlada ($19\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com um fotoperíodo aproximado de 16 h luz e 8 h escuridão. As culturas consistiram em grupos clonais de *Daphnia*, todas com a mesma idade, mantidas em frascos de vidro de capacidades 250 ou 800 mL. Às segundas, quartas e sextas procedeu-se à troca do meio de modo a não haver uma acumulação de metabolitos tóxicos. Também nesses dias, procedeu-se à sua alimentação com *R. subcapitata* numa concentração de $1,5 \times 10^5$ céls mL⁻¹ (valor baseado em vários estudos, tais como Castro et al., 2007; Cuco et al., 2016; Gonçalves et al., 2007). Entre a terceira e quinta ninhadas efetuou-se a renovação das culturas, isolando novos frascos com neonatos e descartando as progenitoras, garantindo a manutenção cíclica de culturas jovens e em idade reprodutora em laboratório.

2.3. Manutenção de *Metschnikowia bicuspidata* em laboratório

As suspensões de ascósporos de *M. bicuspidata* foram o ponto de partida para o estabelecimento de culturas em laboratório e para iniciar experiências. Para a obtenção das suspensões de ascósporos do endoparasita foi necessário esmagar hospedeiros infetados em água destilada (Cuco et al., 2017 a). De maneira a saber qual a densidade de ascósporos presentes na suspensão, procedeu-se à sua contagem com a ajuda de uma câmara de Neubauer para determinar a quantidade de esporos aquando do procedimento de infeção (ver ponto 2.5).

As culturas de *M. bicuspidata* foram mantidas numa cultura de *Daphnia* infetadas. Todas as semanas foram adicionados hospedeiros saudáveis à cultura para garantir uma contínua presença de hospedeiros e assegurar a transmissão do parasita. Os hospedeiros infetados que vão morrendo ao longo do tempo são fonte de esporos, permitindo a perpetuação da transmissão. Este procedimento garante que haja sempre hospedeiros infetados para a preparação de suspensões de ascósporos e para começo de novos testes. Estas suspensões foram guardadas num frigorífico a 4°C , por um período máximo de dois meses. Quando necessário, as suspensões de esporos produzidas (e não usadas em experiências) serviram para infetar novos hospedeiros, como medida de segurança para garantir a perpetuação da transmissão nas culturas laboratoriais.

2.4. Tebuconazole: obtenção e preparação

O tebuconazole utilizado nesta experiência (Tebuconazole PESTANAL®, n° CAS: 107534-96-3; $C_{16}H_{22}ClN_3O$; massa molar $307.82 \text{ g mol}^{-1}$) foi adquirido à Sigma Aldrich (Munique, Alemanha). Uma vez que este composto tem uma baixa solubilidade em água (36 mg L^{-1} a 20°C ; NCBI sem data), este foi dissolvido em etanol absoluto (Ethanol absolute anhydrous CARLO ERBA Reagents®, n° CAS: 64-17-5; C_2H_5OH ; massa molar 46 g mol^{-1}), obtendo-se assim as soluções que iriam ser utilizadas ao longo da experiência. A concentração final de etanol nos frascos de teste (ver ponto 2.6) foi igual em todas as réplicas (0.1 mL L^{-1}). Os trabalhos de Cuco et al. (2017 b) demonstraram que o etanol (concentração máxima de 0.1 mL L^{-1}) não influencia o desempenho do hospedeiro nem o sucesso do parasita em causar infecção.

Para verificar a validade das concentrações nominais usadas, Cuco et al. (2017 b) escolheu aleatoriamente duas alíquotas de uma gama de soluções teste ($3.65 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $240 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e enviou para serem quantificadas num laboratório de análise independente. A quantificação do tebuconazole confirmou a validade das concentrações nominais, despistando fenómenos de adsorção ou degradação, tendo-se verificado pequenos desvios (em média, na ordem dos 6 % a 11 %) relativamente às concentrações nominais.

2.5. Procedimento de infecção

Aquando das experiências, e de forma a ter total controlo e uniformização na infecção dos hospedeiros (*Daphnia*), utilizou-se um procedimento de infecção padronizado (Fig. 4). Sucintamente, *D. galeata* × *longispina* foi exposta a uma concentração de $700 \text{ esporos mL}^{-1}$ de *M. bicuspidata* (Lohr, Yin, & Wolinska, 2010) durante 2 dias, ao quinto dia de vida, para maximizar a probabilidade de infecção (Hesse et al., 2012). Para garantir uma elevada taxa de filtração e, conseqüentemente, uma elevada taxa de entrada de ascósporos para os hospedeiros, no dia 5 reduziu-se o volume dos frascos em 50% (de 100 mL para 50 mL), e os organismos não foram alimentados (Hall et al. 2007). No dia 6 não se alteraram as condições do dia 5. No dia 7 aumentou-se o volume para 150 mL e retomou-se o regime alimentar de $1.5 \times 10^5 \text{ céls mL}^{-1}$ de microalgas bem como a periodicidade da mudança de meio (de três em três dias).

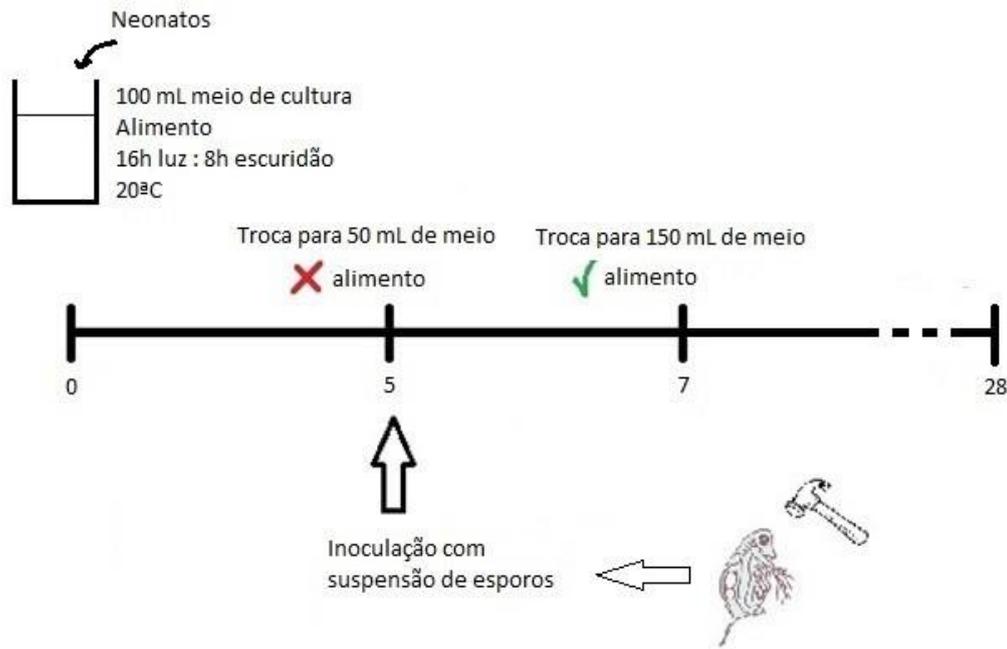


Fig. 4 - Procedimento de infecção de *D. galeata* × *longispina* por *M. bicuspidata*.

2.6. Desenho experimental

2.6.1. Avaliação da suscetibilidade clonal de *Daphnia* ao parasita

De maneira a testar a suscetibilidade clonal de *Daphnia* ao parasita utilizado neste estudo, realizou-se uma primeira experiência preliminar onde se expuseram 4 clones de *D. galeata* ou *D. galeata* × *longispina* (AMM_10, AMM_12, AMM_47 e AMM_51) a *M. bicuspidata*. Para tal, foram colocados 20 neonatos nascidos entre a 3ª e 4ª ninhadas das culturas laboratoriais de *Daphnia* de cada clone em 11 frascos (3 frascos por clone, exceto o AMM_10 por falta de hospedeiros aquando o início da experiência) com as condições ótimas para o modelo hospedeiro-parasita em questão ($1,5 \times 10^5$ céls mL⁻¹ de *R. subcapitata*, 16h luz : 8h escuridão e $19 \pm 2^\circ\text{C}$; Fig. 5). Ao quinto dia de vida dos organismos procedeu-se à sua infecção com *M. bicuspidata* de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.5.. As trocas de meio de cultura, bem como a alimentação dos hospedeiros, foram efetuadas 2 vezes por semana.

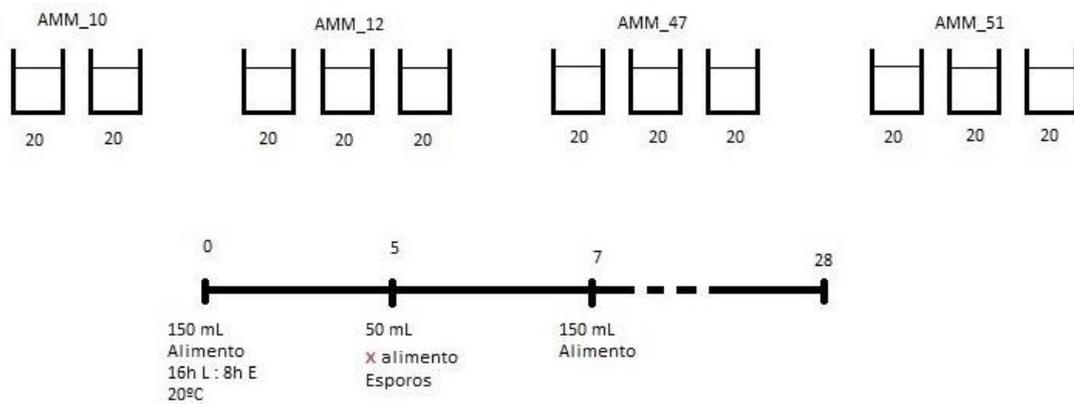


Fig. 5 - Desenho experimental e procedimento de infecção da primeira experiência relativa à suscetibilidade clonal.

Com base nos resultados da primeira experiência (ver ponto 3.1 abaixo), fez-se uma segunda experiência (Fig. 6), muito idêntica à primeira, onde apenas se testaram os clones mais suscetíveis (AMM_12 e AMM_51).

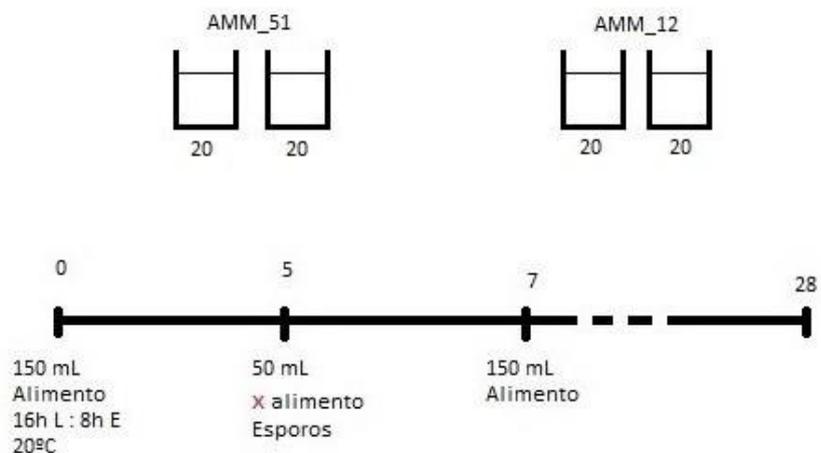


Fig. 6 - Desenho experimental e procedimento de infecção da segunda experiência relativa à suscetibilidade clonal.

Em ambas as experiências acima descritas, os descendentes das fêmeas originais foram descartados. Estimou-se a proporção de organismos infetados (prevalência da infecção) em cada frasco. Os organismos mortos foram observados ao microscópio invertido (Leica DMIL) para confirmar a infecção (presença de esporos na cavidade corporal). Ambas as experiências duraram 28 dias, uma vez que Cuco et al. (2017 a) demonstrou que a infecção normalmente acontece nas 3 a 4 primeiras semanas de vida do hospedeiro. No final dos testes, os hospedeiros sobreviventes foram também observados ao microscópio.

2.6.2. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 1

O desenho experimental da experiência 1 consistiu na manipulação de dois fatores, a concentração de tebuconazole e o tempo de exposição a este fungicida, simulando a ocorrência de pulsos do fungicida no ecossistema aquático coincidindo com diferentes fases do ciclo de infecção pelo parasita. Desta forma, tentou-se compreender a importância do tempo de exposição e da concentração no sucesso da infecção e na virulência do parasita no modelo *Daphnia* sp. x *Metschnikowia bicuspidata*.

As concentrações de tebuconazole utilizadas (baseados no trabalho de Cuco et al. 2017 b) foram:

- (i) 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, que está no limiar da supressão da infecção (C1);
- (ii) 27 $\mu\text{g L}^{-1}$, que está muito acima do limiar da supressão da infecção (C2).

Por sua vez, os tempos de exposição estudados foram quatro, estando relacionados com momentos do ciclo de vida do parasita em questão (Fig. 7):

- (i) curto (T8 – exposição do modelo hospedeiro-parasita durante a germinação dos esporos do parasita);
- (ii) médio (T12 – exposição do modelo hospedeiro-parasita durante a germinação dos esporos e crescimento vegetativo do parasita);
- (iii) longo (T16 – exposição do modelo hospedeiro-parasita até à data prevista da esporulação do parasita);
- (iv) contínuo (TC - exposição do modelo hospedeiro-parasita durante a totalidade da experiência).

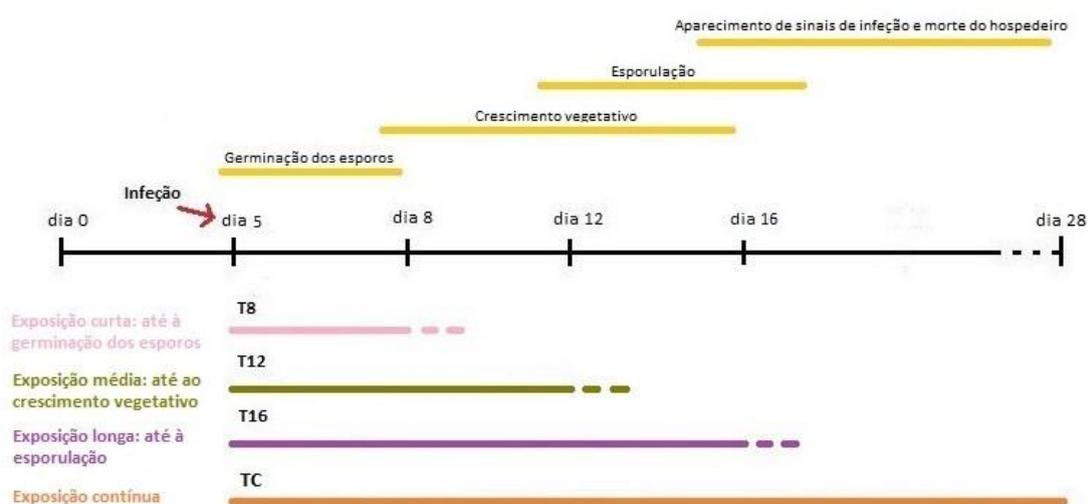


Fig. 7 - Desenho experimental representando os estádios hipotéticos do ciclo de vida de *M. bicuspidata* (a amarelo, em cima) a par com os cenários de exposição ao fungicida tebuconazole (T8, T12, T16, TC e

T0, em baixo) – ver texto. As linhas a tracejado nos tempos de exposição representam a retirada progressiva do tebuconazole (ver abaixo).

Em todos os tempos de exposição, as alíquotas referentes às concentrações de tebuconazole foram adicionadas aquando do momento de infeção, ou seja ao quinto dia de vida dos organismos. Desta forma, em T8 a exposição ao agroquímico durou 4 dias, em T12 durou 8 dias e em T16 durou 12 dias. A utilização de diferentes tempos de exposição teve como objetivo simular um cenário de exposição intermitente, que é o cenário mais realista na natureza. Como a redução das concentrações não se dá abruptamente no meio natural, optou-se por retirar progressivamente o tebuconazole aquando do final da exposição, sendo que se reduziu a concentração para 50% e 0 % do valor inicial nos dias a seguir ao término da exposição. Por exemplo, para o tratamento T12 e na concentração $13.5 \mu\text{g L}^{-1}$, isto significou um perfil de concentração decrescente entre os dias 12 ($13.5 \mu\text{g L}^{-1}$), 13 ($6.75 \mu\text{g L}^{-1}$) e 14 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) do ensaio.

Para além dos tratamentos referidos, foi ainda realizado um controlo negativo (T0), que serviu como indicação do sucesso da infeção na ausência de exposição ao tebuconazole.

Posto isto, o desenho experimental consistiu em 4 tratamentos x 2 concentrações x 5 réplicas + 3 réplicas T0 = 43 unidades experimentais. Cada unidade experimental consistia num frasco de vidro com 150 mL de meio de cultura com as respetivas concentrações de tebuconazole e um grupo de 10 hospedeiros (*Daphnia* fêmeas). O teste teve início com neonatos (organismos com < 24 h), nascidos entre a 3ª e 4ª ninhadas das culturas laboratoriais de *Daphnia*. As trocas de meio de cultura, bem como a alimentação dos hospedeiros com 1.5×10^5 céls mL⁻¹ de microalgas, foram feitas de 3 em 3 dias. Ao quinto dia de vida, os hospedeiros foram inoculados com o parasita e com o tóxico, conforme descrito anteriormente (ver acima e ver ponto 2.5).

Durante toda a experiência, os descendentes das fêmeas originais foram descartados. Em cada frasco, estimou-se a proporção de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal e a proporção de hospedeiros infetados – vivos ou mortos – onde se observou a presença de esporos do parasita. Os organismos mortos foram vistos no microscópio invertido (Leica DMIL) para confirmar a presença de esporos na cavidade corporal. A experiência durou 28 dias e, no final do ensaio, os hospedeiros sobreviventes foram também observados ao microscópio.

2.6.3. Influência do tempo de exposição: experiência 2

O desenho experimental da experiência 2 foi idêntico ao da experiência 1, com alteração do número de concentrações utilizadas, simulando igualmente a ocorrência de pulsos de tebuconazole no ecossistema aquático coincidindo com diferentes fases do ciclo de infecção. Os *timings* de exposição mantiveram-se inalterados. O objetivo manteve-se relativamente à Experiência 1, mas o leque de concentrações foi alargado para possibilitar uma melhor compreensão da influência da interação entre o tempo de exposição e a concentração de tebuconazole no sucesso da infecção e na virulência do parasita.

As concentrações de tebuconazole utilizadas (baseados no trabalho de Cuco et al. 2017 b) foram:

- (i) 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C1);
- (ii) 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C2);
- (iii) 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C3);
- (iv) 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C4);
- (v) 20.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C5).

Em todos os tempos de exposição, as alíquotas referentes às concentrações de tebuconazole foram adicionadas aquando do momento de infecção, ou seja, no quinto dia de vida dos organismos. Contrariamente ao que se efetuou na experiência 1, na presente experiência não se optou por retirar progressivamente o tebuconazole aquando do final da exposição, por questões logísticas.

Para além dos tratamentos referidos, foi também realizado o controlo negativo (T0), servindo como indicação comparativa do sucesso da infecção na ausência de exposição ao tebuconazole, tal como na Experiência 1.

Posto isto, o desenho experimental da experiência 2 consistiu em 4 tratamentos x 5 concentrações x 5 réplicas + 5 réplicas T0 = 105 unidades experimentais. Todos os procedimentos experimentais deste ensaio seguiram a mesma lógica e o mesmo protocolo da Experiência 1. A Experiência 2 durou 30 dias, mais dois do que a experiência anterior, porque se verificou um atraso no aparecimento da infecção.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos nas experiências 1 e 2 foram tratados através de modelos lineares

generalizados (GLM) de forma a tentar perceber a importância da interação e o efeito isolado da concentração de tebuconazole e do tempo de exposição. A presença de esporos na cavidade corporal e a mortalidade foram analisadas como dados distribuídos binomialmente. Todas as análises estatísticas foram executadas no software R, versão 3.4.0 (R Core Team, 2017).

3 RESULTADOS

3.1. Avaliação da suscetibilidade clonal de *Daphnia* ao parasita

Verificou-se que, dos quatro clones em estudo, o mais suscetível à estirpe de *M. bicuspidata* existente no laboratório foi AMM_51, seguido de AMM_12, já que apresentaram uma prevalência de infecção (confirmada pela presença de esporos na cavidade corporal) de 73.3 e 55%, respectivamente (Fig. 8). No que diz respeito à mortalidade (percentagem de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal), esta foi variável (12.5 a 35%) mas sem relação com a proporção de hospedeiros com esporos presentes (Fig. 8).

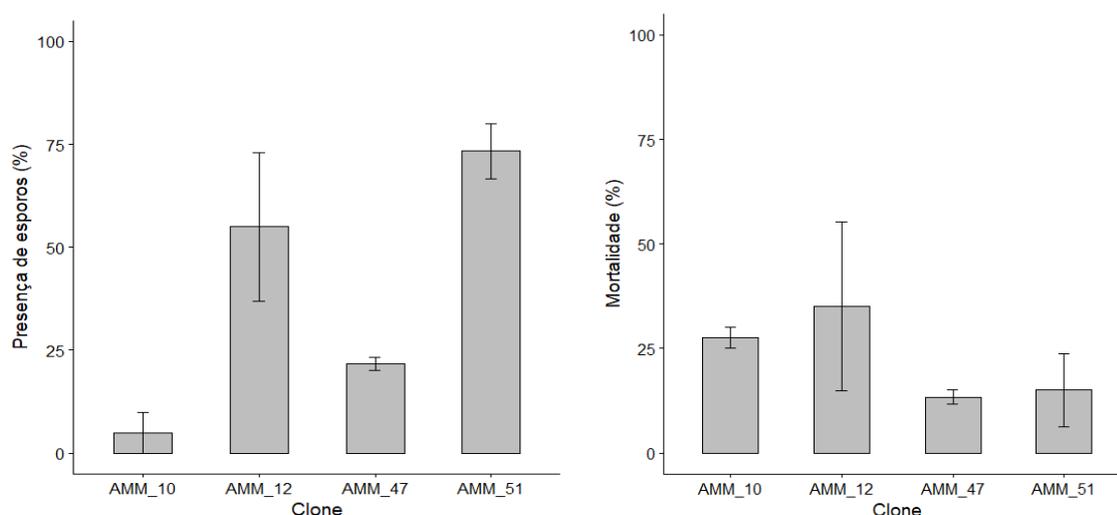


Fig. 8 - Mortalidade (à esquerda) e presença de esporos de *M. bicuspidata* na cavidade corporal de diferentes clones do hospedeiro (à direita). As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

Com base nos resultados da experiência anterior, repetiu-se o desenho experimental apenas para os clones AMM_12 e AMM_51. Nesta segunda experiência preliminar, verificou-se que era o clone AMM_12 o mais suscetível ao parasita em questão (prevalência de 32.5%; ver Fig. 9). Relativamente à mortalidade, verificou-se que esta era maior para o clone AMM_51 (47.5%; ver Fig. 9). Os dados de prevalência foram bastante mais reduzidos nesta experiência, o que é pouco satisfatório e indicador de variabilidade natural no sucesso da infecção.

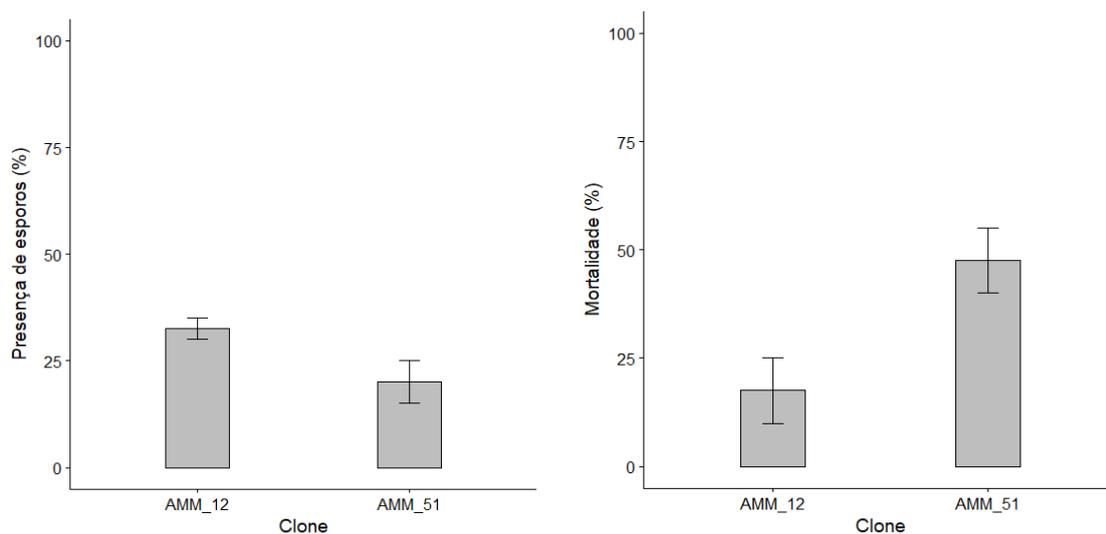


Fig. 9 - Mortalidade (à esquerda) e presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro (à direita) por *M. bicuspidata* dos clones de *Daphnia* mais suscetíveis ao parasita. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

3.2. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 1

Os resultados obtidos nesta fase (Fig. 10 e 11) não foram totalmente satisfatórios, uma vez que a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro obtida no controlo negativo (ausência de tebuconazole) foi muito baixa (< 40%), à semelhança da segunda experiência de suscetibilidade ao parasita (ver acima). Ainda assim, foi possível observar um efeito do tebuconazole sobre o parasita (e na supressão da infeção), porque em todos os tratamentos as percentagens de presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro foram ainda mais baixas do que no referido controlo.

Relativamente à presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro (Fig. 10), verificou-se um efeito significativo do tempo de exposição (glm binomial: $\chi^2 = 24.7$; g.l. = 3, 32; $p < 0.001$) e da concentração de tebuconazole ($\chi^2 = 6.7$; g.l. = 1, 32; $p < 0.01$), e de forma independente (interação: $\chi^2 = 3.5$; g.l. = 3, 32; $p = 0.32$). Desta forma, concluiu-se que a percentagem de hospedeiros com esporos do parasita na cavidade corporal foi significativamente superior para os tempos de exposição mais curtos e para a concentração mais baixa deste fungicida. Efetivamente, na concentração mais baixa e para os tempos de exposição mais curtos (T8 e T12), a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro aproximou-se dos valores observados no controlo negativo (i.e., na ausência de tebuconazole). Devido ao ajuste do modelo

não ter sido o melhor (no tratamento TC, todas as taxas de infecção foram de 0%), não foi possível testar diferenças significativas entre os tempos de exposição.

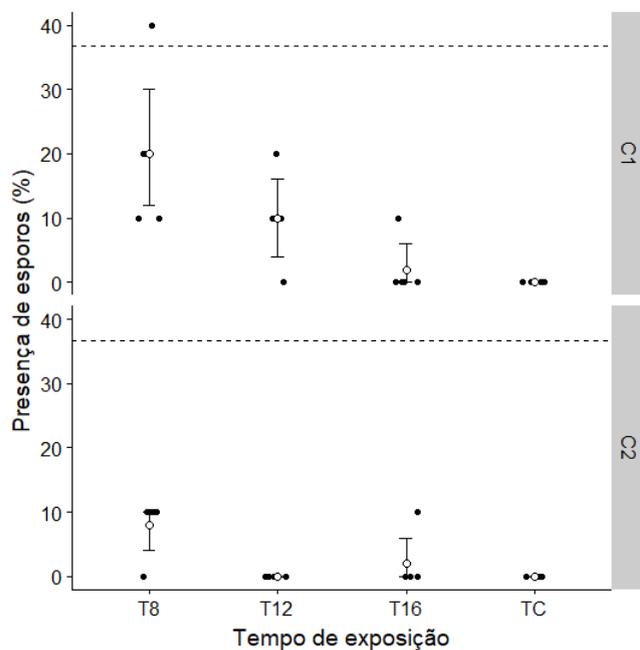


Fig. 10 - Proporção de hospedeiros (*D. galeata* × *longispina*) infetados onde se observou a presença de esporos do parasita (*M. bicuspidata*). Os dados são apresentados em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16, ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2 = 27 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os pontos individuais (a preto) representam as observações em cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole).

Quanto à mortalidade do hospedeiro (Fig 11), verificou-se um efeito significativo do tempo de exposição (glm binomial: $\chi^2 = 25.5$; g.l. = 3, 32; $p < 0.001$), independentemente da concentração de tebuconazole (interação: $\chi^2 = 6.4$; g.l. = 3, 32; $p = 0.094$). Contudo, não se observou qualquer efeito da concentração ($\chi^2 = 2.5$; g.l. = 1, 32; $p = 0.109$). Assim, observou-se que a mortalidade é significativamente superior nos tempos de exposição mais curtos (T8 e T12), para ambas as concentrações de tebuconazole (Teste de Dunnett, $p \leq 0.05$).

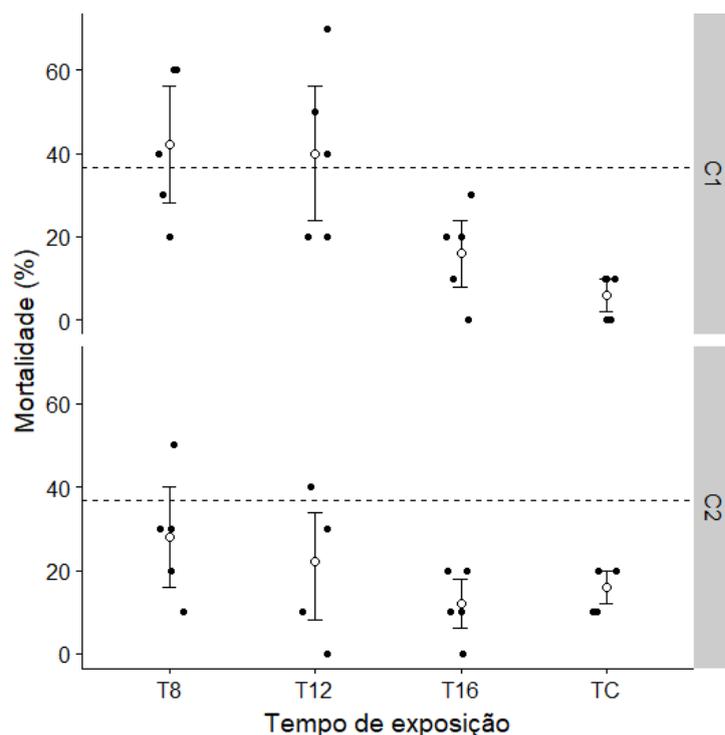


Fig. 11 - Mortalidade (proporção de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal) em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16 ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 13.5 µg L⁻¹; C2 = 27 µg L⁻¹). Os pontos individuais (a preto) representam as réplicas de cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole).

Registe-se o facto da tendência do gráfico da mortalidade ser idêntica ao da presença de esporos na cavidade corporal, o que sugere que a mortalidade estará relacionada com a presença do parasita, mesmo não tendo havido esporulação em todos os hospedeiros que morreram. Também se verificou um efeito drástico do tebuconazole na esporulação mesmo nas exposições curtas, já que no gráfico da Fig. 10 a proporção de hospedeiros infetados com esporos é sempre mais baixa que no controlo negativo; o mesmo não é verdade para a mortalidade, sobretudo no tempo de exposição mais curto. No gráfico da Fig. 11, verifica-se uma percentagem de mortalidade natural associada ao controlo positivo de cerca de 20%; esta mortalidade não deverá estar relacionada com a infeção, uma vez que a presença de tebuconazole suprime completamente a infeção (Fig. 10).

3.3. Influência do tempo de exposição ao tebuconazole: experiência 2

Os resultados obtidos nesta experiência foram ainda menos satisfatórios do que a primeira experiência, na medida em que a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro na ausência do tebuconazole foi muito reduzida (<15%). Ainda assim, em relação à proporção de hospedeiros infetados (onde se observou a presença de esporos do parasita), verificou-se uma interação significativa ($\chi^2 = 26.0$; g.l. = 12, 80; $p = 0.01$) entre o tempo de exposição e a concentração. De facto, observou-se que com um aumento do tempo de exposição ocorreu uma diminuição do número de hospedeiros que apresentavam esporos, mas esta diminuição foi mais evidente para concentrações mais elevadas (> C3; Fig. 12). A concentrações baixas deste agroquímico (< 9 $\mu\text{g L}^{-1}$) não foi observada qualquer influência do tempo de exposição na proporção de hospedeiros com esporos na cavidade corporal (Fig. 12).

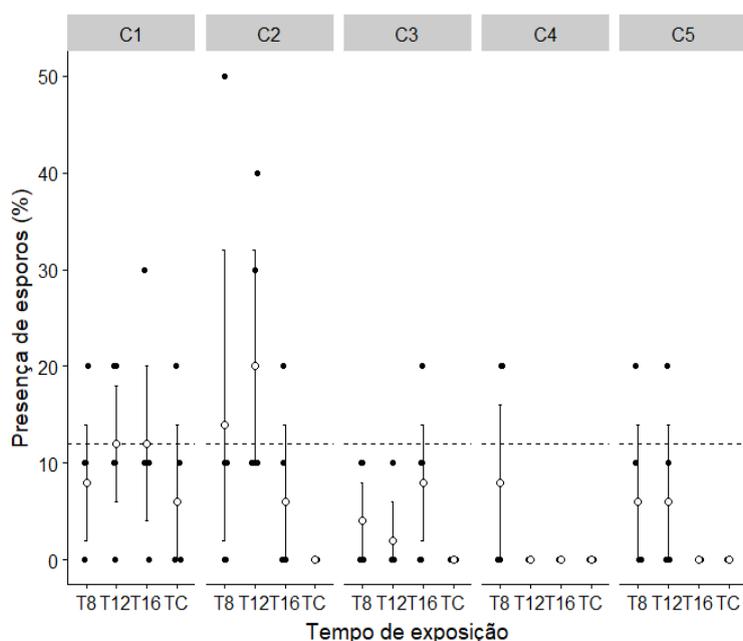


Fig. 12 - Proporção de hospedeiros (*D. galeata* \times *longispina*) onde se observou a presença de esporos do parasita (*M. bicuspidata*). Os dados são apresentados em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16, ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 4 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2 = 6 $\mu\text{g L}^{-1}$; C3 = 9 $\mu\text{g L}^{-1}$; C4 = 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C5 = 20.3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os pontos individuais (a preto) representam as observações em cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controle negativo (ausência de tebuconazole).

Quanto à mortalidade do hospedeiro (Fig. 13), não se verificou qualquer tipo de

interação (interação: $\chi^2 = 11.6$; g.l. = 12, 80; $p = 0.480$) nem efeitos significativos do tempo de exposição (glm binomial: $\chi^2 = 4.3$; g.l. = 3, 80; $p = 0.228$) ou da concentração de tebuconazole ($\chi^2 = 3.0$; g.l. = 4, 80; $p = 0.554$).

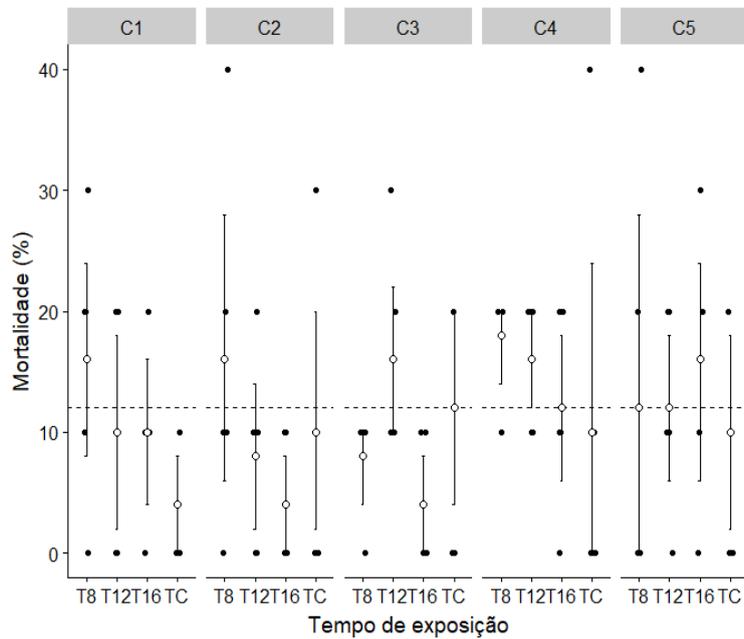


Fig. 13 - Mortalidade (proporção de hospedeiros mortos sem presença de esporos na cavidade corporal) em função do tempo de exposição (curto = T8, médio = T12, longo = T16 ou contínuo = TC) e da concentração de tebuconazole (C1 = 4 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2 = 6 $\mu\text{g L}^{-1}$; C3 = 9 $\mu\text{g L}^{-1}$; C4 = 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C5 = 20.3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os pontos individuais (a preto) representam as réplicas de cada tratamento, os pontos a branco representam a média, as barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% para a média (estimado assumindo não-normalidade dos dados, usando uma técnica de *bootstrap*) e a linha a tracejado representa a média do controlo negativo (ausência de tebuconazole).

4 DISCUSSÃO

A presença de tebuconazole no ambiente tem a capacidade de inibir a proliferação de *M. bicuspidata* nas populações de *Daphnia*. Do ponto de vista ecológico, este fenómeno pode prevenir a dispersão de doenças ou levar ao término de epidemias no campo (Cuco et al. 2017 b). Isto pode ter sérias consequências atendendo ao papel fundamental dos parasitas enquanto moduladores da diversidade genética e das dinâmicas populacionais (Cáceres et al., 2014; Mitchell, Read, & Little, 2004). Os resultados obtidos sugerem que a inibição da infeção causada pela presença deste fungicida pode diluir a pressão seletiva exercida pelos parasitas nas populações de hospedeiros. A contaminação por fungicidas pode, também, causar alterações na estrutura das comunidades de fungos não-alvo e nas funções e serviços dos ecossistemas a eles associados (McMahon et al., 2012; Zubrod et al., 2015). Por isso, os cenários de exposição dependentes do contexto ambiental permitem avaliar os efeitos de tóxicos em cenários mais realistas e devem ser considerados na avaliação de impacto ambiental dos antifúngicos. Importa prosseguir esta linha de investigação no sentido de investigar se o efeito antiparasítico observado é válido em cenários ecologicamente realistas, nomeadamente a concentrações baixas e em exposições curtas.

Os resultados obtidos neste estudo não foram suficientemente robustos, na medida em que a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro obtida no geral, e nos controlos negativos em particular, foi muito baixa (<40% quando se esperava uma percentagem de cerca de 80 a 100% verificada em outros trabalhos; Cuco et al., 2017 a; Cuco et al., 2017 b; Cuco et al., 2017 c). Todavia, o facto de em todos os tratamentos da Experiência 1 (influência do tempo de exposição ao tebuconazole) a presença de esporos ter sido ainda mais baixa que na ausência de tebuconazole demonstra que foi possível documentar o efeito do tebuconazole sobre o parasita.

O tebuconazole parece ter uma influência relevante no que toca à esporulação de espécies de fungos aquáticos (Dimitrov et al., 2014; Zubrod et al., 2011) e o nosso estudo revelou que este agroquímico, para além de atuar na esporulação de *M. bicuspidata*, atua também sobre o seu crescimento vegetativo. Esta ideia tinha já sido defendida por Cuco et al. (2017 b). Os compostos azólicos, como o tebuconazole, podem ter um efeito fungicida ou fungistático contra fungos patogénicos e fungos aquáticos não-alvo, atuando na inibição do crescimento vegetativo e na esporulação (dependendo da espécie; Manavathu, Cutright, & Chandrasekar, 1998). No nosso caso, o tebuconazole teve um efeito fungistático sobre o

parasita (e na supressão da infecção). Em exposições curtas e a concentrações mais baixas, o efeito do tebuconazole não foi eficaz, tendo-se verificado que a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro foi mais elevada nos tempos de exposição mais curtos (T8 e T12) e nas concentrações baixas (9 e 13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Estes valores de presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro foram muito próximos aos obtidos sem tebuconazole, o que sugere que exposições curtas a baixas concentrações têm o mesmo perfil de resposta que a ausência de exposição ao fungicida. Isto leva a crer que o tebuconazole não tem influência nas várias fases da infecção até um certo limiar, traduzido numa combinação de concentração e tempo de exposição adequados. De facto, verificou-se que numa exposição mais longa (T16) não houve sinais de infecção, isto é, que os hospedeiros não apresentaram esporos do parasita na sua cavidade corporal.

Os dados de mortalidade trouxeram informação adicional. O padrão observado para a mortalidade foi semelhante ao da presença de esporos. Contudo, esperava-se que o perfil de resposta fosse completamente aleatório, uma vez que este parâmetro contabilizou os hospedeiros mortos sem esporos na sua cavidade corporal e sabe-se que o tebuconazole não causa efeitos em *Daphnia* a estas concentrações (Cuco et al., 2016). Mesmo que os efeitos observados se devessem à eventual toxicidade do tebuconazole sobre *Daphnia*, então teríamos um perfil de resposta em que a mortalidade aumentaria com o aumento do tempo de exposição e com a concentração de tebuconazole. Contudo, verificou-se exatamente o oposto. Tal como no gráfico da presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro, a mortalidade foi mais elevada para tempos de exposição mais curtos e para concentrações de tebuconazole mais baixas. Isto indica que, em ambos os casos (presença de esporos na cavidade corporal e mortalidade) o tebuconazole atuou sobre o parasita, tendo uma ação protetora de diminuição dos danos da infecção. Conclui-se por isso que a mortalidade observada nos hospedeiros em que não se verificou presença de esporos terá sido devida ao parasita, que causou a morte do hospedeiro sem ter completado o seu ciclo de vida. A redução da mortalidade observada nas concentrações mais altas e nos períodos mais longos de exposição ao tebuconazole significa que este fungicida atuou em fases mais precoces do ciclo de vida do parasita, nomeadamente no crescimento vegetativo. Então, se por um lado o tebuconazole inibiu a esporulação (conforme demonstrado por Cuco et al. 2017 b) impedindo a transmissão da doença para novos hospedeiros, por outro lado, este agroquímico pareceu também prevenir danos causados pelo parasita a montante, nomeadamente durante a fase de crescimento vegetativo, em que as

células parasitas utilizam os recursos da hemolinfa do microcrustáceo (Engelbrecht et al., 2012).

A existência de mortalidade na ausência de outros sinais de infecção (presença de esporos) foi já observada neste e noutros modelos *Daphnia*-parasita. Nomeadamente, Cuco et al. (2017 b) demonstraram, para o mesmo modelo hospedeiro-parasita utilizado neste estudo, ausência de sinal de infecção mas presença de mortalidade quando o tebuconazole foi aplicado tardiamente. A aplicação tardia não consegue prevenir os danos a montante causados pelo crescimento vegetativo de *M. bicuspidata* em *Daphnia* havendo, portanto, uma morte dos hospedeiros sem outros sinais de infecção. Também Buser et al. (2012) e Engelbrecht et al. (2012) demonstraram efeitos de parasitas na mortalidade sem sinais visíveis de infecção em modelos hospedeiro-parasita semelhantes (*D. magna* × *P. ramosa* e *D. longicephala* × *M. bicuspidata*, respetivamente). Este tipo de danos no hospedeiro podem resultar em custos como a energia despendida para combater o parasita ou como a partilha de recursos com os parasitas (Graham et al., 2011; Little & Killick, 2007). Isto leva-nos a concluir que, apesar da presença de esporos na cavidade corporal ser um fator facilitador do diagnóstico da doença, a sua ausência não é sinónimo de um bom estado de saúde dos hospedeiros (*Daphnia*).

A confirmação da infecção de *D. galeata* × *longispina* por *M. bicuspidata* requer o aparecimento de esporos nas suas cavidades corporais, o que é uma limitação ao diagnosticar a infecção, e dá origem a um certo grau de incerteza em estudos como este. Como pudemos verificar no caso da mortalidade, o parasita estava presente no corpo do hospedeiro e causou dano, mas não foi possível diagnosticar a sua presença com absoluta certeza, pois não foi observada a esporulação. Até ao momento, não há ferramentas que nos ajudem a detetar *M. bicuspidata* em *Daphnia* spp.. No entanto, existem métodos que poderiam ser aplicados no diagnóstico de dano causado pelo parasita antes da esporulação ocorrer. Por exemplo, a utilização de biomarcadores de stress oxidativo (Azevedo et al., 2007; Marcogliese & Pietrock, 2011; Pradhan et al., 2015) tem sido aplicada em diversos estudos, por exemplo, Marcogliese et al. (2005) verificaram que a peroxidação lipídica no fígado de *Perca flavescens* foi afetada pela infecção pelo parasita *Raphidascaris acus* em locais poluídos. Uma outra possibilidade seria a de detetar a presença do parasita se este conseguir alterar a produção de proteínas ou a estrutura e diferenciação de organelos celulares no hospedeiro. Por exemplo, Baudrimont e Montaudouin (2007) verificaram que a infecção por *Labratrema minimus* em *Cerastoderma edule* modifica a síntese de metalotioneína, ao passo que Minguez et al. (2009) denotaram uma diferenciação sexual e morfológica no que toca à produção de lisossomas em *Dreissena polymorpha* quando

exposta a alguns parasitas.

Uma outra abordagem possível para um diagnóstico efetivo e precoce da infecção é a utilização de sondas genéticas que respondam à presença de *M. bicuspidata*. As sondas genéticas são pequenos fragmentos de ADN marcados com uma molécula repórter usadas para detetar sequências complementares de ADN em amostras teste (McCartney et al., 2003). Este tipo de sondas é utilizado em métodos moleculares de deteção de agentes patogénicos, como por exemplo, o PCR, o *real-time* PCR e a hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) (Arvanitis et al., 2014; Lightner & Redman, 1998; McCartney et al., 2003) A FISH é uma técnica que utiliza sondas genéticas fluorescentes para identificar áreas-alvo nos genomas de agentes patogénicos que podem ser detetadas por microscopia de fluorescência (Arvanitis et al., 2014). Este tipo de métodos tem sido aplicado em organismos como crustáceos (Lightner & Redman, 1998), plantas (McCartney et al., 2003) e em humanos (Rolle et al., 2016) e poderia ser utilizado no modelo *Daphnia* - *M. bicuspidata*, permitindo discriminar as dáfnias infetadas. Estas propostas aqui discutidas poderão abrir novos caminhos para outras investigações e podem servir de ponto de partida para a obtenção de ferramentas aplicáveis ao modelo *Daphnia* spp. × *M. bicuspidata* com o objetivo de providenciar um diagnóstico da infecção na ausência de esporos na cavidade corporal do hospedeiro ou num momento mais precoce do desenvolvimento da doença.

O cenário de exposição interativo (fungicida × parasita) usado nas experiências é relevante num contexto ambiental de múltiplos agentes de stress. As populações de *Daphnia* estão sujeitas a vários tipos de pressões bióticas ao longo do ano, nomeadamente a predação e o parasitismo. Como servem de alimento para pequenos peixes, estes microcrustáceos são fortemente predados pelos peixes juvenis após a desova (Primavera e Verão). À medida que os peixes vão crescendo, começam a alimentar-se de organismos de maior porte, pelo que a pressão exercida pela predação em *Daphnia* diminui. Esta diminuição da zooplanktonia é também promovida pela diminuição de temperatura no final do Verão. Assim, é no Outono que o parasitismo começa a ter uma influência maior nas populações de *Daphnia* (Cáceres et al., 2006). Até então, a predação não deixava que os parasitas se desenvolvessem uma vez que a pressão dos predadores sobre os hospedeiros se sobrepunha do ponto de vista ecológico, e reduzia as populações de hospedeiro a poucos efetivos. Ora, é também no Outono que a libertação de fungicidas (como o tebuconazole) para o meio aquático é mais intensa. A aplicação deste tipo de fungicidas, na maioria das vezes, é preventiva (McGrath, 2004), isto é, é feita antes que se proporcionem as condições ideais para os fungos se desenvolverem. Isto faz com que a

aplicação destes compostos seja feita antes das primeiras chuvas, ou seja, no final do Verão e início do Outono. Existe, claramente, uma sobreposição de fatores bióticos (parasitismo) e abióticos (poluição por fungicida) que demonstram que o presente trabalho tem uma elevada relevância ecológica do ponto de vista da compreensão de como as pressões antropogênicas influenciam a dispersão de doenças no modelo hospedeiro-parasita em estudo.

Adicionalmente, o desenho experimental empregue assumiu um cenário de exposição constante ao tebuconazole (a partir do momento em que este entra nos sistemas aquáticos), face às características deste fungicida. Agroquímicos como o tebuconazole chegam aos ecossistemas aquáticos por escorrências superficiais associadas à precipitação (Berenzen et al., 2005; Bereswill et al., 2012; Reinert, Giddings, & Judd, 2002). A mobilidade elevada deste fungicida nos solos ($K_{oc} = 1000$; Kegley et al., 2014) facilita o seu transporte para o sistema aquático. Uma vez no sistema aquático, o tebuconazole tende a manter-se em concentrações constantes (Kahle et al., 2008) já que é um composto resistente à hidrólise e biodegradação (tempo de meia-vida de 28 a 43 dias; Kegley et al., 2014; Lewis et al., 2016), e a sua degradação é compensada com entradas regulares vindas dos solos pela aplicação na agricultura. Estas entradas regulares podem coincidir com diferentes fases do ciclo de vida quer do hospedeiro, quer do parasita, sendo que o tebuconazole pode entrar em contacto com o modelo em fases distintas da infeção. Por isso, é importante o uso de cenários de exposição realistas quando se estudam efeitos de contaminantes e isso foi tido em conta quando o desenho experimental foi definido.

A utilização massiva dos fungicidas nas atividades humanas faz com que eles exerçam pressão sobre agentes patogénicos, parasitas fúngicos e fungos não-alvo que, conjugada com agentes de stress bióticos, podem ter inúmeras consequências ecológicas. Por isso, estudos como o presente trazem informação importante no que toca à avaliação do impacto ambiental dos antifúngicos e devem ser tidos em conta pelas entidades reguladoras e legisladoras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Introduction to Pathogens. In: Molecular Biology of the Cell* (4th editio). Garland Science.
- Ankley, G. T. (2005). Effects of Two Fungicides with Multiple Modes of Action on Reproductive Endocrine Function in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, *86*(2), 300–308.
- Antunes, S. C., Castro, B. B., & Gonçalves, F. (2004). Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Environmental Pollution*, *127*(3), 367–375.
- Artigas, J., Majerholc, J., Foulquier, A., Margoum, C., Volat, B., Neyra, M., & Pesce, S. (2012). Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquatic Toxicology*, *122–123*, 197–205.
- Arvanitis, M., Anagnostou, T., Fuchs, B. B., Caliendo, A. M., & Mylonakis, E. (2014). Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 490–526.
- Asplund, J., & Wardle, D. A. (2016). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, *92*(3), 1720–1738.
- ASTM. (1980). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians 1, 729–80.
- Azevedo, M. M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rodrigues, F., & Cássio, F. (2007). Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Science of the Total Environment*, *377*(2–3), 233–243.
- Baer, K. N., & Goulden, C. E. (1998). Evaluation of a High-Hardness COMBO Medium and Frozen Algae for *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *39*(3), 201–206.
- Barth, J., Grathwohl, P., Fowler, H., Bellin, A., Gerzabek, M., Lair, G., ... Smidt, H. (2009). Mobility, Turnover and Storage of Pollutants in Soils, Sediments and Waters: Achievements and Results of the EU Project AquaTerra – A Review. *Sustainable Agriculture*.
- Baudrimont, M., & de Montaudouin, X. (2007). Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). *Parasitology*, *134*(2), 237.
- Bayer. (2009). Bayer CropScience Portugal.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., & Liess, M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in

- small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*, 58(5), 683–691.
- Bereswill, R., Golla, B., Strelake, M., & Schulz, R. (2012). Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 146(1), 81–92.
- Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J. C., López-Periago, E., Soto-González, B., & Simal-Gándara, J. (2007). Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Research*, 41(19), 4515–4525.
- Blanar, C. A., Maclatchy, D. L., Kieffer, J. D., Munkittrick, K. R., & Blanar, C. A. (2010). Exposure to a Mixture of Zinc and Copper Decreases Survival and Fecundity of *Discocotyle sagittata* (Leuckart) Parasitizing Juvenile Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84, 692–697.
- Boxall, A. B. A. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO Reports*, 5(12), 1110–1116.
- Bundschuh, M., Zubrod, J. P., Kosol, S., Maltby, L., Stang, C., Duyster, L., & Schulz, R. (2011). Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquatic Toxicology*, 104(1–2), 32–37.
- Buser, C. C., Spaak, P., & Wolinska, J. (2012). Disease and pollution alter *Daphnia* taxonomic and clonal structure in experimental assemblages. *Freshwater Biology*, 57(9), 1865–1874.
- Cáceres, C. E., Tessier, A. J., Duffy, M. A., & Hall, S. R. (2014). Disease in freshwater zooplankton: what have we learned and where are we going? *Journal of Plankton Research*, 36(2), 326–333.
- Cáceres, C., Hall, S., Duffy, M., Tessier, A., Helmle, C., & MacIntyre, S. (2006). Physical structure of lakes constrain epidemics in *Daphnia* populations. *Ecology*, 87(6), 1438–1444.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Emmett Duffy, J., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114), 989–992.
- Carius, H. J., Little, T. J., & Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6), 1136.
- Castro, B. B., Consciência, S., & Gonçalves, F. (2007). Life history responses of *Daphnia longispina* to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) and pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) kairomones. *Hydrobiologia*, 594(1), 165–174.
- Civitello, D. J., Forys, P., Johnson, A. P., & Hall, S. R. (2012). Chronic contamination decreases

- disease spread: a *Daphnia*-fungus-copper case study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1741), 3146–3153.
- Comissão Europeia. (2009). Regulamento (CE) N° 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 309110108(68), 44–48.
- Coors, A., & De Meester, L. (2008). Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *Journal of Applied Ecology*, 45(6), 1820–1828.
- Coors, A., Decaestecker, E., Jansen, M., & De Meester, L. (2008). Pesticide exposure strongly enhances parasite virulence in an invertebrate host model. *Oikos*, 117(12), 1840–1846.
- Cuco, A. P. (2016). Host-parasite interactions in environmental stress scenarios. *University of Aveiro*.
- Cuco, A. P., Abrantes, N., Gonçalves, F., Wolinska, J., & Castro, B. B. (2016). Toxicity of two fungicides in *Daphnia*: is it always temperature-dependent? *Ecotoxicology*, 25(7), 1376–1389.
- Cuco, A. P., Abrantes, N., Gonçalves, F., Wolinska, J., & Castro, B. B. (2017a). Interplay between fungicides and parasites: Tebuconazole, but not copper, suppresses infection in a *Daphnia-Metschnikowia* experimental model. *Plos One*, 12(2), e0172589.
- Cuco, A. P., Santos, J. I., Abrantes, N., Gonçalves, F., Wolinska, J., & Castro, B. B. (2017b). Concentration and timing of application reveal strong fungistatic effect of tebuconazole in a *Daphnia*-microparasitic yeast model. *Aquatic Toxicology*, 193(October), 144–151.
- Cuco, A. P., Castro, B. B., Gonçalves, F., Wolinska, J., & Abrantes, N. (2017c). Temperature modulates the interaction between fungicide pollution and disease: evidence from a *Daphnia*-microparasitic yeast model. *Parasitology*, 1–9.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, 341(6147), 746–751.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 362(9390), 1142–1151.
- DGAV. (n.d.). Inseticidas e Fungicidas - Culturas.
- Dijksterhuis, J., van Doorn, T., Samson, R., & Postma, J. (2011). Effects of Seven Fungicides on Non-Target Aquatic Fungi. *Water, Air, & Soil Pollution*, 222(1–4), 421–425.
- Dimitrov, M. R., Kosol, S., Smidt, H., Buijse, L., Van den Brink, P. J., Van Wijngaarden, R. P. A., ... Maltby, L. (2014). Assessing effects of the fungicide tebuconazole to heterotrophic microbes in aquatic microcosms. *Science of The Total Environment*, 490, 1002–1011.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., L'v'que, C., ...

- Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, *81*(2), 163.
- Duffy, M. A., & Sivars-Becker, L. (2007). Rapid evolution and ecological host-parasite dynamics. *Ecology Letters*, *10*(1), 44–53.
- Ebert, D. (1994). Virulence and local adaptation of a horizontal transmitted parasite. *Science*, *265*(5175), 1084–1086. Retrieved from
- Ebert, D. (2005). Introduction to *Daphnia* Biology. Retrieved from
- Ebert, D. (2008). Host–parasite coevolution: Insights from the *Daphnia*–parasite model system. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(3), 290–301.
- Ebert, D., Zschokke-Rohringer, C. D., & Carius, H. J. (2000). Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia*, *122*(2), 200–209.
- Engelbrecht, W., Hesse, O., Wolinska, J., & Laforsch, C. (2012). Two threats at once: encounters with predator cues alter host life-history and morphological responses to parasite spores. *Hydrobiologia*, *715*(1), 93–100.
- Esch, G. W., Hazen, T. C., Dimock, R. V., & Gibbons, J. W. (1976). Thermal Effluent and the Epizootiology of the Ciliate *Epistylis* and the Bacterium *Aeromonas* in Association with Centrarchid Fish. *Transactions of the American Microscopical Society*, *95*(4), 687.
- EUROSTAT. (2016). *Agriculture, forestry and fishery statistics - 2016 edition* (EUROSTAT S). Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Evans, N. A. (1982). Effects of copper and zinc on the life cycle of *Notocotylus attenuatus* (Digenea: Notocotylidae). *International Journal for Parasitology*, *12*(4), 363–369.
- Fischer, B. B., Pomati, F., & Eggen, R. I. L. (2013). The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological complexity. *Science of The Total Environment*, *449*, 253–259.
- Flores, L., Banjac, Z., Farré, M., Larrañaga, A., Mas-Martí, E., Muñoz, I., ... Elosegi, A. (2014). Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. *Science of The Total Environment*, *476–477*, 532–541.
- Folt, C., Chen, C., Moore, M., & Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.*, *44*(3, part 2), 864–877. 3
- Francl, L. J. (2001). The..Disease Triangle: A Plant Pathological Paradigm Revisited. *The Plant Health Instructor*.
- Geographic, N. (n.d.). Freshwater Crisis.

- Gilbert, D. N., Guidos, R. J., Boucher, H. W., Talbot, G. H., Edwards Jr, J. E., Scheld, M., ... Barlett, J. G. (2010). The 10 × '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(8), 1081–1083.
- Gomez, M., Martinez, I., Mayo, I., Morales, J. M., Santana, A., & Packard, T. T. (2012). Testing zooplankton secondary production models against *Daphnia magna* growth. *ICES Journal of Marine Science*, *69*(3), 421–428.
- Gonçalves, A. M. M., Castro, B. B., Pardal, M. A., & Gonçalves, F. (2007). Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, *43*(1), 13–20.
- Graham, A. L., Shuker, D. M., Pollitt, L. C., Auld, S. K. J. R., Wilson, A. J., & Little, T. J. (2011). Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Functional Ecology*, *25*(1), 5–17.
- Grintzalis, K., Dai, W., Panagiotidis, K., Belavgeni, A., & Viant, M. R. (2017). Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *139*, 352–357.
- Hall, S. R., Becker, C. R., Duffy, M. A., & Cáceres, C. E. (2011). Epidemic size determines population-level effects of fungal parasites on *Daphnia* hosts. *Oecologia*, *166*(3), 833–842.
- Hall, S. R., Simonis, J. L., Nisbet, R. M., Tessier, A. J., & Cáceres, C. E. (2009). Resource Ecology of Virulence in a Planktonic Host-Parasite System: An Explanation Using Dynamic Energy Budgets. *The American Naturalist August*, *174*(2).
- Hall, S. R., Sivers-Becker, L., Becker, C., Duffy, M. A., Tessier, A. J., & Cáceres, C. E. (2007). Eating yourself sick: transmission of disease as a function of foraging ecology. *Ecology Letters*, *10*(3), 207–218.
- Hall, S. R., Tessier, A. J., Duffy, M. A., Huebner, M., & Cáceres, C. E. (2006). Warmer does not have to mean sicker: temperature and predators can jointly drive timing of epidemics. *Ecology*, *87*(7), 1684–1695.
- Hanazato, T., & Dodson, S. I. (1995). Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography*, *40*(4), 700–709.
- Handy, R. D. (1994). Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *107*(2), 171–184.

- Hanlon, S. M., Kerby, J. L., Parris, M. J., & Fisher, M. C. (2012). Unlikely Remedy: Fungicide Clears Infection from Pathogenic Fungus in Larval Southern Leopard Frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, *7*(8).
- Hanlon, S. M., Lynch, K. J., Kerby, J. L., & Parris, M. J. (2015). The effects of a fungicide and chytrid fungus on anuran larvae in aquatic mesocosms. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(17), 12929–12940.
- Hesse, O., Engelbrecht, W., Laforsch, C., & Wolinska, J. (2012). Fighting parasites and predators: How to deal with multiple threats? *BMC Ecology*, *12*(1), 12.
- Hieber, M., & Gessner, M. O. (2002). Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology*, *83*(4), 1026–1038.
- Hof, H. (2001). Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(11), 2987–2990.
- INE. (2015). *Estatísticas agrícolas 2015. Ine*.
- Johnson, P., & Carpenter, S. (2007). Influence of Eutrophication on Disease in Aquatic Ecosystems: Patterns, Processes, and Predictions. In R. Ostfeld, F. Keesing, & V. Eviner (Eds.), *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease* (pp. 71–99). Princeton: Princeton University Press.
- Johnson, P. T. J., Chase, J. M., Dosch, K. L., Hartson, R. B., Gross, J. A., Larson, D. J., ... Carpenter, S. R. (2007). Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(40), 15781–15786.
- Junges, C. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Cabagna Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish–tadpole interaction. *Chemosphere*, *87*(11), 1348–1354.
- Kahle, M., Buerge, I. J., Hauser, A., Müller, M. D., & Poiger, T. (2008). Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, *42*(19), 7193–7200.
- Keating, K. I., & Dagbunan, B. C. (1984). Effect of selenium deficiency on cuticle integrity in the Cladocera (Crustacea) (limnology/trace element nutrition/zooplankton nutrition/zooplankton culture). *Ecology*, *81*, 3433–3437.
- Kegley, S., Hill, B., Orme, S., & Choi, A. (2014). PAN Pesticides Database - pesticide action network, North America (Oakland, CA).
- Khan, R. A. (1987). Crude Oil and Parasites of Fish. *Parasitology Today*, *3*(4), 99–100.

- Khan, R. A. (1990). Parasitism in Marine Fish after Chronic Exposure to Petroleum Hydrocarbons in the Laboratory and to the Exxon Valdez Oil Spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, *44*, 759–763.
- Khan, R. A., & Thulin, J. (1991). Influence of Pollution on Parasites of Aquatic Animals. *Advances in Parasitology*, *30*, 201–238.
- Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Lynn, S. G., Goulden, C. E., & Herrera, L. (1998). COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, *377*(1/3), 147–159.
- Klix, M. B., Verreet, J.-A., & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection*, *26*(4), 683–690.
- Knillmann, S., Stampfli, N. C., Noskov, Y. A., Beketov, M. A., & Liess, M. (2013). Elevated temperature prolongs long-term effects of a pesticide on *Daphnia* spp. due to altered competition in zooplankton communities. *Global Change Biology*, *19*(5), 1598–1609.
- Lafferty, K. D. (1997). Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today*, *13*(7), 251–255.
- Lafferty, K. D., & Holt, R. D. (2003). How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecology Letters*, *6*(7), 654–664.
- Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (1999). How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography*, *44*(3part2), 925–931.
- Lampert, W. (2006). *Daphnia*: Model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology*.
- Leavitt, P. R., Findlay, D. L., Hall, R. I., & Smol, J. P. (1999). Algal responses to dissolved organic carbon loss and pH decline during whole-lake acidification: Evidence from paleolimnology. *Limnol. Oceanogr*, *44*(2), 757–773.
- Lehtinen, K.-J. (1989). Survival, growth and disease of three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., brood exposed to bleached kraft mill effluents (BKME) in mesocosms. *Annales Zoologici Fennici*, *26*(2), 133–143.
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *22*(4), 1050–1064.
- Lightner, D. ., & Redman, R. . (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, *164*(1–4), 201–220.

- Little, T. J., & Killick, S. C. (2007). Evidence for a cost of immunity when the crustacean *Daphnia magna* is exposed to the bacterial pathogen *Pasteuria ramosa*. *Journal of Animal Ecology*, *76*(6), 1202–1207.
- Lohr, J., Yin, M., & Wolinska, J. (2010). Prior residency does not always pay off – co-infections in *Daphnia*. *Parasitology*, *137*(10), 1493–1500.
- Loureiro, C., Castro, B. B., Pereira, J. L., & Gonçalves, F. (2011). Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology*, *20*(1), 139–148.
- Loureiro, C., Pereira, J. L., Arminda Pedrosa, M., Gonçalves, F., Castro, B. B., & Salice, C. J. (2013). Competitive Outcome of *Daphnia-Simocephalus* Experimental Microcosms: Salinity versus Priority Effects. *PLoS ONE*, *8*(8).
- Lysenko, E. S., Ratner, A. J., Nelson, A. L., & Weiser, J. N. (2005). The Role of Innate Immune Responses in the Outcome of Interspecies Competition for Colonization of Mucosal Surfaces. *PLoS Pathogens*, *1*(1), e1.
- Manavathu, E. K., Cutright, J. L., & Chandrasekar, P. H. (1998). Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *42*(11), 3018–3021.
- Marcogliese, D., Brambilla, L., Gagné, F., & Gendron, A. (2005). Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *63*, 77–84.
- Marcogliese, D. J. (2004). Parasites: Small Players with Crucial Roles in the Ecological Theater. *EcoHealth*, *1*, 151–164.
- Marcogliese, D. J., & Cone, D. K. (1996). On the Distribution and Abundance of Eel Parasites in Nova Scotia: Influence of pH. *The Journal of Parasitology*, *82*(3), 389.
- Marcogliese, D. J., & Pietrock, M. (2011). Combined effects of parasites and contaminants on animal health: Parasites do matter. *Trends in Parasitology*, *27*(3), 123–130.
- May, R. M., & Anderson, R. M. (1979). Population biology of infectious diseases: Part II. *Nature*, *280*(9), 455–461.
- McCarter, J. P. (2004). Genomic filtering: an approach to discovering novel antiparasitics. *Trends in Parasitology*, *20*(10), 462–468.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, *59*(2), 129–142.
- Mcdowell, J. E., Lancaster, B. A., Leavitt, D. F., Rantamaki, P., & Ripley, B. (1999). The effects of

- lipophilic organic contaminants on reproductive physiology and disease processes in marine bivalve molluscs. *Limnol. Oceanogr.*, *44*(2), 903–909.
- McGrath, M. T. (2004). What are Fungicides? *The Plant Health Instructor*.
- McKenzie, V. J., & Townsend, A. R. (2007). Parasitic and Infectious Disease Responses to Changing Global Nutrient Cycles. *EcoHealth*, *4*(4), 384–396.
- McMahon, T. A., Halstead, N. T., Johnson, S., Raffel, T. R., Romansic, J. M., Crumrine, P. W., & Rohr, J. R. (2012). Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecology Letters*, *15*(7), 714–722.
- Metschnikoff, E. (1884). Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. *Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medicin*, *96*(2), 177–195.
- Miner, B. E., De Meester, L., Pfrender, M. E., Lampert, W., & Hairston, N. G. (2012). Linking genes to communities and ecosystems: *Daphnia* as an ecogenomic model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1735), 1873–1882.
- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D. P., & Giambérini, L. (2009). Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research*, *109*(7), 843–850.
- Mitchell, S. E., & Read, A. F. (2005). Poor maternal environment enhances offspring disease resistance in an invertebrate. *Proceedings of The Royal Society B*, *272*, 2601–2607.
- Mitchell, S. E., Read, A. F., & Little, T. J. (2004). The effect of a pathogen epidemic on the genetic structure and reproductive strategy of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecology Letters*, *7*(9), 848–858.
- Mitchell, S. E., Rogers, E. S., Little, T. J., & Read, A. F. (2005). Host-parasite and genotype-by-environment interactions: temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. *Evolution*, *59*(1), 70.
- Mix, M. C. (1986). Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: A critical literature review. *Marine Environmental Research*, *20*(1–2), 1–141.
- Moe, S. J., De Schampelaere, K., Clements, W. H., Sorensen, M. T., Van den Brink, P. J., & Liess, M. (2013). Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(1), 49–61.
- Montuelle, B., Dorigo, U., B?rard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., ... Pesce, S. (2010). The

- periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardèche-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia*, *657*(1), 123–141.
- Moore, M. M., & Strom, M. S. (2003). Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, *220*(1–4), 43–57.
- Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., & Garbisu, C. (2011). Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*(10), 2176–2183.
- Naddy, R. B., Stubblefield, W. A., May, J. R., Tucker, S. A., & Hockett, J. R. (2002). The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(2), 347–52.
- Naumov, G. I. (2011). Molecular and genetic differentiation of small-spored species of the yeast genus *Metschnikowia* Kamienski. *Microbiology*, *80*(2), 135–142.
- NCBI. (n.d.). Tebuconazole | C₁₆H₂₂ClN₃O - PubChem.
- O'Connor, J. M., & Huggett, R. J. (1988). Aquatic pollution problems, North Atlantic coast, including Chesapeake Bay. *Aquatic Toxicology*, *11*(1–2), 163–190.
- Pedersen, J. A., Yeager, M. A., & Suffet, I. H. (Mel). (2006). Organophosphorus Insecticides in Agricultural and Residential Runoff: Field Observations and Implications for Total Maximum Daily Load Development. *Environmental Science & Technology*, *40*(7), 2120–2127.
- Petrusek, A., Hobaek, A., Nilssen, J. P., Skage, M., Černý, M., Brede, N., & Schwenk, K. (2008). A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta*, *37*(5), 507–519.
- Pradhan, A., Seena, S., Schlosser, D., Gerth, K., Helm, S., Dobritsch, M., ... Cássio, F. (2015). Fungi from metal-polluted streams may have high ability to cope with the oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *34*(4), 923–930.
- Price, P. (1980). *Evolutionary Biology of Parasites*.
- Price, P. W., Westoby, M., Rice, B., Atsatt, P. R., Fritz, R. S., Thompson, J. N., & Mobley, K. (1986). Parasite Mediation in Ecological Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *17*(1), 487–505.
- Rasconi, S., Jobard, M., & Sime-Ngando, T. (2011). Parasitic fungi of phytoplankton: ecological

- roles and implications for microbial food webs. *Aquatic Microbial Ecology*, *62*(2), 123–137.
- Rasmussen, J. J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Monberg, R. J., & Kronvang, B. (2012). Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Science of The Total Environment*, *416*, 148–155.
- Regoes, R. R., Hottinger, J. W., Sygnarski, L., & Ebert, D. (2003). The infection rate of *Daphnia magna* by *Pasteuria ramosa* conforms with the mass-action principle. *Epidemiology and Infection*, *131*(2), S0950268803008793.
- Reinert, K. H., Giddings, J. M., & Judd, L. (2002). Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(9), 1977–1992.
- Restif, O., & Kaltz, O. (2006). Condition-dependent virulence in a horizontally and vertically transmitted bacterial parasite. *Oikos*, *114*(1), 148–158.
- Richter, E., Wick, A., Ternes, T. A., & Coors, A. (2013). Ecotoxicity of climbazole, a fungicide contained in antidandruff shampoo. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(12), 2816–2825.
- Riggs, M. R., Lemly, A. D., & Esch, G. W. (1987). The Growth, Biomass, and Fecundity of *Bothriocephalus acheilognathi* in a North Carolina Cooling Reservoir. *The Journal of Parasitology*, *73*(5), 893.
- Rolle, A.-M., Hasenberg, M., Thornton, C. R., Solouk-Saran, D., Männ, L., Weski, J., ... Wiehr, S. (2016). ImmunoPET/MR imaging allows specific detection of *Aspergillus fumigatus* lung infection in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(8), E1026–E1033.
- Scheren, P. A. G. ., Zanting, H. ., & Lemmens, A. M. . (2000). Estimation of water pollution sources in Lake Victoria, East Africa: Application and elaboration of the rapid assessment methodology. *Journal of Environmental Management*, *58*(4), 235–248.
- Scholthof, K.-B. G. (2007). The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(2), 152–156.
- Sih, A., Bell, A. M., & Kerby, J. L. (2004). Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(6), 274–276.
- Sindermann, C. J., Lloyd, R., Vader, S. L., & Bourne, W. R. P. (1982). Implications of Oil Pollution in Production of Disease in Marine Organisms [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *297*(1087), 385–399.
- Smith, R., & Foy, B. (1974). Improved hydrogen ion buffering of media for the culture of

- freshwater algae. *British Phycological Journal*, 9, 239–245.
- Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology*, 6(2), 197–208.
- Strayer, D. L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 344–358.
- Thomas, S. R., & Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 146–151.
- USEPA. (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.
- van der Heijden, M., Klironomos, J., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., ... Sanders, I. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396, 69–72.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., ... Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555–561.
- Welsh, P. G., Lipton, J., Chapman, G. A., & Podrabsky, T. L. (2000). Relative importance of calcium and magnesium in hardness-based modification of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(6), 1624–1631.
- Wittmer, H. U., Corti, P., Saucedo, C., & Galaz, J. L. (2010). Learning to count: adapting population monitoring for Endangered huemul deer *Hippocamelus bisulcus* to meet conservation objectives. *Oryx*, 44(4), 516–522.
- Wolinska, J., & King, K. C. (2009). Environment can alter selection in host–parasite interactions. *Trends in Parasitology*, 25(5), 236–244.
- Wolinska, J., Lively, C. M., & Spaak, P. (2008). Parasites in hybridizing communities: the Red Queen again? *Trends in Parasitology*, 24(3), 121–126.
- Wood, A. J. J., Como, J. A., & Dismukes, W. E. (1994). Oral Azole Drugs as Systemic Antifungal Therapy. *New England Journal of Medicine*, 330(4), 263–272.
- Wood, A. J. J., Liu, L. X., & Weller, P. F. (1996). Antiparasitic Drugs. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1178–1184.
- Yan, N. D., & Larsson, J. I. R. (1988). Prevalence and inferred effects of microsporidia of *Holopedium gibberum* (Crustacea:Cladocera) in a Canadian Shield lake. *Journal of Plankton Research*, 10(5), 875–886.

- Yin, M., Laforsch, C., Lohr, J. N., & Wolinska, J. (2011). Predator-induced defense makes *Daphnia* more vulnerable to parasites. *Evolution*, *65*(5), 1482–1488.
- Zubrod, J. P., Baudy, P., Schulz, R., & Bundschuh, M. (2014). Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology*, *150*, 133–143.
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Feckler, A., Englert, D., & Schulz, R. (2011). Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(12), 2718–2724.
- Zubrod, J. P., Englert, D., Feckler, A., Koksharova, N., Kanschak, M., Bundschuh, R., ... Bundschuh, M. (2015). Does the Current Fungicide Risk Assessment Provide Sufficient Protection for Key Drivers in Aquatic Ecosystem Functioning? *Environmental Science & Technology*, *49*(2), 1173–1181.

6 ANEXOS

Soluções stock e quantidades necessárias para a preparação dos meios COMBO-*Daphnia* e COMBO-*algae*.

Componente	Soluções stock		Preparação	
	COMBO- <i>Daphnia</i>	COMBO- <i>algae</i>	20 L COMBO- <i>Daphnia</i>	2 L COMBO- <i>algae</i>
sol. CaCl ₂ .2H ₂ O	36.80 g/1000 mL	36.80 g/1000 mL	60 mL	2 mL
sol. MgSO ₄ .7H ₂ O	37.00 g/1000 mL	37.00 g/1000 mL	60 mL	2 mL
sol. NaHCO ₃	12.60 g/1000 mL	12.60 g/1000 mL	200 mL	2 mL
sol. KCl	7.45 g/1000 mL	-	20 mL	-
sol. K ₂ HPO ₄	-	2.177 g/250 mL	-	2 mL
sol. NaNO ₃	-	21.25 g/250 mL	-	2 mL
sol. H ₃ BO ₃	-	0.250 g/250 mL	-	2 mL
sol.-mãe SeO ₂	0.035 g/50 mL	-	43 µL	-
sol. combinada de micronutrientes	-	1.09 g/ ~ 100 mL	-	2 mL
• Na ₂ .EDTA.2H ₂ O		0.250 g/ ~ 100 mL		
• FeCl ₃ .6H ₂ O		mL		
• CuSO ₄ .5H ₂ O		0.0125 g/50 mL		
• ZnSO ₄ .7H ₂ O		0.275 g/50 mL		
• CoCl ₂ .6H ₂ O		0.125 g/50 mL		
• MnCl ₂ .4H ₂ O		2.25 g/50 mL		
• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0.075 g/50 mL		
sol. combinada de vitaminas				
• Cianocobalamina (B12)	0.0028 g/25 mL	0.0028 g/25 mL	1 mL(*)	1 mL(*)
• Biotina (H)	0.0025 g/25 mL	0.0025 g/25 mL		
• Tiamina-HCl (B1)	0.5000 g/25 mL	0.5000 g/25 mL		
aditivo orgânico (extrato da alga <i>Ascophyllum nodosum</i>)	0.33 g/100 mL e normalizada através do acerto da densidade	-	É adicionado diretamente aos frascos de cultura, numa	-

ótica a 400 nm

proporção de

4 mL/L

TES

-

-

-

0.24 g

NOTA: Para preparar a solução combinada de micronutrientes é necessário dissolver o EDTA em ~100 mL de dH₂O (subir o pH até 7-8 ajuda na dissolução), juntar a solução de FeCl₃ ao EDTA já dissolvido evitando a exposição à luz e, por fim, juntar 1 mL das restantes soluções.

(*) – A solução combinada de vitaminas utilizada nos dois meios é igual só que mais diluída no caso do meio COMBO-*algae* uma vez que se preparam 2 L deste meio e 20 L do meio COMBO-*Daphnia*. Ambas as soluções são, portanto, congeladas em alíquotas de 1 mL. .