Escola Superior Agrária
Politécnico de Coimbra

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA

MESTRADO EM GESTÃO AMBIENTAL

Ecotoxicidade de um fungicida cúprico em fungos aquáticos não-alvo face às alterações climáticas: efeitos em diferentes cenários de salinização

Andreia Sofia da Costa Oliveira

Coorientadores:

Professora Doutora Manuela Abelho

Investigadora Doutora Matilde Santos

Relatório de estágio profissionalizante apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Gestão Ambiental

Coimbra, 2022

Agradecimentos

Neste documento, deixo o mais sincero dos agradecimentos às minhas orientadoras, a Professora Doutora Manuela Abelho e a Investigadora Doutora Matilde Santos, por terem estado ao meu lado e me terem apoiado durante todo o caminho de forma incansável. Espero que a vida sempre vos sorria e um dia ter a honra de poder colaborar convosco de novo noutros projetos. As palavras não são suficientes para descrever o que fizeram por mim, nem a minha gratidão.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, à minha mãe Maria Odete, e ao meu pai Francisco Helder que me deram vida e sonhos, e me ajudaram a torná-los realidade. Eu amo-vos com todo o meu coração.

Aos meus avós paternos e maternos e à minha madrinha Maria José, quero que permaneçam na minha vida por muitos anos e sou muito feliz por serem parte da minha família.

Aos amigos, que sempre me acompanharam em cada aventura ao longo de toda a jornada. Um especial agradecimento, aos meus parceiros do “crime” Beatriz Luís, Francisco Tiago, Inês Rodrigues e Mirian Assis, à minha “madrinha” da faculdade, Ana Sofia que me adotou, e aos meus “irmãos adotivos” que sempre me protegeram, Pedro Gomes e Miguel Sousa. Graças a vocês eu pude sentir o que era o espírito académico de Coimbra. Eu já sinto saudades.

Aos meus professores da Licenciatura em Biologia na Universidade de Coimbra e do Mestrado em Gestão Ambiental no Instituto Politécnico de Coimbra agradeço todas as coisas que me ensinaram. Espero que os vossos alunos sejam sempre um motivo de orgulho.

Aos assistentes de laboratório, Dona Rosa, Dona Helena, Senhor Fernando e a Senhora Fernanda. Obrigada por me acompanharem durante este último ano e por me ensinarem tanta coisa. Guardarei as lembranças com carinho.

A todos os meus entes queridos, amigos e professores desejo o melhor que o mundo tem para oferecer. Muitas felicidades.

Resumo

A aplicação de fungicidas conjuntamente com o aumento da salinização das águas pode acarretar sérias consequências para diversos organismos, principalmente para aqueles que ainda se encontram pouco estudados. Deste modo, o presente trabalho teve como finalidade determinar os efeitos do fungicida calda bordalesa em organismos não-alvo, os hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens*, estudar o efeito da salinidade como possível potenciador do efeito do fungicida e contribuir para o desenvolvimento de um ensaio padronizado com os fungos aquáticos.

Foram realizados dois ensaios, um ensaio preliminar com uma duração de 15 dias no qual foram testadas quatro concentrações de fungicida e cujos resultados permitiram estabelecer a janela de concentrações adequada para os ensaios definitivos. Os ensaios definitivos, com um tempo de exposição de 14 dias, testaram o efeito simultâneo de sete concentrações de fungicida e seis níveis de salinidade. Durante ambos os ensaios, foi medido o diâmetro dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens*, a taxa de crescimento radial e os valores de EC20 e EC50. Concluiu-se que *Heliscus lugdunensis* na ausência de salinidade foi estimulado nas concentrações intermédias de fungicida, contrariamente, *Tricladium splendens* foi inibido quando exposto a todas as concentrações de fungicida. De modo geral é possível afirmar que a salinidade potenciou o efeito do fungicida.

Finalmente, é aconselhável a realização de mais estudos com este grupo de organismos, visto que nem todos os fungos aquáticos irão reagir da mesma forma aos fatores aos quais são expostos. Em estudos idênticos, com os mesmos tipos de organismos, aconselha-se uma duração de cerca de 8 dias, visto que se espera uma perda de sensibilidade com o passar do tempo.

Palavras-chave: Hifomicetos aquáticos; Salinização primária; Fungicidas; Taxas de crescimento; Concentrações eficazes de inibição (EC)

Abstract

The application of fungicides together with the increase in water salinization can have serious consequences for several organisms, especially for those that are still poorly studied. Thus, the present work aimed to determine the effects of the Bordeaux mixture fungicide on non-target organisms, the aquatic hyphomycetes *Heliscus lugdunensis* and *Tricladium splendens*, to study the effect of salinity as a possible enhancer of the fungicide effect and to contribute to the development of a standardized assay with aquatic fungi.

Two tests were carried out, a preliminary test with a duration of 15 days in which four concentrations of fungicide were tested and whose results allowed establishing the appropriate concentration window for the definitive tests. The definitive, with an exposure time of 14 days, tested the simultaneous effect of seven fungicide concentrations and six salinity levels. During both tests, the diameter of the aquatic hyphomycetes *Heliscus lugdunensis* and *Tricladium splendens* was measured, and the radial growth rate and the EC20 and EC50 values were calculated. It was concluded that *Heliscus lugdunensis* in the absence of salinity was stimulated at intermediate concentrations of fungicide, in contrast, *Tricladium splendens* was inhibited when exposed to all concentrations of fungicide. In general, it is possible to affirm that salinity potentiated the effect of the fungicide.

Finally, it is advisable to carry out further studies with this group of organisms, since not all aquatic fungi will react in the same way to the factors to which they are exposed. In identical studies, with the same types of organisms, an exposure duration of about 8 days is advised, as a loss of sensitivity is expected over time.

Keywords: Aquatic hyphomycetes; Primary salinization; Fungicides; Growth rates; Effective Inhibition Concentrations (EC)

Conteúdo

Resumo ii

Abstract iii

1 Introdução 1

2 Materiais e métodos 5

2.1 Fungicida 5

2.2 Organismos teste 6

2.3 Ensaios de ecotoxicidade 7

2.3.1 Procedimentos gerais 7

2.3.2 Ensaio preliminar 8

2.3.3 Ensaios definitivos 9

2.4 Análise de dados 11

2.4.1 Comparação das amostras controlo-zero 11

2.4.2 Concentrações eficazes de inibição 11

3 Resultados 12

3.1 Ensaio preliminar 12

3.1.1 Crescimento 12

3.1.2 Concentrações eficazes de inibição 14

3.2 Ensaios definitivos 16

3.2.1 Comparação dos controlos-zero em cada salinidade 16

3.2.2 Crescimento 17

3.2.3 Concentrações eficazes de inibição 20

4 Discussão 24

5 Conclusão 26

6 Referências bibliográficas 27

7 Apêndices 31

1 Introdução

O desenvolvimento das atividades antropogénicas é provocado pelas necessidades socioeconómicas das populações e ocorre em paralelo aos avanços tecnológicos. Como exemplo, para dar resposta à crise económica e de recursos alimentares, a atividade agrícola foi obrigada a desenvolver-se, sendo atualmente praticada em grande escala de modo intensivo, com recurso à utilização de máquinas e produtos químicos, geralmente designados por pesticidas (Balbino et al., 2011; Ittner et al., 2018).

De entre os vários grupos de pesticidas, os fungicidas são um grupo muito utilizado na agricultura, desenvolvidos especificamente para terem a capacidade de controlar a proliferação dos fungos terrestres (Marinho et al., 2020) de modo a reduzir as perdas de produtividade das culturas devido às doenças que causam (Strange & Scott, 2005; Pimentão et al., 2020). Os fungicidas podem ser divididos de acordo com o seu modo de ação. No grupo dos fungicidas não biológicos existem aqueles que pertencem ao grupo químico dos triazóis e imidazóis e que inibem o normal mecanismo de biossíntese de ergosterol, presente na composição da membrana plasmática dos fungos (Stenersen, 2004; Dijksterhuis et al., 2011). Outros contêm metais que podem atuar através de reações de oxidação-redução que catalisam espécies reativas de oxigénio (ROS), como é o caso do cobre (Braha et al., 2007), ou pela indução de uma menor produção de antioxidantes, como é o caso do zinco (Krauss et al., 2011). Em ambos os casos, seja pelo aumento da concentração de ROS, que em termos práticos significa um aumento de radicais livres, seja por uma diminuição da concentração de antioxidantes que representam as defesas contra esses radicais, o desequilíbrio gerado leva a um aumento do stress oxidativo, que por sua vez causará danos nas estruturas celulares dos fungos (Braha et al., 2007; Krauss et al., 2011). Apesar da eficácia dos pesticidas em combater as pragas para as quais foram desenvolvidos, o seu uso pode estar associado a severos problemas ambientais, uma vez que a grande maioria apresenta toxicidade para organismos não-alvo (Dijksterhuis et al., 2011; Flores et al., 2014).

O reconhecimento da ecotoxicologia como área científica e a necessidade de avaliar os efeitos de potenciais contaminantes nos organismos vivos levou a uma maior regulamentação por parte da União Europeia, sendo exemplos bem conhecidos a regulamentação relativa à comercialização dos pesticidas, Regulamento (CE) Nº 1107/2009 (Comissão Europeia, 2009), e também de forma ainda mais detalhada, a regulamentação relativa à determinação de concentrações limites dos produtos a

comercializar (potenciais contaminantes) nos alimentos aquando da sua venda, Regulamento (CE) Nº 396/2005 (Comissão Europeia, 2005).

A ecotoxicologia estuda os efeitos (físicos e químicos) de substâncias naturais e/ou sintéticas nos organismos, bem como a forma como estes agentes são transportados e interagem tanto entre si como com o meio ambiente (Zagatto & Bertoletti, 2008). Para isso podem ser realizados ensaios de toxicidade em células, in vitro, ou em organismos modelo (microalgas, cladóceros, insetos, minhocas, anfíbios, peixes, etc.) (Zubrod et al., 2019), in vivo, em diferentes parâmetros como atividades enzimáticas, crescimento, reprodução, e letalidade, os chamados "endpoints", que permitem determinar os efeitos agudos e os efeitos crónicos e estabelecer modelos que expressam curvas de sensibilidade, i.e., relação causa-efeito entre a concentração do contaminante e a intensidade do efeito biológico medido (Van Straalen, 1993; Crane et al., 2007; Carvalho & Pivoto, 2011; EFSA, 2013). Os ensaios ecotoxicológicos têm vindo a ser otimizados com o tempo e com o avanço tecnológico, e possuem tanto vantagens como desvantagens, sendo as vantagens, um maior número de ensaios in vitro em células, e um menor número de organismos-teste in vivo, redução no espaço necessário à realização dos ensaios, uma maior facilidade de manutenção e controlo genético das gerações, ensaios mais rápidos, mais baratos com menos descartes tóxicos e num ambiente mais controlado (Liber et al., 2007). Por outro lado, a nível das desvantagens, é necessário referir que estes ensaios muitas vezes não conseguem dar um total panorama das consequências nos ecossistemas, visto utilizarem organismos modelo através dos quais se extrapolam os resultados, sendo que para além disso, a utilização apenas dos ensaios in vitro não é suficiente, pois deste modo os efeitos sistémicos, as interações entre os tecidos e os órgãos, os efeitos crónicos, entre outros, não poderão ser avaliados.

Os ensaios ecotoxicológicos devem ser robustos e precisos de forma a realisticamente caracterizarem as consequências do uso do produto em causa, quer *per se* quer como componente de um produto formulado (Zagatto & Bertoletti, 2008), de modo a simular sempre o pior cenário possível de contaminação, e assim proteger melhor os ecossistemas (Vanclooster et al., 2000). Outra característica importante destes ensaios é a duração de tempo a que os organismos são expostos, existindo ensaios de curta e longa duração. Os ensaios de curta duração pretendem avaliar efeitos rápidos e geralmente severos, como a mortalidade, pois são essencialmente utilizados para caracterizar a toxicidade intrínseca de um contaminante para diferentes espécies de organismos, uma vez que raramente os contaminantes se encontram no ambiente a uma concentração com potencial para causar este tipo de efeitos

(Schvartsman, 1991; EFSA, 2013), enquanto os ensaios de longa duração tem como finalidade determinar os efeitos tóxicos de concentrações realistas de um contaminante durante um período importante do ciclo de vida de um organismo, tendo por isso uma maior relevância ecológica (Maltby et al., 2009; EFSA, 2013).

Em suma, os ensaios toxicológicos bem como as simulações dos processos de transporte e de persistência (e.g. coeficiente de partição, de adsorção, volatilidade, solubilidade, biodegradação) que caracterizam as substâncias são fundamentais, pois nem sempre é possível restringi-las ao seu local de emissão ou à sua espécie-alvo, podendo atuar por isso como potenciais contaminantes para os organismos não-alvo (Zubrod et al., 2019). Estes efeitos tóxicos podem traduzir-se em efeitos letais, efeitos adversos no crescimento ou reprodução (Braha et al., 2007), ou por vezes efeitos de estimulação, como crescimento e propagação (Sridhar & Bärlocher, 2011), ou efeitos extremamente severos, como a morte dos organismos (Marinho et al., 2020).

Os fungos aquáticos são organismos detentores de uma característica única, que os distingue dos demais, a habilidade de esporular dentro de água (Krauss et al., 2011). Esta, em conjunto com a capacidade de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar a parede celular em celulose, hemicelulose, pectinas e lenhina (Bärlocher & Kendrick,1974; Krauss et al., 2011), permite-lhes ocupar um nicho ecológico nos ecossistemas ribeirinhos (Shearer & Webster, 1991; Quainoo et al., 2016), onde são considerados os principais decompositores de matéria orgânica (Krauss et al., 2011; Graça et al., 2015; Pimentão et al., 2020; Seena et al., 2020). Algumas espécies de fungos aquáticos, como por exemplo *Heliscus lugdunensis*, demonstraram ter a capacidade de adsorção e mobilização de metais, fator importante para a recuperação de ecossistemas degradados (Braha et al., 2007). No entanto, e apesar destes organismos terem desenvolvido mecanismos de adaptação a locais poluídos por metais, isso não significa que não possam ser afetados por estas substâncias. No mesmo artigo os autores utilizam duas estirpes de *Heliscus lugdunensis* provenientes de locais distintos e analisam a esporulação e a atividade enzimática. As duas estirpes expostas aos metais cádmio e cobre produziram esporos morfologicamente diferentes, sendo que para além disso a atividade enzimática também foi significativamente alterada, observando-se um aumento na produção de tióis principalmente na estirpe proveniente do local mais contaminado (Braha et al., 2007). Apesar de alguns exemplos evidenciando a sensibilidade dos fungos aquáticos a contaminantes, nomeadamente a pesticidas, e das suas reconhecidas funções ecológicas, nomeadamente em ecossistemas ribeirinhos, estes fungos são de um modo geral negligenciados nas

avaliações de risco dos ecossistemas aquáticos (Dijksterhuis et al., 2011; Zubrod et al., 2019; Marinho et al., 2020).

No seu ambiente, os fungos aquáticos, assim como outros organismos, podem ser expostos tanto às substâncias provenientes das atividades humanas como às mudanças ambientais consequentes das alterações climáticas, como a salinização, alterações da temperatura, mudanças no pH, entre outros (Krauss et al., 2011; Venâncio et al., 2022). A salinização, pode ocorrer tanto de forma natural devido a fenómenos de intrusão salina em ecossistemas costeiros (salinização primária), como por influência do ser humano (salinização secundária), e caracteriza-se pela acumulação excessiva de sais minerais. A salinização primária não é totalmente dependente das alterações climáticas, mas é muito influenciada por elas, visto que, a subida da temperatura média global leva ao derretimento das calotes polares e à expansão térmica da água, resultando no aumento do nível médio das águas do mar (Venâncio et al., 2022). Como consequência da subida do nível médio da água do mar, ocorre inundação das zonas costeiras e intrusões salinas nos lençóis freáticos, causando salinização das águas doces costeiras e a perda de biodiversidade (Venâncio et al., 2020; Abelho et al., 2021). A salinização secundária, ao contrário da primária, resulta da atividade antropogénica, um exemplo típico é a acumulação de sais no solo devido à evaporação da água utilizada na irrigação de zonas áridas (Pedrotti et al., 2015). Estas alterações climáticas acrescidas ao facto de decorrerem num ritmo acelerado, não permite à maioria das espécies adaptarem-se, o que mostra a urgência da procura por mais informação de forma a serem tomadas medidas tanto de prevenção como de resolução.

Reconhecendo a importância tanto da utilização de fungicidas na agricultura, como do papel fundamental dos fungos aquáticos para os ecossistemas ribeirinhos, e em face da presente realidade das alterações climáticas, o principal objetivo deste trabalho é avaliar a ecotoxicidade em duas espécies de fungos aquáticos não-alvo de um fungicida cúprico em cenários de intrusão salina. Para atingir este objetivo foram delineados dois objetivos específicos: (1) determinar os efeitos do fungicida no crescimento dos fungos e (2) determinar se o aumento da salinidade tem influência no efeito dos fungicidas. Adicionalmente, pretende-se contribuir para o desenvolvimento de ensaios padronizados com fungos aquáticos, organismos que têm sido negligenciados no contexto da avaliação da qualidade de águas doces.

Para a realização dos objetivos propostos, escolheu-se a calda bordalesa, um fungicida composto por sulfato de cobre e cálcio que inicialmente foi aplicado nas videiras, em França, para combater o míldio (https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza; Ascenza, Setúbal, Portugal). Devido à sua eficácia, à baixa

toxicidade para as plantas contribuindo para o equilíbrio nutricional das mesmas (causado pelo cálcio e cobre presentes na composição), e à capacidade de repelir alguns insetos (Motta, 2008; Maltby et al., 2009), a sua utilização foi expandida a outras culturas como pereiras, macieiras, pessegueiros, nectarinas, tomateiro, batateira e oliveiras (https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza; Ascenza, Setúbal, Portugal). Os organismos teste selecionados para representar os fungos aquáticos foram duas espécies do grupo dos hifomicetos aquáticos, *Heliscus lugdunensis*, uma espécie já assinalada por incluir variedades com diferente tolerância ao cobre (Braha et al., 2007; Quainoo et al., 2016) e *Tricladium splendens*, uma espécie já utilizada em ensaios de ecotoxicidade e de ampla distribuição geográfica (Seena et al., 2022). Finalmente, o efeito da salinidade foi estudado simulando cenários de salinização com água do mar recolhida no porto da Figueira da Foz. Esta escolha deveu-se ao facto de se pretender simular um cenário de salinização de forma realista, utilizando a mistura de sais presente na água do mar e não apenas água com o NaCl, como a maioria dos estudos que podem ser encontrados até agora (Stockwell et al., 2015; Venâncio et al., 2020).

2 Materiais e métodos

2.1 Fungicida

O fungicida calda bordalesa, selecionado para a realização do presente trabalho, é comercializado para uso profissional na forma de pó molhável composto por 20% (p/p) de cobre sob a forma de sulfato de cobre e cálcio (https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza; Ascenza, Setúbal, Portugal). De acordo com a ficha técnica, é um fungicida que atua preventivamente, devendo ser aplicado ao aparecimento dos primeiros sintomas, podendo, de acordo com o Regulamento (CE) N.º 889/2008 (Comissão Europeia, 2008), ser utilizado no modo de produção biológica. Em função do Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (Comissão Europeia, 2008) está classificado como tendo uma toxicidade de longo prazo para os organismos aquáticos sendo a sua advertência de perigo a de H411-tóxico para os organismos aquáticos com efeito duradouro. Relativamente ao perigo da calda bordalesa para o biota da água e do solo, e de acordo com o Regulamento (UE) N.º 830/2015 (União Europeia, 2015) a **Tabela 1** apresenta a informação ecológica presente na ficha de dados de segurança (https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza; Ascenza, Setúbal, Portugal) no que se refere a resultados de ensaios ecotoxicológicos com espécies padrão.

Tabela 1 – Dados de ecotoxicidade aguda e crónica da calda bordalesa para espécies representativas de organismos terrestres e aquáticos, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 830/2015 (adaptado de ficha de dados de segurança da Ascenza; https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza).

Toxicidade aguda
Peixes CL_{50} aguda (96 h): >21,39 mg L^{-1} (Truta arco íris) Invertebrados Aquáticos CE_{50} aguda (48 h): 1,87 mg L^{-1} (*Daphnia magna*) Algas CE_{50} aguda (120 h): 0,041 mg L^{-1} (*Scenedesmus subspicatus*) Aves DL_{50} oral aguda: > 616 mg Cu kg^{-1} peso corporal (Codorniz) Abelhas DL_{50} oral: 23,3 µg $abelha^{-1}$ Abelhas DL_{50} contacto: Dados não disponíveis Plantas aquáticas CE_{50} (7 d): 0,145 mg L^{-1} (*Lemma minor*)
Toxicidade crónica
Peixes NOEC crónica (48 h): 22,5 mg L^{-1} (Peixe zebra) Invertebrados aquáticos NOEC crónica (21 d): 0,02 mg L^{-1} (*Daphnia magna*) Algas NOEC crónica: Dados não disponíveis
Persistência, degradabilidade e mobilização no solo
Muito persistente. DT50 (típico): 10000 dias. Os componentes cúpricos são dificilmente degradáveis pelos organismos do solo. A sua eliminação deve-se a efeitos físicos como o arrastamento e diluição provocados pela água da chuva ou de rega. Fortemente retido nas camadas superficiais do solo.
Potencial de bioacumulação
Baixo potencial de bioacumulação: L_{ow} = 0,44 (pH = 7, 20 ºC)

2.2 Organismos teste

Para a realização do presente estudo foram utilizadas duas espécies de fungos aquáticos que habitam ecossistemas ribeirinhos (Shearer & Webster, 1991), *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Therry (Saccardo, 1980), atualmente *Neonectria lugdunensis* (Sacc. & Therry) L. Lombard & Crous (Lombard et al., 2014) e *Tricladium splendens* Ingold (Ingold, 1942). Apesar da alteração da nomenclatura, neste trabalho manteve-se a designação *Heliscus lugdunensis*, pela qual a espécie é mais conhecida. Em experiências anteriores, ambas as espécies foram utilizadas para a realização de ensaios de ecotoxicidade. Braha et al. (2007) determinou o efeito dos metais cádmio e cobre na esporulação e na atividade enzimática de *Heliscus lugdunensis*, tendo verificado a existência de alterações na morfologia dos esporos produzidos e também na atividade enzimática. Quainoo et al., (2016) utilizou esta mesma espécie para estudar a tolerância ao cobre, a seletividade nos genótipos e as eventuais consequências nas funções ecológicas e no crescimento, tendo observado diferenças significativas nas

taxas de esporulação, taxa de decomposição e de crescimento. Flores et al. (2014) utilizou várias espécies, entre as quais *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* para investigar o efeito do fungicida Enilconazol e do inseticida Diazinon na decomposição da folhada, produção de biomassa fúngica e esporulação. Apesar de ambas as espécies já terem sito utilizadas para estudar os efeitos adversos de contaminantes, nomeadamente pesticidas, nenhum dos estudos mencionados compara diretamente as suas sensibilidades. No entanto, os estudos que testam a exposição de *Heliscus lugdunensis* ao cobre concluem que esta espécie é mais resistente comparativamente a outras espécies (Krauss et al., 2001; Sridhar et al., 2005).

Para a realização deste trabalho, ambas as espécies foram gentilmente cedidas por Seena Sahadevan, do MARE – Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade de Coimbra. As espécies foram recolhidas de um local não contaminado (40°32′01″ N; 8°09′15″ W) da Ribeira de Múceres (Jain et al., 2019). Foram estabelecidas culturas em Malt Extract Agar (MEA) (97218, Millipore, Darmstadt, Alemanha) a partir de micélio conservado em água destilada a 10 °C (Marvanová, 2020). Culturas de ambas as espécies em MEA foram mantidas em laboratório ao longo de todo o presente estudo a duas temperaturas, a 18 °C para promover o crescimento em condições ótimas e a 5 °C para conservação das espécies. A partir do micélio das culturas a 18 °C foram feitas várias repicagens por transferência de micélio da borda das colónias, de forma a obter material suficiente para os ensaios de ecotoxicidade a realizar.

2.3 Ensaios de ecotoxicidade

2.3.1 Procedimentos gerais

2.3.1.1 Preparação das soluções teste

A realização do presente estudo envolveu a preparação de dois tipos de soluções teste. Soluções teste apenas com calda bordalesa, com a concentração expressa em mg L^{-1}, quer para a realização de ensaios preliminares quer para a realização dos ensaios definitivos (no caso do controlo de ausência de salinidade), e soluções teste de calda bordalesa a diferentes salinidades expressas em mS cm^{-1}, apenas para os ensaios definitivos. As soluções de calda bordalesa a 0 mS cm^{-1} de salinidade foram preparadas utilizando água destilada e as soluções de calda bordalesa para as várias salinidades foram preparadas diretamente na água com a respetiva salinidade.

Apenas após a preparação das soluções teste para cada ensaio de toxicidade, quer apenas de calda bordalesa, quer de calda bordalesa a diferentes salinidades, foi

adicionada à solução teste o meio de cultura de fungos MEA. As soluções teste finais foram homogeneizados numa placa de aquecimento com agitador magnético e esterilizadas em autoclave (121 °C, 15 minutos), depois de retirados os magnetes. Após arrefecimento os meios ainda líquidos (temperatura > 42 °C) foram distribuídos em condições de assepsia (cerca de 15 mL), o suficiente para uma camada de cerca de 5 mm) em caixas de Petri, previamente identificadas, de 90 mm de diâmetro, tenso sido estabelecidas três réplicas por cada tratamento.

2.3.1.2 Inoculação e incubação

Todos os procedimentos seguintes foram efetuados em condições de assepsia, recorrendo a um bico de Bunsen. O inóculo consistiu num círculo de 7 mm de diâmetro, retirado da borda do micélio com um cortador de cortiça e colocado no centro de cada caixa de Petri. Na base da caixa de Petri foram desenhadas duas linhas perpendiculares entre si que se intercetavam no centro do círculo do inóculo. Os fungos foram incubados numa sala climatizada a 18 ºC, dentro de um recipiente semi-opaco e longe de fontes de luz.

2.3.1.3 Respostas biológicas

O diâmetro médio do micélio (mm) foi registado periodicamente (ver secções 2.3.2 e 2.3.3), medindo o diâmetro (mm) em cada uma das linhas desenhadas na base da caixa e apontando a média desses dois diâmetros. O diâmetro médio em cada dia de medição foi utilizado para o cálculo da taxa de crescimento radial (TCR) e da taxa de inibição, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{taxa de crescimento radial (TCR, mm dia}^{-1}) = \frac{\text{(diâmetro no dia x - diâmetro no dia 0)}}{\text{nº de dias}}$$

$$\text{taxa de inibição (\%)} = \frac{\text{(média de TCR no controlo - TCR no tratamento)}}{\text{média de TCR no controlo}} \times 100$$

2.3.2 Ensaio preliminar

Com o objetivo de otimizar metodologias e fazer uma avaliação preliminar das concentrações de fungicida com efeito tóxico nos organismos teste, foi realizado um ensaio preliminar. Ambas as espécies de fungos foram expostas a uma gama de cinco concentrações de calda bordalesa: 1000, 100, 10, 1 e 0 mg L^{-1} (controlo), correspondentes a 200, 20, 2, 0,2, 0 mg L^{-1} de cobre, respetivamente, em triplicado, para cada espécie de fungo. Foi escolhida uma gama ampla de concentrações abrangendo quatro ordens de magnitude de forma a garantir a obtenção de resultados

e a permitir selecionar uma gama de concentrações ideal (de muito tóxico a ausência de toxicidade) para os ensaios definitivos.

Para cada concentração, foram utilizados 200 mL de água destilada à qual se adicionou a quantidade de fungicida necessária para obter a concentração desejada; apenas no caso da concentração 1 mg L^{-1} foi preparado um volume de 1000 mL, dada a limitação logística para pesar uma massa tão pequena. Os meios de cultura, a inoculação e a incubação foram elaborados conforme descrito nos procedimentos gerais. O diâmetro médio do micélio (mm) foi medido após 6, 8, 13 e 15 dias de incubação.

2.3.3 Ensaios definitivos

De acordo com os resultados obtidos no ensaio preliminar, foram testadas sete concentrações de calda bordalesa: 1500, 500, 166,7, 55,6, 18,5, 6,2 e 0 mg L^{-1} (controlo), contendo 300, 100, 33,34, 11,12, 3,70, 1,24 e 0 mg L^{-1} de cobre, respetivamente (Apêndice 1). Para testar o efeito da salinidade, foi utilizada água do mar (49,1 mS cm^{-1}) recolhida no porto da Figueira da Foz durante a maré alta, filtrada (0,2 µm) e autoclavada (121 °C, 15 minutos). A água do mar foi diluída com água destilada de forma a preparar uma solução stock de 25 mS cm^{-1}, que se utilizou para as demais salinidades. Foram testadas seis salinidades: 25,0, 15,0, 9,0, 5,5, 3,3 e 0 mS cm^{-1} (controlo: água destilada). Para cada espécie de fungo, o efeito da concentração de calda bordalesa e da salinidade foi testado numa combinação fatorial, em 42 tratamentos, com três réplicas cada, num total de 126 amostras. Dada a grande quantidade de amostras, por motivos de logística, foi realizado um ensaio separadamente para cada salinidade. Para averiguar a comparabilidade dos resultados obtidos em cada ensaio, foram incluídas, em cada salinidade testada, três réplicas controlos-zero (salinidade 0 e fungicida 0) para cada espécie de fungo.

Para a preparação dos meios, preparou-se, a partir de água destilada e utilizando a água do mar, uma solução stock de salinidade 25 mS cm^{-1}, a partir da qual se fizeram as diluições necessárias para obter as restantes salinidades. A preparação da solução stock e das restantes salinidades a testar foi feita de acordo com a fórmula $v_f = (c_i \times v_i)/c_f$, onde c_i representa a salinidade inicial (da água do mar: 49,1 mS cm^{-1}, ou da salinidade da solução stock: 25 mS cm^{-1}), v_i o volume da água inicial necessário para proceder à diluição, c_f a salinidade final pretendida (e.g. 25 mS cm^{-1}) e v_f o volume final necessário da solução. De acordo com os resultados obtidos, foi adicionado ao volume v_i da concentração c_i o volume necessário de água destilada para obter o volume v_f da concentração c_f.

Para cada salinidade, foram preparadas as sete concentrações de calda bordalesa, em balões de Erlenmeyer identificados, através de diluições sucessivas. Começou-se pela concentração de 1500 mg L^{-1}, adicionando-se 450 mg de fungicida a 300 mL de água de uma dada salinidade, mantendo a solução numa placa de aquecimento com agitador magnético, de modo a homogeneizar o máximo possível a solução. As concentrações seguintes foram realizadas a partir de um determinado volume da concentração anterior ao qual se adicionou o volume necessário de água com a salinidade correspondente, mantendo os balões de Erlenmeyer da concentração-mãe em agitador para garantir a maior homogeneidade possível da solução. Antes de adicionar o meio de cultura de fungos MEA, foram medidos os valores reais de salinidade em cada um dos tratamentos. Tal como apresentado na **Tabela 2**, foi possível estabelecer um gradiente de salinidade muito próximo do esperado, com percentagens de diferença inferiores a 20%, exceto nas três concentrações mais altas de calda bordalesa na salinidade de 3,3 e na concentração mais alta a uma salinidade de 5,5 mS cm^{-1} (21 a 27% de diferença).

Os meios de cultura, a inoculação e a incubação foram elaborados conforme descrito nos procedimentos gerais. O diâmetro médio do micélio foi medido após 5, 8, 11 e 14 dias de incubação.

Tabela 2 – Valores de salinidade (mS cm^{-1}) medidos em cada uma das soluções teste antes de adicionar o meio de cultura de fungos (Malt Extract Agar) para dar início aos ensaios de toxicidade com os fungos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens.* SM = sem medição.

	Calda bordalesa (mg L^{-1})						
Salinidade	**0**	**6,2**	**18,5**	**55,6**	**166,7**	**500**	**1500**
0	SM	0,0165	0,0191	0,0459	0,1259	0,282	0,646
3,3	4,04	4,10	4,09	4,12	4,18	4,29	4,57
5,5	6,64	6,61	6,67	6,64	6,75	6,88	7,03
9,0	SM	10,2	10,6	10,4	10,5	10,5	10,9
15,0	16,7	16,8	16,7	16,8	18,42	17,1	17,7
25,0	SM	26,5	26,9	26,5	26,5	27,1	27,0

2.4 Análise de dados

2.4.1 Comparação das amostras controlo-zero

Anova de 1 fator com medidas repetidas, na qual o fator é o ensaio (um por cada salinidade), os dias de medição são a covariável de repetição e a variável dependente é o diâmetro dos fungos ao longo do tempo. Esta comparação de amostras foi realizada para confirmar não existirem diferenças significativas entre os controlos-zero, este resultado comprova a veracidade dos restantes resultados obtidos e a possibilidade de fazer comparações diretas entre resultados de tratamentos não realizados em simultâneo.

2.4.2 Concentrações eficazes de inibição

As concentrações eficazes que provocaram percentagens de inibição de 20% (EC20) e de 50% (EC50) nas respostas medidas ao longo dos vários tempos de exposição foram estimadas ajustando as respostas medidas a um modelo logístico usando o método dos mínimos quadrados (Environment Canada, 2007*)*:

EC50: $v2 = c/(1 + 1 * (v1/EC)\hat{}b)$;

EC20: $v2 = c/(1 + 0{,}25 * (v1/EC)\hat{}b)$.

onde *v2* é a variável dependente (parâmetro biológico avaliado: diâmetro do micélio ou TCR), *v1* é a variável independente (concentração de calda bordalesa), *c* é a média dos valores obtidos no controlo, *b* é uma constante entre 4 e 0, *h* é uma constante próximo de 50 e *EC* é a concentração eficaz de calda bordalesa que provoca 20% ou 50% de inibição no parâmetro biológico avaliado.

Embora o modelo logístico tenha sido aquele que apresentou sempre o melhor ajuste dos dados, procurou-se o ajuste ideal através da utilização de outros dois modelos de distribuição dos dados (Environment Canada, 2007):

Modelo exponencial

EC50: $v2 = c * Exp(((Log(1 - 0{,}5))/EC) * v1) + b$;

EC20: $v2 = c * Exp\left(\left(\frac{Log(1-0{,}2)}{EC}\right) * v1\right) + b$.

Modelo logístico-hormético

EC50: $v2 = (c + v1 * h)/(1 + 1 * (v1/EC)\hat{}b)$;

EC20: $v2 = (c + v1 * h)/(1 + 0{,}25 * (v1/EC)\hat{}b)$.

As regressões não lineares foram calculadas utilizando o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft), seguindo os comandos *Statistics* > *Advanced Linear/ Nonlinear models* > *Nonlinear estimation* > *User-specified regression least squares*, com o valor de significância p=0,05. Em todos os casos começou-se pelo modelo logístico, por ser aquele que, de um modo geral, explica a distribuição deste tipo de dados biológicos. No caso de a distribuição dos dados não ser significativa ou de os limites de confiança (LC) a 95% terem um intervalo bastante amplo, tentou-se então um dos outros modelos para explorar a possibilidade que explicasse melhor os dados. Para a determinação dos valores de EC no programa STATISTICA 7.0, a equação do modelo é inserida no espaço disponível sendo indicados os valores iniciais previstos dos valores de *c*, *EC* e *b*, para que o modelo seja estimado por um processo de interação; o valor de *c* é o do controlo, ao parâmetro *b* é primeiro atribuído o valor mais alto de 4 e o valor de *EC* é atribuído com base nos dados, i.e., um valor aproximado da concentração para a ocorrência de uma dada percentagem de inibição. Após os cálculos, o resultado é devolvido sob a forma de uma tabela que inclui a estimativa do valor EC, a significância da regressão e os LC a 95%.

No ensaio preliminar determinaram-se os valores de EC20 e EC50 para o diâmetro do micélio e a TCR. Dado que a TCR foi a variável mais sensível, nos ensaios definitivos determinaram-se as mesmas concentrações eficazes de inibição apenas para a variável TCR.

3 Resultados

3.1 Ensaio preliminar

3.1.1 Crescimento

Ocorreu crescimento de ambas as espécies de fungos, após 15 dias de exposição em todas as concentrações testadas de calda bordalesa (**Figuras 1 e 2**). *Heliscus lugdunensis* apresentou um aumento de diâmetro praticamente idêntico nas concentrações de 0 a 100 mg L^{-1} durante o total dos 15 dias de exposição. Embora tenha ocorrido uma estimulação do crescimento nas concentrações de 10 e 100 mg L^{-1} esta percentagem de ativação foi sempre inferior a 10%, variando entre 1 e 6%. Do mesmo modo, embora tenha sido observada uma ligeira diminuição no crescimento a 1 mg L^{-1} relativamente ao controlo a partir do dia 8, a percentagem de inibição no crescimento foi sempre inferior a 10%. No entanto, na concentração mais alta de 1000

mg L^{-1} o crescimento foi inibido logo desde o momento da primeira observação ao dia 6, em 25%, atingindo um decréscimo de 42% após os 15 dias de exposição.

No caso de *Tricladium splendens*, o crescimento foi idêntico nas concentrações de 0 até 10 mg L^{-1}, inclusive, com percentagens de inibição a variar entre 0 e apenas 8%, ocorrendo, no entanto, uma forte inibição do crescimento logo desde o primeiro dia de observação (dia 6) nas concentrações 100 e 1000 mg L^{-1}. As percentagens de inibição do crescimento variaram entre 32 e 40% a 100 mg L^{-1} e entre 56 e 66% a 1000 mg L^{-1}. Deste modo, embora *Tricladium splendens* tenha sido mais sensível à calda bordalesa que *Heliscus lugdunensis*, em ambas as espécies a concentração de calda bordalesa que mais inibiu a TCR foi a mais alta de 1000 mg L^{-1}.

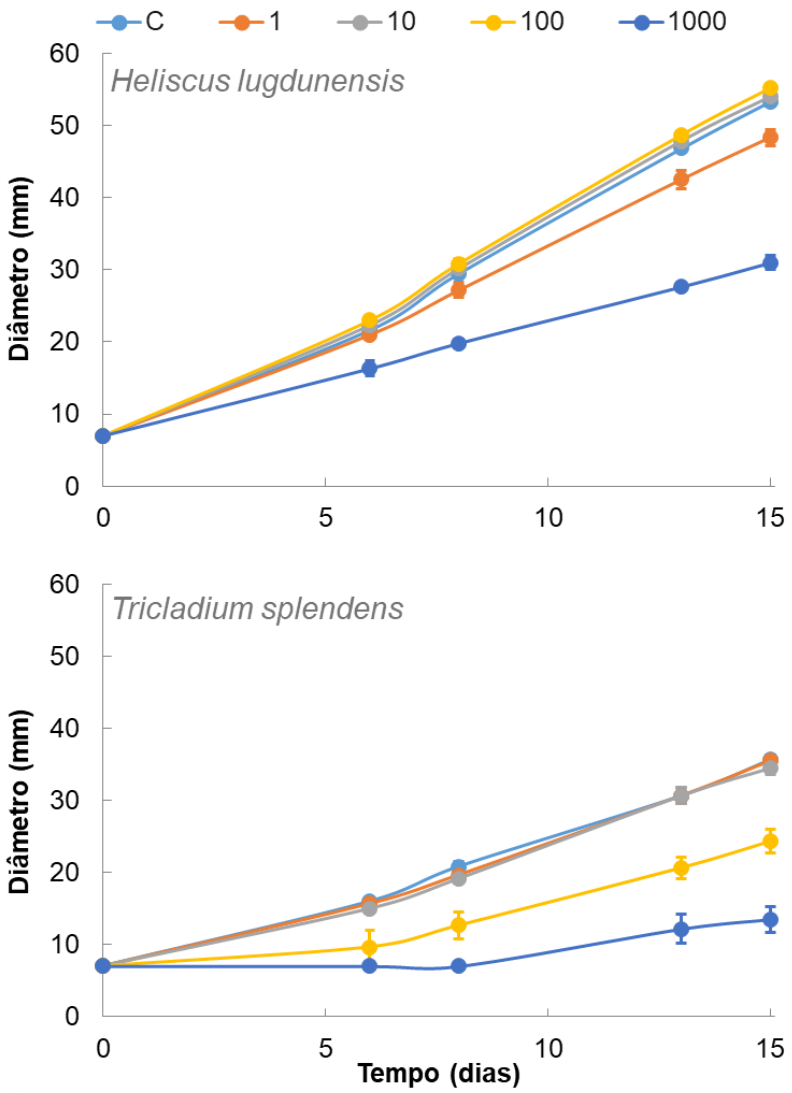

Figura 1 – Diâmetro (média ± desvio padrão) dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* ao longo dos 15 dias de exposição a diferentes concentrações de calda bordalesa (0 a 1000 mg L^{-1}) no ensaio preliminar.

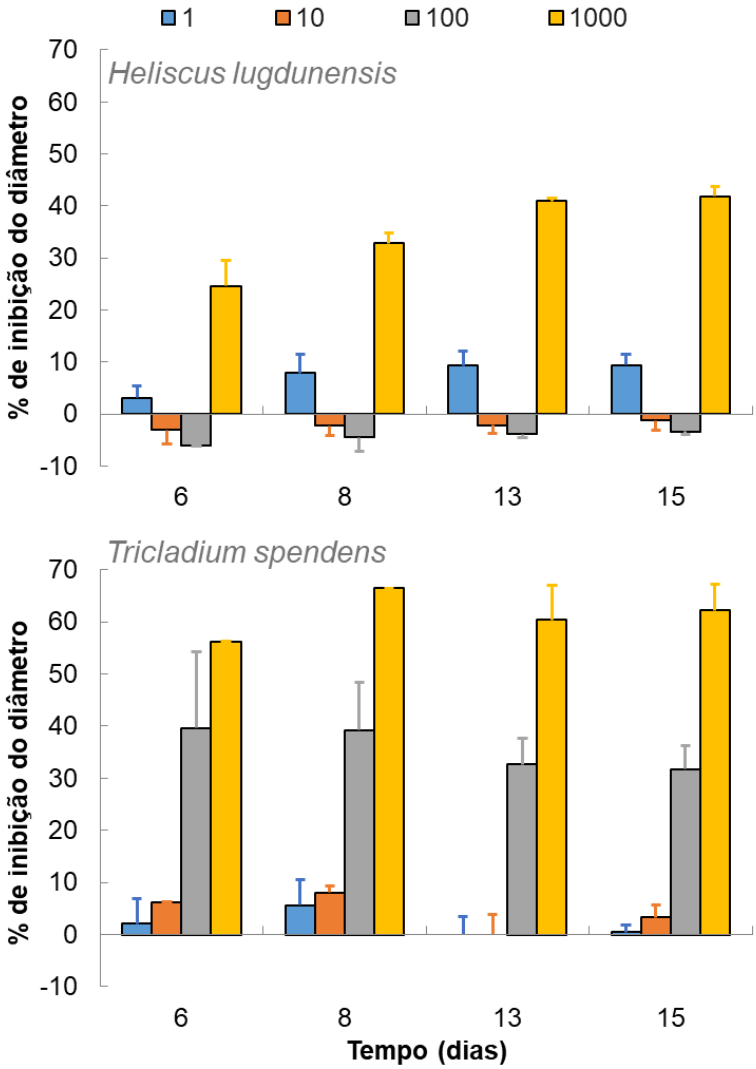

Figura 2 - Percentagem de inibição (média ± desvio padrão) em cada uma das quatro concentrações de calda bordalesa relativamente ao controlo (0 mg L^{-1}), da taxa de crescimento radial (TCR) dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* após 6, 8, 13 e 15 dias de exposição no ensaio preliminar. Uma coluna com valor positivo denota inibição enquanto uma coluna com valor negativo denota ativação da TCR.

3.1.2 Concentrações eficazes de inibição

No caso de *Tricladium splendens*, o modelo que melhor explicou a variação do crescimento, quer do diâmetro quer da TCR, com o aumento da concentração de calda bordalesa foi o modelo logístico. De acordo com este modelo, ocorreu ligeira diminuição da sensibilidade ao longo do tempo, com os valores de EC20 do diâmetro a variarem em menos de duas vezes, entre 26,00 mg L^{-1} no dia 6 e 45,90 mg L^{-1} no dia 15, e da taxa de crescimento entre 19,20 mg L^{-1} no dia 6 e 38,00 mg L^{-1} no dia 15, com alguma sobreposição nos LC a 95% (**Tabela 3**). Na TCR ocorreu uma diminuição mais

acentuada da sensibilidade entre os dias 6 e 8, com os valores de EC20 a aumentarem para o dobro sem ocorrer sobreposição dos valores de LC a 95%. No entanto, nos dias 8 e 13 a diminuição da sensibilidade foi ligeira, tal como tinha ocorrido com o diâmetro. Relativamente aos valores de EC50 para o diâmetro estes variaram no máximo entre apenas 380,0 mg L^{-1} no dia 6 e 249,4 mg L^{-1} no dia 8, embora sem sobreposição dos LC a 95%. No entanto, a TCR sofreu uma marcada diminuição de sensibilidade ao longo do tempo, com os valores de EC50 a aumentarem para mais do dobro (3,4 vezes) do dia 6 (48,40 mg L^{-1}) para o dia 15 (167,6 mg L^{-1}) sem sobreposição dos valores dos LC a 95% (**Tabela 4**). Deste modo, para ambos os parâmetros de toxicidade EC20 e EC50, a TCR revelou ser bastante mais sensível do que o diâmetro (**Tabelas 3 e 4**), não existindo na maioria dos casos sobreposição dos valores de LC 95%. De realçar que, as regressões do modelo logístico foram todas significativas, quer para os valores de EC20 quer para os valores de EC50, tanto do diâmetro como da TCR ($t > 5,7$, $p < 0,00009$).

Tabela 3 - Estimativa dos valores das concentrações eficazes que provocaram percentagens de inibição de 20% (EC20; mg L^{-1}) do diâmetro e da taxa de crescimento radial (TCR), e respetivos limites de confiança a 95%, obtidos com o modelo logístico, para o hifomiceto aquático *Tricladium splendens* após 6, 8, 13 e 15 dias de exposição a uma gama de cinco concentrações (0 a 1000 mg L^{-1}) de calda bordalesa no ensaio preliminar. *P* = nível de significância.

Diâmetro	EC20	Limite inferior 95%	Limite superior 95%	*P*
Dia 6	26,00	24,50	27,40	<0,00001
Dia 8	31,80	31,10	32,50	<0,00001
Dia 13	45,20	44,50	46,00	<0,00001
Dia 15	45,90	45,10	46,70	<0,00001
TCR	**EC20**	**Limite inferior 95%**	**Limite superior 95%**	***P***
Dia 6	19,20	17,50	21,00	<0,00001
Dia 8	51,70	48,20	55,30	<0,00001
Dia 13	35,70	35,10	36,30	<0,00001
Dia 15	38,00	37,60	38,40	<0,00001

Tabela 4 - Estimativa dos valores das concentrações eficazes que provocaram percentagens de inibição de 50% (EC50; mg L^{-1}) do diâmetro e da taxa de crescimento radial (TCR), e respetivos limites de confiança a 95%, obtidos com o modelo logístico para o hifomiceto aquático *Tricladium splendens* após 6, 8, 13 e 15 dias de exposição a uma gama de cinco concentrações (0 a 1000 mg L^{-1}) de calda bordalesa no ensaio preliminar. *P* = nível de significância.

Diâmetro	EC50	Limite inferior 95%	Limite superior 95%	*P*
Dia 6	380,0	378,8	381,2	<0,00001
Dia 8	249,4	248,9	249,9	<0,00001
Dia 13	369,0	368,5	369,5	<0,00001
Dia 15	359,5	359,2	359,8	<0,00001
TCR	**E50**	**Limite inferior 95%**	**Limite superior 95%**	***P***
Dia 6	48,40	47,30	49,40	<0,00001
Dia 8	90,00	89,60	90,40	<0,00001
Dia 13	147,5	147,1	147,9	<0,00001
Dia 15	167,6	167,3	167,8	<0,00001

No caso de *Heliscus lugdunensis* não foi possível calcular as concentrações eficazes de inibição devido à ocorrência de ativação (ver resultados apresentados na seção anterior 1.1.1) nas concentrações intermédias e inibição na concentração mais baixa (1 mg L^{-1}) e na concentração mais alta (1000 mg L^{-1}).

3.2 Ensaios definitivos

3.2.1 Comparação dos controlos-zero em cada salinidade

A evolução do diâmetro de *Heliscus lugdunensis* foi semelhante nos seis ensaios efetuados, com os valores no dia 14 a variarem no máximo 7,8 mm entre ensaios (**Figura 3**). Já no caso de *Tricladium splendens*, a diferença entre os diâmetros registados nos seis ensaios foi maior, com uma variação de 14,4 mm no dia 14 (**Figura 3**). Apesar disso, não ocorreram diferenças significativas entre os ensaios, quer no caso de *Heliscus* lugdunensis (F = 0,41; P = 0,84) quer no caso de *Tricladium splendens* (F = 1,72; P = 0,14) (**Apêndice 2**). Estes resultados confirmaram ser válido fazer comparações diretas entre todos os ensaios de uma mesma espécie, apesar de não terem sido realizados em simultâneo.

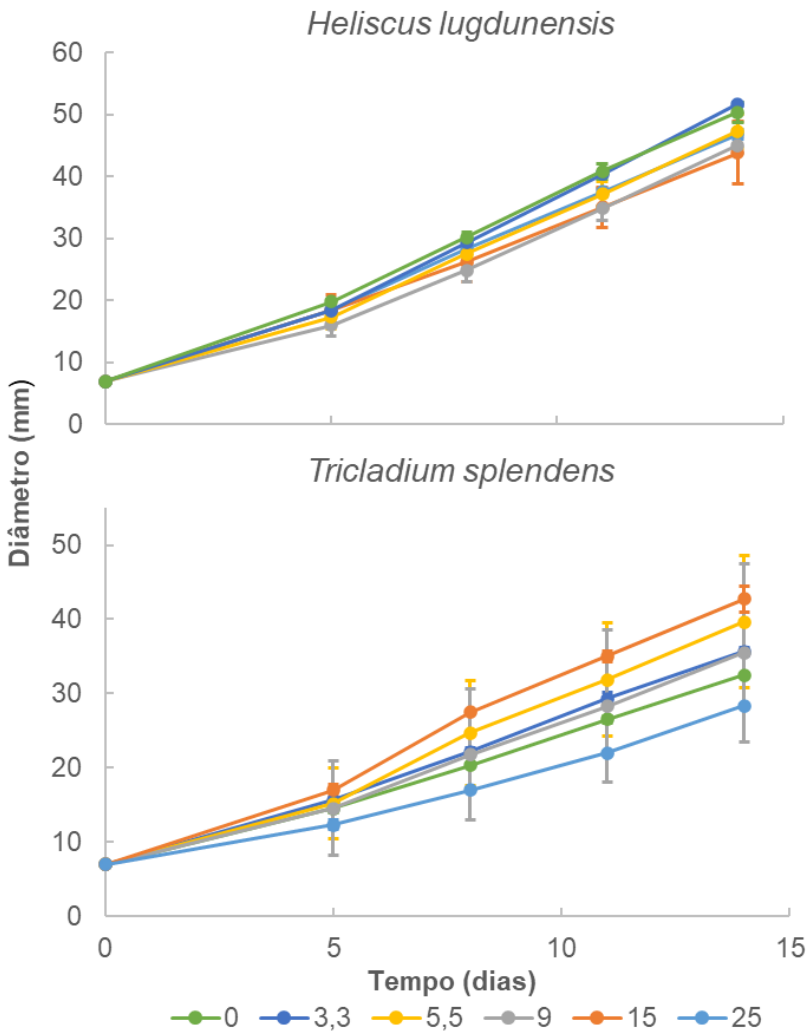

Figura 3 - Evolução do diâmetro dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* ao longo dos 14 dias de incubação no controlo-zero (água destilada e 0 g L^{-1} de calda bordalesa) de cada salinidade.

3.2.2 Crescimento

Nas salinidades 0, 3,3, e 5,5 mS cm^{-1} o hifomiceto aquático *Heliscus lugdunensis* (**Figura 4**) cresceu de forma idêntica, tanto em dimensão como no padrão, em todas as concentrações exceto na de 1500 mg L^{-1}, onde ocorreu inibição do crescimento. Com o aumento da salinidade, mais evidente a partir de 5,5 mS cm^{-1}, ocorreu efeito da calda bordalesa a concentrações cada vez menores, ou seja, com o aumento da salinidade o diâmetro foi sendo menor para uma mesma concentração. Quando se comparam as salinidades 0 e 25 mS cm^{-1}, é evidente este padrão, com uma forte redução do diâmetro nas concentrações 166,7 e 500 mg L^{-1}, enquanto na concentração 1500 mg L^{-1} deixou de ocorrer crescimento a partir dos 9 mS cm^{-1}, inclusive (**Figura 4**).

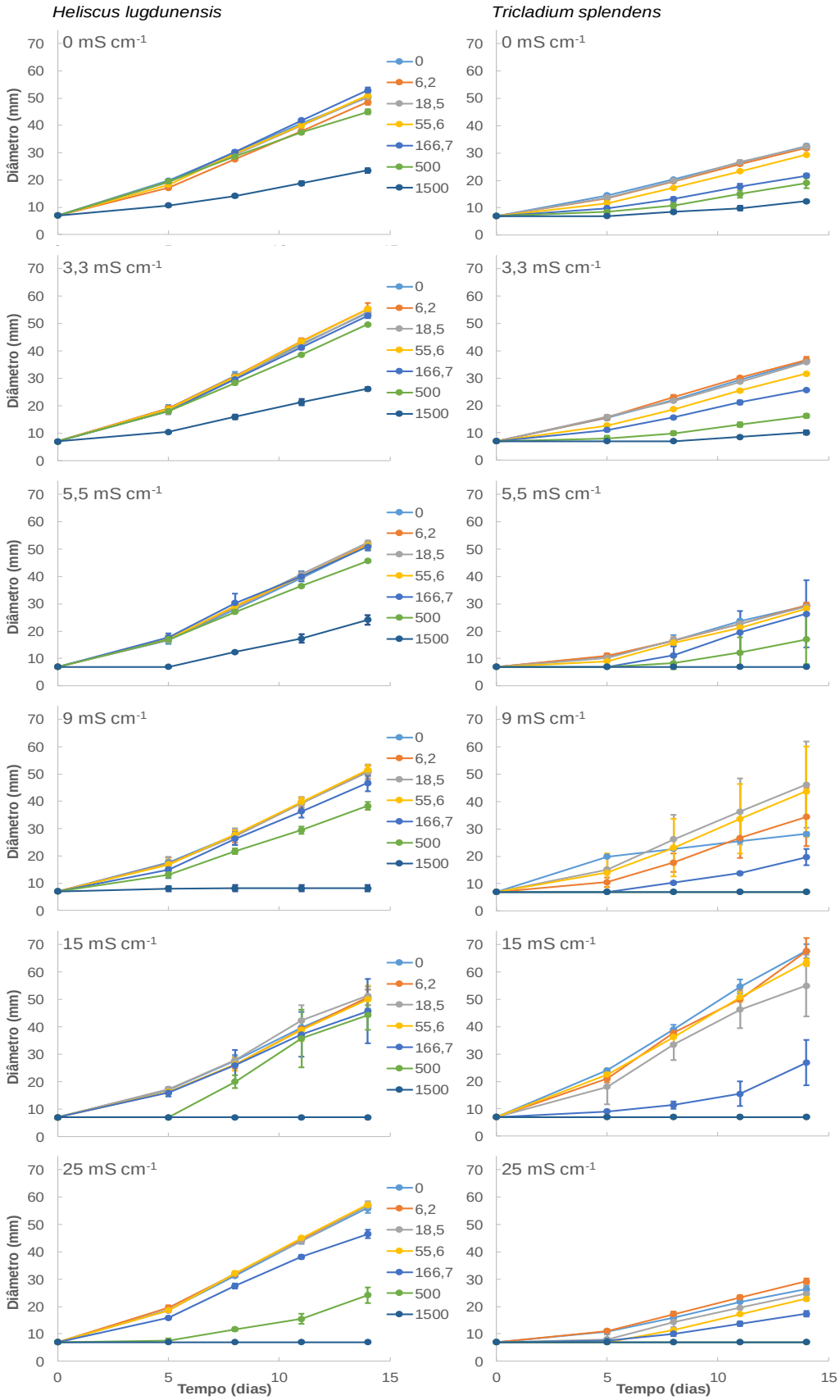

Figura 4 - Evolução do diâmetro (média ± desvio padrão) dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* ao longo dos 14 dias de incubação em cada uma das concentrações de calda bordalesa e em cada salinidade (mS cm^{-1}).

No caso de *Tricladium splendens*, o efeito das concentrações de calda bordalesa entre 0 e 18,5 g L^{-1} foi praticamente análogo nas salinidades 0 e 3,3 mS cm^{-1}. A partir da salinidade 5,5 mS cm^{-1} ocorreu 100% de inibição do crescimento na concentração 1500 mg L^{-1}, sendo que o mesmo acontece a partir da salinidade 9 mS cm^{-1} para a concentração 500 mg L^{-1}. De realçar que para uma salinidade de 25 mS cm^{-1} houve uma forte inibição do diâmetro em todas as concentrações de calda bordalesa, inclusive a 0 mg L^{-1}. Um resultado surpreendente pode ser observado nas salinidades 9 e 15 mS cm^{-1}, onde *Tricladium splendens* cresceu mais dos que nas concentrações homólogas preparadas nas restantes salinidades, o que pode indicar que este fungo pode ser estimulado a nível do crescimento com o aumento da salinidade.

Num panorama geral há uma diminuição progressiva do diâmetro com o aumento da concentração de calda bordalesa para *Tricladium splendens* e da salinidade para *Heliscus lugdunensis*. No entanto, é de ressaltar que *Tricladium splendens* e *Heliscus lugdunensis,* quando tratados em meios de cultura idênticos, não possuem ritmos de crescimento semelhantes (**Figura 4**).

Em *Heliscus lugdunensis* ocorreu uma redução acentuada na TCR a partir da concentração de 166,7 mg L^{-1} de calda bordalesa em todas as salinidades, sendo este efeito mais acentuado com o aumento da salinidade (**Figura 5**). Esta concentração, possui percentagens de inibição máximas de 25, 41 e 25% para as salinidades 9, 15 e 25 mS cm^{-1}, respetivamente. A concentração de 500 mg L^{-1}, por sua vez, têm percentagens de inibição máximas que rondam os 42, 100 e 97%. Finalmente, na concentração mais alta, de 1500 mg L^{-1}, a menor percentagem de inibição ronda os 50% na salinidade 0 e a maior percentagem de inibição de 100% nas salinidades mais altas. No caso do *Tricladium splendens*, a maior redução da TCR ocorreu também a partir da concentração 166,7 mg L^{-1}. De modo semelhante também ao *Heliscus lugdunensis,* as maiores percentagens de inibição ocorreram nas 3 salinidades mais altas da concentração 166,7 mg L^{-1} e em todas as salinidades da concentração 500 e 1500 mg L^{-1}, sendo que nestas as percentagens atingiram na sua maioria os 100%. Contudo, ao contrário do *Heliscus lugdunensis,* uma ativação foi observada na TCR do *Tricladium splendens* nas salinidades de 9 e 15 (**Figura 5**).

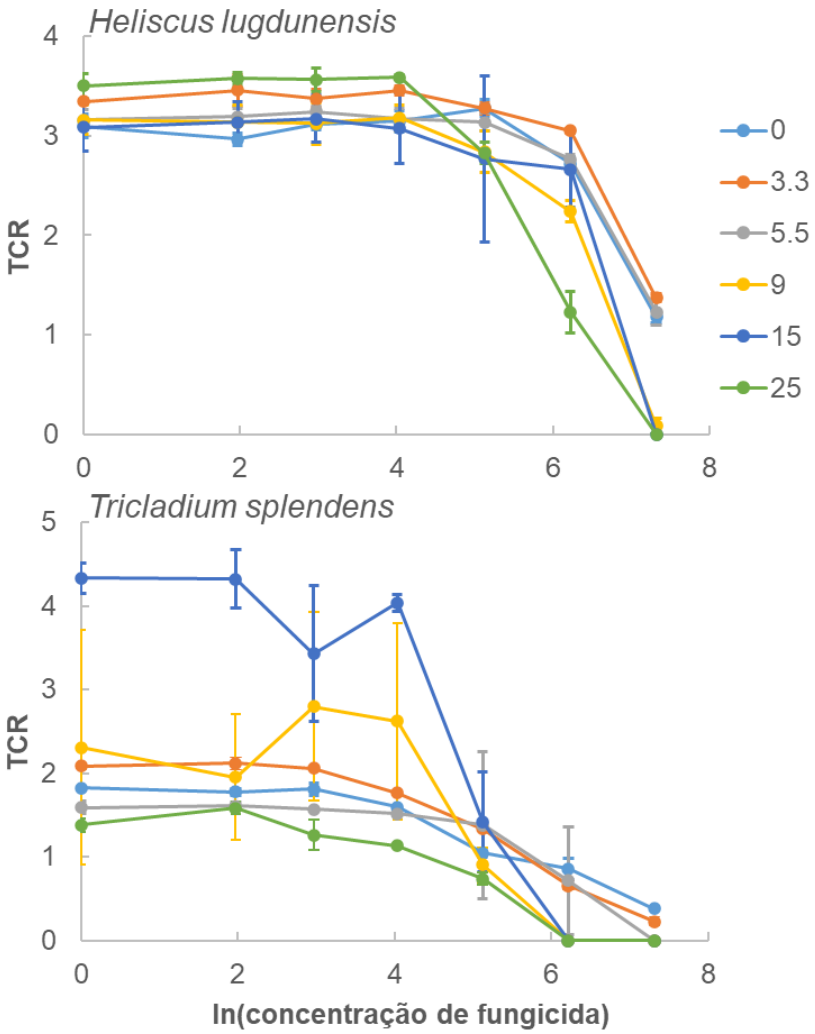

Figura 5 - Taxa de crescimento radial (média ± desvio padrão; TCR, mm dia^{-1}) dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens*) após 14 dias de incubação em cada concentração de calda bordalesa (mg L^{-1}) e em cada salinidade (mS cm^{-1}).

3.2.3 Concentrações eficazes de inibição

De forma semelhante ao observado nos ensaios preliminares, para ambas as espécies de hifomicetos aquáticos o modelo que melhor explicou a variação da TCR com o aumento da concentração de calda bordalesa foi o modelo logístico. Salvo raras exceções, após 5 dias de exposição, este modelo permitiu obter regressões significativas (P < 0,00001-0,05) para ambos os valores de EC20 e de EC50 da TCR (**Tabelas 5 e 6**). A descrição detalhada destes resultados será aqui feita apenas para os valores de EC50, visto que, para os valores de EC20 os efeitos não são tão visíveis, sendo a sua apresentação uma informação complementar.

Tabela 5 - Estimativa dos valores das concentrações eficazes que provocaram percentagens de inibição de 20% e 50% (EC20 e EC50; mg L^{-1}) da taxa de crescimento radial (TCR), e respetivos limites de confiança a 95%, obtidos com o modelo logístico para o hifomiceto aquático *Heliscus lugdunensis* após 5, 8, 11 e 14 dias de exposição a uma gama de seis concentrações (0 a 1500 mg L^{-1}) de calda bordalesa em cada uma de cinco salinidades (0 a 25 mS cm^{-1}). P = nível de significância.

Salinidade (mS cm^{-1})	Dia	EC20	Limite inferior 95%	Limite superior 95%	*P*
25	5	152,7	137,3	168,1	<0,00001
	8	**178,7**	**164,1**	**193,4**	**<0,00001**
	11	183,8	166,8	200,8	<0,00001
	14	175,0	147,0	202,9	<0,00001
15	5	133,7	30,3	237,1	<0,05
	8	**389,0**	**208,4**	**569,7**	**<0,001**
	11	557,2	-356,0	1470,4	0,22
	14	481,7	365,7	597,7	<0,00001
9	5	226,8	22,0	431,6	<0,05
	8	**437,1**	**350,9**	**523,2**	**<0,00001**
	11	425,4	366,7	484,1	<0,00001
	14	444,6	391,9	497,4	<0,00001
5,5	5	676,3	-13416,1	14768,7	0,92
	8	**673,0**	**496,1**	**850,0**	**<0,00001**
	11	656,7	567,1	746,3	<0,00001
	14	626,2	554,7	697,6	<0,00001
3,3	5	746,1	498,8	993,5	<0,0001
	8	**710,7**	**589,0**	**832,3**	**<0,00001**
	11	659,9	571,8	747,9	<0,00001
	14	693,3	611,4	775,2	<0,00001
0	5	1276,6	-1988629,0	1991182,0	1,00
	8	**851,0**	**626,6**	**1075,3**	**<0,00001**
	11	744,9	607,1	882,8	<0,00001
	14	658,3	541,6	775,1	<0,00001
Salinidade (mS cm^{-1})	**Dia**	**EC50**	**Limite inferior 95%**	**Limite superior 95%**	***P***
25	5	220,6	195,1	246,2	<0,00001
	8	**293,8**	**276,8**	**310,8**	**<0,00001**
	11	311,1	292,1	330,2	<0,00001
	14	345,8	312,8	378,8	<0,00001
15	5	185,8	110,8	260,8	<0,0001
	8	**608,3**	**406,6**	**810,1**	**<0,0001**
	11	664,5	-2068,7	3397,8	0,62
	14	639,3	277,1	1001,5	<0,01
9	5	543,0	261,8	824,1	<0,001
	8	**664,7**	**543,0**	**786,5**	**<0,00001**
	11	638,1	557,5	718,8	<0,00001
	14	642,3	557,6	726,9	<0,00001
5,5	5	742,7	-22224,2	23709,6	0,95
	8	**1043,2**	**881,5**	**1204,9**	**<0,00001**
	11	1111,2	1028,2	1194,1	<0,00001
	14	1202,9	1130,3	1275,6	<0,00001
3,3	5	1150,2	960,1	1340,4	<0,00001
	8	**1241,4**	**1138,9**	**1343,8**	**<0,00001**
	11	1249,3	1164,2	1334,3	<0,00001
	14	1267,9	1194,7	1341,0	<0,00001
0	5	1425,7	-8176399,0	8179250,0	1,00
	8	**1228,0**	**1093,7**	**1362,3**	**<0,00001**
	11	1216,2	1111,2	1321,2	<0,00001
	14	1202,1	1092,4	1311,9	<0,00001

Para *Heliscus lugdunensis* foi observada uma diminuição na toxicidade de calda bordalesa com a diminuição da salinidade com valores de EC50 na salinidade 0 mS cm^{-1} (1202,1 a 1425,7 mg L^{-1}) cerca de cinco vezes superiores relativamente à salinidade mais alta de 25 mS cm^{-1} (220,6 a 345,8 mg L^{-1}), e sem sobreposição dos LC a 95%. A toxicidade da calda bordalesa também diminuiu com o aumento do tempo de exposição, sobretudo do dia 5 para o dia 8 e nas duas salinidades mais altas de 15 (185,8 a 608,3 mg L^{-1}) e 25 mS cm^{-1} (220,6 a 293,8 mg L^{-1}) onde não se observou sobreposição dos respetivos LC a 95% (**Tabela 5**).

Para *Tricladium splendens* (**Tabela 6**) foram observadas tendências semelhantes de alteração de toxicidade da calda bordalesa em função da salinidade e tempo de exposição. A toxicidade diminuiu com a diminuição da salinidade, com valores de EC50 cerca de duas a três vezes maiores entre a mais alta de 25 mS cm^{-1} (17,65 a 151,2 mg L^{-1}) e as mais baixas salinidades de 0 a 5,5 mS cm^{-1} (56,04 a 449,9 mg L^{-1}), e sem sobreposição de LC a 95%. O aumento do tempo de exposição diminuiu igualmente a toxicidade da calda bordalesa, com um aumento de pelo menos o dobro nos valores de EC50 relativamente aos tempos mais longos de exposição, por vezes logo entre o dia 5 e o dia 8 e sem sobreposição dos LC a 95%. No entanto, de um modo geral este padrão é quebrado nas salinidades intermédias de 9 e 15 mS cm^{-1} (**Tabela 6**).

A determinação dos valores de EC20 e EC50, para os vários dias de observação, mostrou que este tipo de ensaio padronizado poderia ser realizado em cerca de 8 dias, visto que, mais tempo de exposição diminui a toxicidade da calda bordalesa para ambos os fungos aquáticos e um tempo de exposição de apenas 5 dias pode não permitir a obtenção de resultados robustos, dado que várias vezes não foi possível calcular os LC a 95%. A **Figura 6** apresenta as combinações de concentração de fungicida e salinidade eficazes para provocar uma inibição de crescimento em 20 e 50% após 8 dias de exposição. O fungo *Tricladium splendens* é bastante mais sensível à calda bordalesa do que o *Heliscus lugdunensis*, já que menores concentrações do mesmo produto produzem um efeito semelhante (EC50 e EC20). Para além disso, para ambas as espécies é visível um forte aumento na toxicidade da calda bordalesa nas duas salinidades mais altas (15 e 25 mS cm^{-1}).

Tabela 6 - Estimativa dos valores das concentrações eficazes que provocaram percentagens de inibição de 20% e 50% (EC20 e EC50; mg L^{-1}) da taxa de crescimento radial (TCR), e respetivos limites de confiança a 95%, obtidos com o modelo logístico para o hifomiceto aquático *Tricladium splendens* após 5, 8, 11 e 14 dias de exposição a uma gama de seis concentrações (0 a 1500 mg L^{-1}) de calda bordalesa em cada uma de cinco salinidades (0 a 25 mS cm^{-1}). P = nível de significância

Salinidade (mS cm^{-1})	Dia	EC20	Limite inferior 95%	Limite superior 95%	*P*
25	5	16,4	15,4	17,4	<0,00001
	8	**18,7**	**4,7**	**32,7**	**<0,05**
	11	37,1	14,3	59,8	<0,01
	14	71,4	38,8	103,9	<0,001
15	5	133,8	-802306,1	802573,7	1,00
	8	**85,8**	**35,6**	**136,0**	**<0,01**
	11	106,3	-123,1	335,7	0,34
	14	109,7	-44,0	263,3	0,15
9	5	116,8	-3050,5	3284,1	<0,00001
	8	**153,9**	**153,9**	**153,9**	**<0,00001**
	11	142,2	-2519127,2	2519411,5	1,00
	14	147,8	-7870181,4	7870476,9	1,00
5,5	5	33,6	14,1	53,1	<0,01
	8	**71,9**	**5,5**	**138,4**	**<0,05**
	11	161,7	-5,2	328,5	0,06
	14	252,9	-44,9	550,7	0,09
3,3	5	41,3	20,7	61,8	<0,001
	8	**61,3**	**42,3**	**80,3**	**<0,00001**
	11	74,7	59,9	89,6	<0,00001
	14	77,4	65,6	89,2	<0,00001
0	5	28,1	13,4	42,7	<0,001
	8	**43,1**	**26,4**	**59,9**	**<0,0001**
	11	59,3	32,5	86,0	<0,001
	14	66,7	35,3	98,2	<0,001
Salinidade (mS cm^{-1})	**Dia**	**EC50**	**Limite inferior 95%**	**Limite superior 95%**	***P***
25	5	17,65	16,69	18,61	<0,00001
	8	**57,49**	**32,54**	**82,44**	**<0,001**
	11	104,3	67,3	141,3	<0,0001
	14	151,2	112,3	190,0	<0,00001
15	5	149,6	-4598041,0	4598341,0	1,00
	8	**114,7**	**74,78**	**154,7**	**<0,0001**
	11	132,7	-10,87	276,2	0,07
	14	146,3	79,38	213,2	<0,001
9	5	140,2	-2938	3218	<0,00001
	8	**159,6**	**159,6**	**159,6**	**<0,00001**
	11	164,0	158,2	169,8	<0,00001
	14	161,0	-1163027,7	1163349,8	1,00
5,5	5	56,04	40,46	71,62	<0,00001
	8	**151,1**	**77,38**	**224,9**	**<0,001**
	11	330,9	126,5	535,3	<0,01
	14	449,9	186,5	713,3	<0,01
3,3	5	119,3	85,2	153,5	<0,00001
	8	**173,1**	**142,4**	**203,8**	**<0,00001**
	11	225,9	200,4	251,4	<0,00001
	14	252,6	230,9	274,3	<0,00001
0	5	106,8	74,96	138,6	<0,00001
	8	**170,8**	**133,7**	**207,9**	**<0,00001**
	11	255,3	192,4	318,3	<0,00001
	14	329,2	246,9	411,5	<0,00001

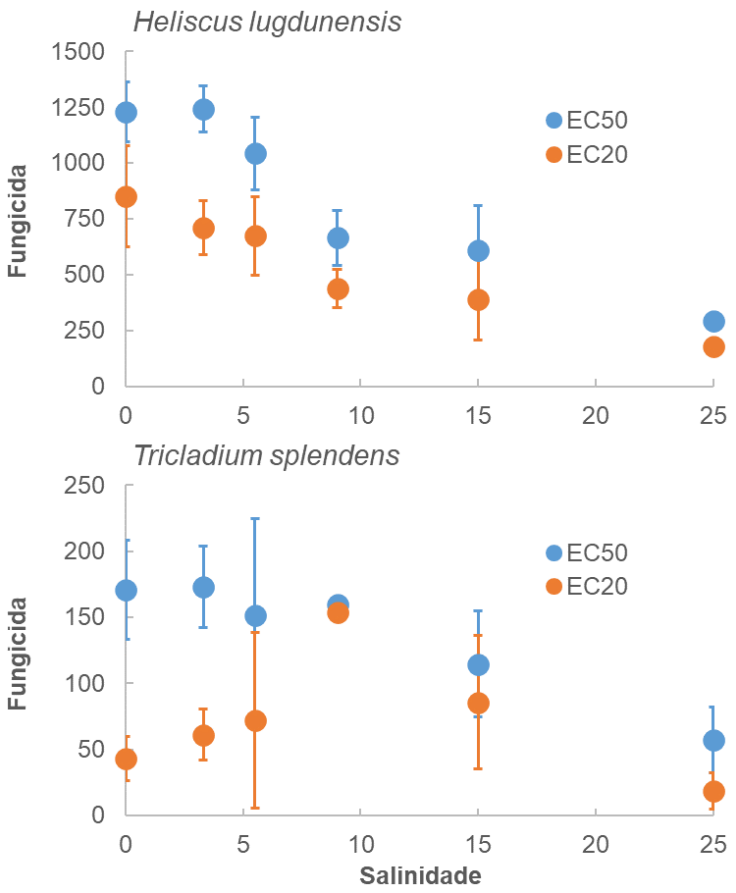

Figura 6 - Valores das concentrações eficazes do fungicida calda bordalesa e salinidade que provocaram em conjunto percentagens de inibição de 20% e 50% (EC20 e EC50) na taxa de crescimento radial dos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* (valor ± 95% limites de confiança) após 8 dias de incubação a uma gama de concentração de calda bordalesa (0 a 1500 mg L^{-1}) e de salinidade (0 a 25 mS cm^{-1}).

4 Discussão

Os testes ecotoxicológicos são fundamentais para conhecer as características e possíveis consequências da utilização de um determinado produto ou substância (Zagatto & Bertoletti, 2008). Contudo, estes testes são ainda muito limitados às espécies padrão, como o cladócero *Daphnia magna* (OECD, 1998) e o peixe *Danio rerio* (OECD, 2019), que apesar de fornecerem importantes informações podem não ser representativos dos organismos que se encontram num determinado ecossistema.

De modo a cumprir os objetivos propostos no presente trabalho, foram escolhidos como organismos teste, representativos de espécies não-alvo, os hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens*.

O primeiro objetivo consistiu na determinação do efeito da calda bordalesa nas duas espécies não-alvo. Os resultados convergentes de ambos os ensaios preliminar e definitivo permitiram aferir que o *Tricladium splendens* é mais sensível ao fungicida do que o *Heliscus lugdunensis,* pois enquanto todas as concentrações teste de fungicida inibiram o *Tricladium splendens*, algumas concentrações intermédias estimularam o crescimento do *Heliscus lugdunensis*. Estes resultados encontram-se de acordo com outros estudos, nos quais se demostra a capacidade da adaptação do *Heliscus lugdunensis* a maiores concentrações de cobre no ambiente (Braha et al., 2007; Azevedo et al., 2007; Krauss et al., 2011; Quainoo et al., 2016), podendo na presença de metais ocorrer estimulação da reprodução (Sridhar & Bärlocher, 2011). Como já foi mencionado em pontos anteriores, Braha et al. (2007) estudou duas estirpes de *Heliscus lugdunensis*, uma proveniente de um local muito poluído por metais e a outra de um local moderadamente poluído, este estudo concluiu que a acumulação de ambos os metais era significativamente menor na estirpe proveniente do local mais poluído. Este resultado foi explicado pelos autores pela possível adaptação dos mecanismos de transporte, presente nas células do micélio, que permitem regular a entrada e saída destes metais, fazendo com que este fungo aquático seja mais resistente ao aumento de concentrações de cobre (Braha et al., 2007). Uma outra possível explicação encontrada para o facto do *Heliscus lugdunensis* ser estimulado na presença de certas concentrações de fungicida, é o facto deste produto poder conter cobre na sua composição, sendo que este metal é um micronutriente (Braha et al., 2007).

O segundo objetivo pretendeu determinar o efeito da salinidade na potenciação do efeito dos fungicidas. No ensaio preliminar foram testadas quatro concentrações de calda bordalesa, nos quais foi observado que *Heliscus lugdunensis* foi estimulado nas concentrações 10 e 100 mg L^{-1}, no entanto, pela inexistência de um maior número de concentrações teste foi impossível determinar se existiam concentrações superiores a 100 mg L^{-1} e inferiores a 1000 mg L^{-1} que produzissem o mesmo efeito estimulante. No ensaio definitivo, foi possível observar que esta espécie é estimulada por concentrações baixas de fungicida, entre 18,5 e 166,7 mg L^{-1}, pelo menos na ausência de salinidade. Contudo, assim que a salinidade utilizada aumenta o seu efeito fica visível devido à alteração do intervalo anteriormente mencionado, que passa a situar-se entre 6,2 e 55,6 mg L^{-1}. Relativamente à espécie *Tricladium splendens,* os resultados indicam que de modo geral, quando maior os níveis de salinidade maior o efeito do fungicida, excetuando-se as salinidades intermédias de 9 e 15 mS cm^{-1}, as quais parecem possuir um efeito estimulante no crescimento. Para garantir com uma certeza absoluta, o efeito estimulante no crescimento do *Tricladium splendens* dentro do intervalo de salinidades

referido, os ensaios necessitariam de ser repetidos, o que pode ser interessante para futuros estudos. Outros autores também estudaram o efeito da salinidade em fungos, como por exemplo Stockwell et al. (2015). Este investigou o efeito da salinidade na taxa de sobrevivência de anfíbios com uma infeção fúngica, a quitridiomicose, provocada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis,* e concluiu que a salinidade pode vir a ser uma ferramenta no processo de mitigação da infeção, visto que, maiores quantidades de NaCl reduzem significativamente a motilidade dos esporos deste fungo. Neste artigo o efeito negativo do aumento da concentração de sais em relação ao fungo é evidente, e o próprio autor deixa de aviso que antes da utilização deste método serão necessários estudos que tenham em conta os organismos não-alvo (Stockwell et al., 2015).

Finamente o último objetivo consistia em contribuir para o desenvolvimento de um ensaio padronizado com fungos aquáticos. Com base nas informações obtidas a partir dos valores de EC20 e EC50, foi possível verificar a existência de uma diminuição na sensibilidade das espécies expostas ao fungicida e à salinidade ao longo do tempo, algo que pode ser explicado pela diminuição da disponibilidade do cobre presente na composição da calda bordalesa. Desta forma, um ensaio padronizado para avaliar os efeitos no crescimento de hifomicetos aquáticos deverá ter uma duração de aproximadamente 8 dias.

5 Conclusão

A necessidade de ressaltar a importância de todos os componentes presentes num ecossistema, tanto individualmente, como no caso de um organismo que desempenha um determinado papel e fornece um serviço ecológico, como coletivamente, através dos quais o equilíbrio do sistema pode ser mantido, levou a que este trabalho tivesse como organismos de estudo, organismo não-alvo que são frequentemente esquecidos.

Este trabalho baseou-se no facto de não existirem muitos estudos que utilizem os hifomicetos aquáticos, como organismos não-alvo neste tipo de ensaios. As informações obtidas, a partir destes ensaios em particular, possibilitam que futuramente a realização de revisões referentes à regulamentação dos pesticidas, mais precisamente dos fungicidas, sejam mais cuidadas, visto que a informação que está disponível também é maior.

Por último espera-se incentivar o surgimento de novos estudos neste campo, de modo a fornecer uma melhor gestão e proteção do meio ambiente, para isso seria

interessante explorar o efeito de mais pesticidas, da temperatura, da salinidade e do pH, por exemplo, noutros fungos-aquáticos e até mesmo nas suas comunidades.

6 Referências bibliográficas

Abelho, M., Ribeiro, R. & Moreira-Santos, M. (2021). Salinity Affects Freshwater Invertebrate Traits and Litter Decomposition. Diversity, 13(11): 599. https://doi.org/10.3390/d13110599

Ascenza, (2021). Ficha de dados de segurança Segundo Regulamento (CE) N.º 1907/2006, alterado pelo Regulamento (UE) N.º 830/2015.

Azevedo, 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: 233–243.

Balbino, L. C., Cordeiro, L. A. M., Porfírio-da-Silva, V., Moraes, A. D., Martínez, G. B., Alvarenga, R. C., ... & Galerani, P. R. (2011). Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46(10): i-xii. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000001

Barlocher, F, & Kendrick, B. (1974). Dynamics of the fungal population on leaves in a stream. The Journal of Ecology, 62(3): 761-791. https://doi.org/10.2307/2258954

Braha, B., Tintemann, H., Krauss, G., Ehrman, J., Bärlocher, F. & Krauss, G. J. (2007). Stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* after exposure to cadmium and copper ions. BioMetals, 20(1): 93-105. DOI 10.1007/s10534-006-9018-y

Carvalho, N. L. & Pivoto, T. S. (2011). Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agronômica. Revista Monografias Ambientais, 2(2): 176-192. https://doi.org/10.5902/223613082315

Comissão Europeia (2005). Regulamento (CE) N.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005, relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal.

Comissão Europeia (2008a). Regulamento (CE) N.º 1272/2008 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas.

Comissão Europeia (2008b). Regulamento (CE) N.º 889/2008 DA COMISSÃO de 5 de Setembro de 2008 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos, no que respeita à produção biológica, à rotulagem e ao controlo.

Comissão Europeia (2009). Regulamento (CE) N.º 1107/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 21 de Outubro de 2009 relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado.

Crane, M., Burton, G.A., Culp, J.M., Greenberg, M.S., Munkittrick, K.R., Ribeiro, R., Salazar, M.H. & St-Jean., S.D. (2007). Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. Integrated Environmental Assessment and Management, 3: 234-245. https://doi.org/10.1897/IEAM_2006-027.1

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): 421-425. https://doi.org/10.1007%2Fs11270-011-0836-3

EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos). (2013). Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). EFSA Journal 2013;11(7):3290. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.

Environment Canada. (2007). Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. Report EPS 1/RM/46. Environmental Technology Center, Otawa.

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: 532-541. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.059

Graça, M.A.S., Ferreira, V., Canhoto, C., Encalada, A.C., Guerrero-Bolaño, F., Wantzen, K.M. & Boyero, L. (2015). A conceptual model of litter breakdown in low order streams. International Review of Hydrobiology, 100: 1–12. http://dx.doi.org/10.1002/iroh.201401757.

Ingold, C. T. (1942). Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. Transactions of the British Mycological Society, 25(4): 389.

Ittner, L. D., Junghans, M. & Werner, I. (2018). Aquatic fungi: a disregarded trophic level in ecological risk assessment of organic fungicides. Frontiers in Environmental Science, 6: 105. https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00105

Jain, A., Kumar, S. & Seena, S. 2019. Can low concentrations of metal oxide and Ag loaded metal oxide nanoparticles pose a risk to stream plant litter microbial decomposers? Science of the Total Environment, 653: 930-937. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.376.

Krauss, G., Bärlocher, F., Schreck P., Wennrich, R., Glasser, W. & Krauss, G.-J. (2001) Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. Nova Hedwigia, 72: 419–428.

Krauss, G. J., Sole, M., Krauss, G., Schlosser, D., Wesenberg, D. & Bärlocher, F. (2011). Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. FEMS Microbiology Reviews, 35(4): 620-651. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00266.x

Liber K., Goodfellow, W., Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A. & Simpson, S. (2007). In situ-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. Integrated Environmental Assessment and Management, 3: 246-258. https://doi.org/10.1897/2006-029FIN.1

Lombard, L., Van Der Merwe, A., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2014). Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of Ilyonectria and allied genera. Phytopathologia Mediterranea, 53(3): 515-532.

Maltby, L., Brock, TC., van den Brink, PJ. (2009). Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. Environmental Science & Technology, 43(19): 7556–7563. https://doi.org/10.1021/es901461c

Marinho, M. D. C., Diogo, B. S., Lage, O. M. & Antunes, S. C. (2020). Ecotoxicological evaluation of fungicides used in viticulture in non-target organisms. Environmental Science and Pollution Research, 27(35): 43958-43969. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10245-w

Marvanová, L. (2020). Maintenance of Aquatic Hyphomycete Cultures. Páginas 211-222 in Bärlocher, F., Gessner, M.O. & Graça, M.A.S. (eds.), Methods to Study Litter Decomposition, Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_24

Motta, I. D. S. (2008). Calda bordalesa: utilidades e preparo. Embrapa Agropecuária Oeste-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E).

OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico). (1998). Daphnia magna reproduction test. OECD guidelines for testing of chemicals 211. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico). (2019). Fish Acute Toxicity Test. OECD guidelines for testing of chemicals 203. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Pedrotti, A., Chagas, R. M., Ramos, V. C., do Nascimento Prata, A. P., Lucas, A. A. T., & dos Santos, P. B. (2015). Causas e consequências do processo de salinização dos solos. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, 19(2): 1308-1324. https://doi.org/10.5902/2236117016544

Pimentão, A. R., Pascoal, C., Castro, B. B., & Cássio, F. (2020). Fungistatic effect of agrochemical and pharmaceutical fungicides on non-target aquatic decomposers does not translate into decreased fungi-or invertebrate-mediated decomposition. Science of the Total Environment, 712: 135676. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135676

Quainoo, S., Seena, S., & Graça, M. A. (2016). Copper tolerant ecotypes of *Heliscus lugdunensis* differ in their ecological function and growth. Science of the Total Environment, 544: 168-174. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.119

Saccardo, P. A. (1980). Fungi Gallici lecti a cl. viris P. Brunaud, Abb. Letendre, A. Malbranche, J. Therry vel editi in Mycotheca Gallica C. Roumeguéri. Series II. Michelia, 2(6): 39–135.

Schvartsman, S. (1991). Intoxicações agudas. (quarta edição). Sarvier, São Paulo. 355p.

Seena, S., Casotti, C., & Cornut, J. (2020). Inter-and intraspecific functional variability of aquatic fungal decomposers and freshwater ecosystem processes. Science of The Total Environment, 707: 135570. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135570

Seena, S., Gutiérrez, I. B., Barros, J., Nunes, C., Marques, J. C., Kumar, S. & Gonçalves, A. M. (2022). Impacts of low concentrations of nanoplastics on leaf litter decomposition and food quality for detritivores in streams. Journal of Hazardous Materials, 429: 128320. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128320

Shearer, C. A., & Webster, J. (1991). Aquatic hyphomycete communities in the River Teign. IV. Twig colonization. Mycological Research, 95(4): 413-420. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80839-3

Sridhar, KR., Bärlocher, F., Krauss G-J. & Krauss G. (2005). Response of aquatic hyphomycete communities to changes in heavy metal exposure. International Review of Hydrobiology, 90: 21–32. https://doi.org/10.1002/iroh.200410736

Sridhar, K. R. & Bärlocher, F. (2011). Reproduction of aquatic hyphomycetes at low concentrations of Ca2+, Zn2+, Cu2+, and Cd2+. Environmental Toxicology and Chemistry, 30(12): 2868-2873. doi: 10.1002/etc.697

Stenersen, J. (2004). Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology; CRC Press: Boca Raton. https://doi.org/10.1201/9780203646830

Stockwell, M. P., Storrie, L. J., Pollard, C. J., Clulow, J. & Mahony, M. J. (2015). Effects of pond salinization on survival rate of amphibian hosts infected with the chytrid fungus. Conservation Biology, 29(2): 391-399. https://doi.org/10.1111/cobi.12402

Strange, R. N.; Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43, 83−116.

União Europeia (2015). REGULAMENTO (UE) 2015/830 DA COMISSÃO de 28 de maio de 2015 que altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH). Jornal Oficial da União Europeia L132, 29.5.2015. Bruxelas, Bélgica, 24 pp.

Van Straalen, N.M. (1993). Biodiversity of Ecotoxicological Responses in Animals. Netherlands Journal of Zoology, 44: 112-129. DOI 10.1163/156854294X00097

Vanclooster, M., Boesten, J. J. T. I., Trevisan, M., Brown, C. D., Capri, E., Eklo, O. M. & Van der Linden, A. M. A. (2000). A European test of pesticide-leaching models: methodology and major recommendations. Agricultural Water Management, 44(1-3): 1-19. https://doi.org/10.1016/S0378-3774(99)00081-5

Venâncio, C., Ribeiro, R., & Lopes, I. (2020). Active emigration from climate change-caused seawater intrusion into freshwater habitats. Environmental Pollution, 258: 113805. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113805

Venâncio, C., Ribeiro, R., & Lopes, I. (2022). Seawater intrusion: An appraisal of taxa at most risk and safe salinity levels. Biological Reviews, 97(1): 361-382. https://doi.org/10.1111/brv.12803

Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (2008). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações* (Vol. 478). São Carlos: RiMa.

Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., ... & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: an overlooked pesticide class?. Environmental science & technology, 53(7): 3347-3365. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392

7 Apêndices

Apêndice 1 – Valores nominais das concentrações eficazes de calda bordalesa e de cobre (20% peso/peso no fungicida; adaptado de ficha técnica da Ascenza; https://www.ascenza.pt/products/calda-bordalesa-ascenza) que provocaram percentagens de inibição de 50% (EC50; mg L^{-1}) nos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Tricladium splendens* após 5, 8, 11 e 14 dias de exposição a uma gama de seis concentrações (0 a 1500 mg L^{-1}) de calda bordalesa em cada uma de cinco salinidades (0 a 25 mS cm^{-1}).

		Heliscus lugdunensis		*Tricladium splendens*	
Salinidade (mS cm^{-1})	**Dia**	**Calda bordalesa**	**Cobre**	**Calda bordalesa**	**Cobre**
25	5	220.6	44.1	17.6	3.5
	8	**293.8**	**58.8**	**57.5**	**11.5**
	11	311.1	62.2	104.3	20.9
	14	345.8	69.2	151.2	30.2
15	5	185.8	37.2	149.6	29.9
	8	**608.3**	**121.7**	**114.7**	**22.9**
	11	664.5	132.9	132.7	26.5
	14	639.3	127.9	146.3	29.3
9	5	543.0	108.6	140.2	28.0
	8	**664.7**	**132.9**	**159.6**	**31.9**
	11	638.1	127.6	164.0	32.8
	14	642.3	128.5	161.0	32.2
5.5	5	742.7	148.5	56.0	11.2
	8	**1043.2**	**208.6**	**151.1**	**30.2**
	11	1111.2	222.2	330.9	66.2
	14	1202.9	240.6	449.9	90.0
3.3	5	1150.2	230.0	119.3	23.9
	8	**1241.4**	**248.3**	**173.1**	**34.6**
	11	1249.3	249.9	225.9	45.2
	14	1267.9	253.6	252.6	50.5
0	5	1425.7	285.1	106.8	21.4
	8	**1228.0**	**245.6**	**170.8**	**34.2**
	11	1216.2	243.2	255.3	51.1
	14	1202.1	240.4	329.2	65.8

Apêndice 2 – Comparação dos controlos-zero (0 mS cm^{-1} e 0 mg L^{-1}), dos ensaios definitivos efetuados para cada salinidade, através dos resultados de significância da ANOVA de um fator.

Effect	Univariate Results for Each DV (untransformed) (Controls in controls) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition								
	Degr. of Freedom	Heliscus SS	Heliscus MS	Heliscus F	Heliscus p	Tricladium SS	Tricladium MS	Tricladium F	Tricladium p
Intercept	1	65241.44	65241.44	475.3636	0.000000	39856.97	39856.97	499.5837	0.000000
Salinity	5	278.21	55.64	0.4054	0.843115	687.61	137.52	1.7238	0.143551
Error	58	7960.23	137.25			4627.26	79.78		
Total	63	8238.44				5314.87			

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (Controls in controls) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 14.24449				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	103542.6	1	103542.6	510.2993	0.000000
Salinity	272.8	5	54.6	0.2689	0.928308
Error	11768.5	58	202.9		
DAY	1555.8	1	1555.8	110.1846	0.000000
DAY*Salinity	693.0	5	138.6	9.8161	0.000001
Error	819.0	58	14.1		