



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos de escorrências de minas de Urânio na decomposição foliar e ecologia do invertebrado *Sericostoma vittatum*

Ana Virgínia da Silva Gonçalves Pereira Lírio

2009



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos de escorrências de minas de Urânio na decomposição foliar e ecologia do invertebrado *Sericostoma vittatum*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Moreira Monteiro Leal Canhoto (Universidade de Coimbra)

Ana Virgínia da Silva Gonçalves Pereira Lírio

2009

Para os meus Pais e Irmão...

*Ó Tâmega baixinho e transparente,
Sob copados amieiros...
Ao declinar o dia, és pálida corrente,
Onde, triste, flutua a sombra dos outeiros*

*Ó Tâmega dos pegos tenebrosos;
Da branca névoa arrefecida,
Dos soturnos queixumes clamorosos,
Na noite adormecida...*

*Rio da minha aldeia...
Pelo chuvoso Inverno maré cheia
Das lágrimas profundas do Marão...
Tu és, ó Rio, a dor da grande Serra;
O seu drama de fragas e de terra,
Esvaído em água torva de paixão!*

Teixeira de Pascoaes – 1878/1952

Agradecimentos

A elaboração desta tese só seria possível com o apoio e amizade de muitas pessoas às quais quero deixar o meu agradecimento.

A minha primeira palavra de imensa gratidão vai para a Professora Cristina Canhoto. Obrigada por toda a orientação, toda a paciência, toda a dedicação, toda a amizade. Sem o olhar atento e cuidadoso da Professora, a realização desta tese não teria sido possível.

Ao Professor Manuel Augusto pelo auxílio e orientação científica sempre que foi necessário.

À Ana Gonçalves pelo apoio incondicional dentro e fora do laboratório. Pela amizade, pelos conselhos assertivos, por me ajudar em todos os momentos; o meu muito obrigado Ana.

À Verónica por me transmitir tão bons ensinamentos e conhecimentos.

A todos os colegas do grupo pela camaradagem, preocupação e muito bom ambiente que sempre proporcionaram.

A todos os que fazem parte do IMAR, com especial agradecimento à Gabi pela simpatia e alegria com que sempre me brindou.

A todos os meus amigos de jornada académica, a todos os amigos de Amarante que se mantiveram inabaláveis.

À minha Amiga Andrea, que a cada momento me faz crer que 'ter um Amigo é ter uma certeza'. Obrigada pelo teu sorriso, pelas palavras certas nos momentos mais incertos.

Às minhas companheiras de casa, Ana, Helena e Marília. Obrigada por ao longo deste cinco anos serem o meu refúgio, por serem as minhas 'irmãs', a minha família de Coimbra.

Aos meus Queridos Avós e Tio Tó pelo carinho e tolerância que sempre tiveram comigo.

Aos meus Pais que sempre estiveram comigo, nunca deixando de acreditar em mim. Á minha Mãe, a minha confidente, presente em todos os momentos, torcendo por mim e sempre confiando em mim. Ao meu Pai, um grande Amigo, um extremoso Pai.

Ao meu Irmão, o meu companheiro de todas as horas que me fez ver que com vontade tudo é possível.

Resumo

Neste trabalho foram investigados os efeitos das escorrências de minas de Urânio (i.e. teores elevados de urânio (U), arsénico (As), ferro (Fe), mercúrio (Hg), zinco (Zn)) no processo de decomposição da folhada (*Quercus robur*) e ecologia dos invertebrados *Sericostoma vittatum*. Foi igualmente avaliada a capacidade de acumulação de metais presentes no meio ou fonte alimentar pelos detritos e invertebrados, respectivamente. Não se registaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na perda de massa, resistência foliar ou biomassa fúngica associada às folhas condicionadas em água de referência (Ribeira de Alhões) ou água contaminada (Ribeira da Pantanha) pelas escorrências da mina. Fenómenos de tolerância e/ou adaptação de espécies fúngicas redundantes poderão garantir a funcionalidade e estabilidade do sistema.

No entanto, e apesar da contaminação por metais não parecer afectar o processo de degradação, folhas de carvalho condicionadas em água contaminada foram preteridas ($p < 0,05$) e menos consumidas ($p < 0,05$) pelas larvas de *S. vittatum* em relação a folhas condicionadas no meio de referência. Este comportamento alimentar pode prender-se com a potencial presença de uma comunidade fúngica foliar menos “apetecível” e/ou com a capacidade destes invertebrados detectarem um decréscimo da qualidade alimentar dos detritos promovida por níveis superiores de adsorção e/ou bioacumulação de metais pelas folhas e fungos associados, respectivamente. Em concordância, os detritívoros apresentaram taxas de crescimento inferiores ($p < 0,001$) quando alimentados *ad libitum* com folhas contaminadas ($1,8\% \text{ dia}^{-1}$ vs. $1,77\% \text{ dia}^{-1}$). Esta diferença poderá dever-se a um menor consumo, mas também a consequências fisiológicas promovidas pelos níveis elevados da maioria dos

metais ingeridos e acumulados nos tecidos corporais das larvas alimentadas com folhas contaminadas - As, Hg, U, Zn ($p < 0,001$ para todos os casos).

Considerando que a sensibilidade dos invertebrados à contaminação por metais parece ser mais fiável e consistente que a resposta microbiana sugere a utilização de parâmetros sub-letais como o comportamento alimentar ou as taxas de crescimento de espécies ecologicamente relevantes como ferramenta adicional válida para avaliar a qualidade da água em áreas afectadas pela actividade mineira.

Abstract

In this study we investigated the effects of runoff from uranium mining (i. e. high levels of uranium (U), arsenic (As), iron (Fe), mercury (Hg), zinc (Zn)) and in the process of litter decomposition (*Quercus robur*) and ecology of invertebrates *Sericostoma vittatum*. We also assessed the capacity of accumulation of metals in the environment or food source for invertebrates and detritus, respectively. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the mass loss, leaf resistance or fungal biomass associated with leaves conditioned in reference water (Ribeira of Alhões) or contaminated water (Ribeira of Pantanha) by runoff from mine. Phenomena of tolerance and / or adaptation of fungal species may provide a redundant functionality and stability of the system.

However, although the metal contamination does not seem to affect the degradation process, oak leaves conditioned in contaminated water have been passed over ($p < 0.05$) and consumed less ($p < 0.05$) by the larvae of *S. vittatum* for leaves conditioned in the reference water. This feeding behavior can be due to the potential presence of a less attractive fungal leaf community and / or the ability of invertebrates to detect a decline in food quality of detritus promoted by higher levels of adsorption and / or bioaccumulation of metals by the leaves and fungi, respectively. Therefore, detritivores growth rates lower ($p < 0.001$) when fed *ad libitum* with contaminated leaves ($1.8\% \text{ day}^{-1}$ vs. $1.77\% \text{ day}^{-1}$). This difference may be due to reduced consumption, but also to physiological consequences promoted by high levels of most metals – As, Hg, U, Zn - ingested and accumulated in body tissues of larvae fed on contaminated leaves ($p < 0.001$ for all cases).

When compared, the sensitivity of invertebrates to metal contamination seems to be more reliable and consistent than the microbial response . This suggests the use of sub-lethal parameters such as feeding behavior or growth rates of ecologically relevant species as an additional valid tool to evaluate the water quality in areas affected by mining.

Índice

CAPITULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 “A água é o sangue da terra”	3
1.2 As folhas, fonte de energia por excelência	4
1.3 A decomposição, processo chave em pequenos cursos de água	5
1.4 Os metais pesados, contaminantes ubíquos nos cursos de água	8
1.5 Objectivos	11
CAPITULO 2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Geral	14
2.2 Testes de decomposição.....	15
2.3 Testes com invertebrados.....	17
2.4 Quantificação dos metais.....	19
2.5 Análise estatística	20
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	21
3.1 Características da água.....	23
3.2 Testes de decomposição.....	25

3.3 Testes com invertebrados.....	28
3.4 Quantificação dos metais.....	30
CAPITULO 4. DISCUSSÃO.....	31
CAPITULO 5. REFERÊNCIAS.....	40

CAPITULO 1

- INTRODUÇÃO GERAL -

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 “A água é o sangue da terra”

Uma característica fundamental do planeta Terra é a abundância da água, que cobre cerca de 71% da sua superfície. No entanto, mais de 97% da água do planeta é salgada e menos de 3% é doce. Desta, 77% encontra-se congelada nos círculos polares e, 22% constituem águas subterrâneas. Só uma pequena fracção se encontra facilmente disponível para consumo e está largamente concentrada nos lagos e rios (cerca de 105 000Km³/ 0,3% da água doce) heterogeneamente distribuídos no planeta. De acordo com a FAO, cerca de 1 800 milhões de pessoas vivem em países ou regiões com absoluta escassez de água e cerca de 2/3 da população vivem em condições de stress. Com o crescimento da população e as necessidades cada vez maiores associadas aos chamados “fenómenos da civilização” a já reduzida disponibilidade deste recurso vital tem vindo a diminuir.

O Homem sempre se aproximou dos rios. O rio foi sempre a (quase) certeza da água, a esperança de alimento e, se o engenho e a arte o permitissem, a possibilidade de se transportarem, e de se relacionarem (Saraiva, 1999). As gravuras rupestres de Foz Côa e Mazouco, à beira do Douro, e as do Fratel, à beira do Tejo, são alguns dos testemunhos remotos desta eterna atracção e convívio com os rios (Saraiva, 1999). Foi quase sempre junto ao rio que, com o decorrer dos tempos, o Homem ergueu as suas aldeias, vilas e cidades (Saraiva, 1999). Frequentemente encarados de forma negligente, os sistemas fluviais adquirem hoje o estatuto de um valioso recurso

natural, económico, cultural, estético, científico e educativo (Dudgeon *et al.*, 2005). Os rios e a sua bacia de drenagem são hoje encarados como um todo indissociável, científica (*e.g. River Continuum Concept*, Vannote *et al.*, 1980) e politicamente (ver Directiva Quadro da Água; <http://dqa.inag.pt/>).

Ao longo da sua história, o Homem tem utilizado de forma mais intensiva os rios do que qualquer outro tipo de sistemas naturais (Arthington & Welcomme, 1995). A imensa rede de cursos de água que constituem um sistema fluvial e a íntima relação com a bacia de drenagem torna-os mais vulneráveis e susceptíveis de sofrer ameaças, constituindo portanto, dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (Dudgeon *et al.*, 2005). É actualmente aceite que as maiores perdas em termos de biodiversidade (e funcionalidade; Covich *et al.*, 2004) destes sistemas se devem a modificações no fluxo, invasão por espécies exóticas, degradação e destruição de habitats, sobre-exploração e poluição das águas (*e.g. Dudgeon et al.*, 2005).

1.2 As folhas, fonte de energia por excelência

Os cursos de água são maioritariamente constituídos por pequenos ribeiros que podem compreender cerca de 85% do seu comprimento. Estes ribeiros, localizados a montante do *continuum* fluvial, são geralmente de pequenas dimensões e apresentam uma relação estreita com a bacia de drenagem e, em particular, com a zona ripícola (Allan, 1995). Esta floresta que ladeia estes cursos de água é fonte maioritária de matéria orgânica (isto é, material alóctone) para as cadeias alimentares lócticas. Esta matéria alóctone, largamente constituída por folhas, pode chegar a constituir até cerca de 99%

da energia transformada pelos organismos aquáticos. De facto, estes cursos de água são caracteristicamente heterotróficos devido à limitação da entrada de luz pela copa das árvores e dependem largamente do material foliar como fonte de energia (Vannote *et al.*, 1980 e Abelho, 2001).

Em cursos de água ladeados por caducifólias, o material foliar disponível para o biota entra no rio maioritariamente no Outono. O seu processamento, ou seja, a sua incorporação em matéria viva, ocorre através de um processo fundamental no funcionamento destes ecossistemas designado por decomposição foliar (*e.g.* Gessner *et al.*, 1999).

1.3 A decomposição, processo chave em pequenos cursos de água

A decomposição é um processo ecológico vital em ribeiros de pequenas dimensões levado a cabo sobretudo por fungos, bactérias e invertebrados (Gessner *et al.*, 1999; Hieber & Gessner, 2002) e modelado por vários factores abióticos como a temperatura (Spänhoff & Meyer, 2004; Robinson & Jolidon, 2005) a velocidade da corrente (Ferreira *et al.*, 2006) ou o teor de nutrientes na água (Sridhar & Bärlocher, 2000; Gulis *et al.*, 2006).

A decomposição da matéria orgânica foliar ocorre normalmente em três fases mais ou menos definidas: lixiviação, condicionamento e fragmentação física e biológica (Cummins, 1974). No entanto, e apesar de ser normalmente referida uma sequência cronológica, estas fases podem sobrepor-se no tempo (Gessner *et al.*, 1999).

Lixiviação: Uma vez na água, as folhas provenientes da zona ripícola caem no ribeiro e são imediatamente lixiviadas. Neste processo libertam-se componentes orgânicos solúveis e inorgânicos, tais como, fósforo, potássio, proteínas, aminoácidos e fenóis. Este processo dura maioritariamente entre 24 a 48 horas e determina um rápido decréscimo do peso da folha (que pode atingir valores da ordem dos 40%) (Bärlocher, 1991). Esta fase depende de vários factores, nomeadamente a estrutura química e morfologia foliares e é largamente influenciada por factores do meio.

Condicionamento: O processo de condicionamento é levado a cabo maioritariamente por fungos típicos de cursos de água bem oxigenados, hifomicetes aquáticos, que dão lugar às bactérias em fases mais avançadas da decomposição (Webster & Benfield, 1986; Gessner *et al.*, 1999). Nesta etapa, as folhas, sobretudo as mais recalcitrantes, ficam mais apetecíveis. O incremento do seu valor nutritivo para os invertebrados parece relacionar-se com a adição da biomassa fúngica *per se* e com a sua capacidade imobilizadora do azoto da água. Por outro lado, este grupo promove a digestão enzimática dos compostos recalcitrantes foliares e torna as folhas mais moles facilitando a sua digestão pelos consumidores. As folhas condicionadas são também uma fonte de enzimas digestivas para invertebrados (Suberkropp & Klug, 1980; Bärlocher & Brendelberger, 2004; Graça, 2005; Canhoto & Graça, 2008).

O condicionamento microbiano é considerado um dos factores determinantes da qualidade da folha como alimento para os detritívoros nos

ribeiros (Canhoto & Graça, 2009) e a folha diz-se completamente condicionada quando o seu valor nutritivo é máximo (Boling *et al.*, 1975).

Fragmentação física e biológica: A fragmentação das folhas pode ocorrer como resultado de um desgaste físico ou acção biológica (como na alimentação de alguns invertebrados ou mesmo na construção de casulos). A fragmentação física depende da resistência da folha e de factores abióticos, nomeadamente, velocidade da corrente, turbulência e/ou tipo de substrato (Molinero *et al.*, 1996; Gonçalves *et al.*, 2007).

A fragmentação biológica é largamente promovida por invertebrados trituradores. Este grupo funcional alimentar (Cummins, 1974) alimenta-se de matéria orgânica particulada grosseira (MOPG; $\varnothing > 1\text{mm}$) que converte em matéria orgânica particulada fina (MOPF; $0,45\mu\text{m} < \varnothing < 1\text{mm}$) e matéria orgânica dissolvida (MOD; $\varnothing < 0,45\mu\text{m}$). Os invertebrados deste grupo funcional alimentar são abundantes em ribeiros de baixa ordem (Vannote *et al.*, 1980) e incluem uma vasta gama de insectos (Diptera, Tricoptera, Plecoptera) para além de outros grupos como os crustáceos. As suas densidades tendem a estar correlacionadas com a acumulação de matéria orgânica nos ribeiros quer em termos temporais, quer espaciais (Graça *et al.*, 2001). Este grupo de invertebrados apresenta baixas eficiências na assimilação (Wallace *et al.*, 1982) – cerca de 60% do que come é convertido em fezes - e parece ser responsável por importantes perdas de massa foliar (Chergui & Pattee, 1991; Hieber & Gessner, 2002).

Os invertebrados trituradores, apesar de generalistas, apresentam capacidade discriminativa em relação ao material foliar mais nutritivo (Canhoto

& Graça, 1995; Gonzalez & Graça, 2003, Gulis *et al.*, 2006) e as suas taxas de consumo são fortemente influenciadas pela espécie foliar (e.g. González & Graça, 2003); vários trabalhos demonstram que os detritívoros consomem, crescem e sobrevivem mais quando alimentados com folhas mais suaves, ricas em azoto e fósforo e com menores teores em compostos secundários (Canhoto & Graça, 1999, 2006). Preferem material foliar condicionado ao não condicionado (Graça *et al.*, 2001; Sridhar *et al.*, 2001) podendo mesmo apresentar preferência por material completamente condicionado (Arsuffi & Suberkropp, 1984) e por certas espécies de fungos que colonizam as folhas (Arsuffi & Suberkropp, 1984; Canhoto & Graça, 2009).

Tal como expresso por Gessner e co-autores (1999), a decomposição foliar é um processo chave integrador do que se passa no sistema lótico ao longo do tempo e através da comunidade. Neste processo, o biótico e abiótico interagem de forma muito particular, o que faz com que as taxas de decomposição (Webster & Benfield, 1986) constituam uma ferramenta útil como indicador da integridade funcional e estado ecológico dos cursos de água - ver *RivFunction* (<http://www.ecolab.ups-tlse.fr/rivfunction/menu.html>).

1.4 Os metais pesados, contaminantes ubíquos em cursos de água

Os metais são ubíquos em ecossistemas aquáticos de regiões com historial mineiro (Carlisle & Clements, 2005). Os efeitos das drenagens de minas são importantes mesmo após o encerramento da exploração estando associados a fenómenos de aumento da concentração de metais, a

acidificação da água, deposição de óxidos de metal, como por exemplo, hidróxidos de ferro e aumento da turbidez da água (McKnight & Feder, 1984).

Muitos estudos se têm debruçado sobre o impacto das escorrências mineiras na estrutura ou funcionamento dos sistemas ribeirinhos. Um grande número de trabalhos têm sido dedicados aos efeitos de elementos particulares como zinco, cobre, cádmio, ferro, alumínio, manganésio e/ou ouro (Kiffney & Clements, 1993; Bermingham *et al.*, 1996; Chamier & Tipping, 1997; Hickey & Clements, 1998; Krauss *et al.*, 2001; Niyogi *et al.*, 2002, 2002b; Carlisle & Clements, 2005; Medeiros *et al.*, 2008). No entanto, os resultados, sobretudo em termos do funcionamento do ecossistema, não são consensuais. Muitos apontam para um decréscimo nas taxas de decomposição (Bermingham *et al.*, 1996; Niyogi *et al.*, 2001, 2002); sugerem uma diminuição na biodiversidade, biomassa e actividade fúngica, assim como da respiração microbiana em sistemas afectados (Bermingham *et al.*, 1996; Niyogi *et al.*, 2001, 2002; Sridhar *et al.*, 2001; Niyogi *et al.*, 2002b). No entanto, a presença e actividade de hifomicetes aquáticos em sistemas aquáticos contaminados indicam a possibilidade de alguma tolerância ou adaptação deste grupo a estas condições (Sridhar *et al.*, 2000; Krauss *et al.*, 2003; Pascoal *et al.*, 2005; Braha *et al.*, 2007). De salientar que os fungos possuem a capacidade de isolar, mobilizar ou transformar vários iões (Gadd & Sayer, 2000; Gadd, 2001) controlando a mobilidade biogeoquímica e o comportamento de metais em ambientes aquáticos (Braha *et al.*, 2007). Nakajima & Sakaguchi (1986), por exemplo indicam a capacidade de adsorção, acumulação ou transformação de metais pesados como o urânio e o mercúrio por fungos e microorganismos (*e.g.* Fomina *et al.*, 2007).

Os estudos dos efeitos da presença dos metais nas comunidades de invertebrados apontam também para uma redução na diversidade, densidade e mesmo actividade e/ou fisiologia deste grupo (DeNicola & Kelly, 1988; Forrow & Maltby, 2000; Niyogi *et al.*, 2002b; Soucek *et al.*, 2003). Todos os efeitos dos metais nas comunidades quer fúngica quer de invertebrados vão reflectir-se no processamento foliar (Roussel *et al.*, 2008).

Um dos elementos negligenciado (mas ver Antunes *et al.*, 2007) nos estudos sobre os impactos dos efluentes mineiros na ecologia dos rios tem sido o Urânio (U). No entanto, este metal é um contaminante importante em várias partes do mundo (Winde & Sandham, 2004). O urânio, tal como todos os metais pesados, não é biodegradável e tende a acumular-se na biosfera (Winde & Sandham, 2004) sendo a sua radioactividade um motivo acrescido de preocupação.

Em Portugal, existem cerca de 60 minas abandonadas na sua maioria localizadas no Centro do País (Carvalho *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007), mas muito pouco se sabe sobre os efeitos das suas escorrências (frequentemente também ricas noutros metais como o arsénio) na ecologia dos cursos de água afectados. A sua concentração nas águas no Centro de Portugal pode atingir valores de 1,8mg/L (Antunes *et al.*, 2007), valores com potenciais efeitos nefastos no biota (Sheppard *et al.*, 2005).

1.5 Objectivos

Pretende-se com este trabalho avaliar os efeitos das águas de escorrência de uma mina de Urânio abandonada na

(a) perda de massa de folhas de carvalho (*Quercus robur*), biomassa fúngica (hifomicetes aquáticos) associada e resistência foliar;

(b) ecologia de invertebrados trituradores comuns em ribeiros da zona Centro de Portugal – *Sericostoma vittatum* Rambur. Neste caso, serão realizados testes de consumo, selecção de alimento, crescimento e sobrevivência.

(c) capacidade de acumulação de metais presentes no meio ou fonte alimentar por fungos e invertebrados, respectivamente.

CAPÍTULO 2

- MATERIAL E MÉTODOS -

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Geral

A água utilizada nas experiências foi recolhida num local de referência, Ribeira de Alhões (Cinfães do Douro: 40°30'N, 7°52'W) e numa ribeira contaminada - Ribeira da Pantanha – que recebe as escorrências da mina da Urgeiriça (Canas de Senhorim: 40°59'N, 8°00'W).

A temperatura, pH (Wissenschaftlich Technische Werkstätten 537 pH meter, WTW, Weilheim, Germany) e a condutividade (WTW LF 92 conductivity meter) foram medidos *in situ*. Foi colectada uma amostra da água de cada local para posterior análise química: Na⁺, K⁺, Mg₂⁺, Ca₂⁺, Cl⁻, NO₃⁻, H₂PO₄ e HCO₃⁻ por cromatografia iónica (Dionex DX-120). As concentrações de metais (arsénio (As), cobre, (Cu), ferro (Fe), mercúrio, (Hg), urânio (U) e zinco (Zn)), foram também determinadas por análise fluorométrica usando o "Fluorat-02-2M analyser (Lumex, Rússia).

As folhas usadas nos testes foram folhas de carvalho colectadas do solo da floresta imediatamente após senescência e queda (Dezembro, 2008) em Olo, Amarante, Portugal. Parte das folhas foi utilizada para os testes de decomposição e outra parte, a ser utilizada nos testes com invertebrados, foi condicionada em duas tinas com intenso arejamento. Uma das tinas continha água recolhida no local de referência e a outra água recolhida no local contaminado.

Todos os testes foram realizados sob condições laboratoriais controladas - 12h luz: 12h escuro; 15 °C ± 1 °C.

2.2 Testes de decomposição

Os efeitos da contaminação da água de escorrência mineira na perda de massa foliar foram avaliados cortando 8 conjuntos de 10 pares de discos simétricos ($\varnothing = 12$ mm) das folhas de carvalho recolhidas. Cada grupo de dez discos (um de cada par) foi imediatamente seco na estufa (105°C , 48h) pesado durante 48h, pesado, incinerado a 550°C durante 5h e pesado novamente. Os respectivos grupos de pares foram distribuídos por 8 erlenmeyers de 250ml, com 100 ml de água de cada local previamente filtrada (filtro de fibra de vidro, APFF Millipore); quatro erlenmeyers foram cheios com água de referência (Ribeira de Alhões) e os restantes 4 com água contaminada (Ribeira da Pantanha). Adicionalmente, foram colocados em cada erlenmeyer 6 discos para posterior determinação de teor de ergosterol (3 discos) e penetrometria (3 discos) (ver abaixo). Os erlenmeyers (cada um contendo o total de 16 discos) foram colocados num agitador (100rpm), durante 3 semanas, e a substituição da água ocorreu semanalmente.

Após o período de incubação, todos os discos, foram usados para calcular a percentagem de cinzas e massa seca livre de cinzas remanescentes (MSLCr), foram secos na estufa durante 48 horas a 105°C , pesados, queimados durante 5h a 550°C e pesados de novo. O conjunto de discos para determinação da biomassa fúngica foi congelado a -20°C até ao momento da extracção e os outros foram utilizados para avaliar a penetrometria (ver abaixo).

Biomassa fúngica. Após o período de incubação um conjunto de 3 discos foliares de cada réplica foi utilizado para determinar a concentração de ergosterol como medida de biomassa fúngica (Gessner & Chauvet 1993; Graça *et al.*, 2005). Os discos, após congelamento, foram liofilizados e pesados imediatamente antes da extração. O lípido foi suspenso em 2mL de metanol por aquecimento num forno de microondas (2450 MHz e 750 W) durante 1 minuto no total e extraído com pentano (cerca de 6ml). Os extractos de pentano foram evaporados a seco num banho de areia a 55 ° C e depois a amostra foi dissolvida com 1 ml de metanol. A concentração de ergosterol foi quantificada através de uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna Merck LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100) RP-18, medindo-se em seguida a absorvância a 282 nm (Young, 1995). A quantidade de ergosterol foi convertida em biomassa fúngica usando um factor de conversão de 5,5 ug ergosterol por mg de massa fúngica (Gessner & Chauvet, 1993). Os resultados foram expressos em mg de biomassa fúngica/ g/ MSLCr.

Penetrometria. Três discos de cada uma das réplicas dos dois tratamentos foram utilizados para avaliar a resistência das folhas condicionadas em diferentes águas utilizando um penetrômetro (Graça *et al.*, 2005). Foi pesada a massa necessária (g de água num recipiente) para empurrar uma agulha metálica de 1 milímetro de diâmetro através do disco foliar. Para cada uma das réplicas foram determinados três valores, um em cada disco, evitando as nervuras.

2.3 Testes com invertebrados

O efeito da contaminação da água pela escorrência das minas na qualidade foliar para os invertebrados foi testada realizando testes de consumo, preferência alimentar, crescimento e sobrevivência com larvas de *S. vittatum* às quais foram fornecidas individual (testes de consumo, crescimento e sobrevivência) ou simultaneamente (preferências alimentares) folhas de carvalho, condicionadas em laboratório, em água de referência ou contaminada, durante 3 semanas. Larvas de *S. vittatum* foram colectadas na Ribeira de S. João (40 ° 06'N, 8 ° 14'W), Lousã. Os espécimes foram aclimatizados em condições de laboratório (12h luz: 12h escuro; 15 °C ± 1 °C) durante 15 dias em APW arejada e alimentados *ad libitum* com folhas de amieiro.

Os testes de sobrevivência, consumo, preferência alimentar e crescimento foram realizados em copos de plástico (Ø 70 mm × 85 mm altura) com o fundo coberto com uma fina camada de sedimento do ribeiro previamente queimado (550 °C; 6h) permitindo às larvas enterrarem-se e construir os seus casulos. A cada copo foram adicionados 170ml de água artificial (APW; 58,80 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 24,65 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 12,95 g L⁻¹ de NaHCO₃; 1,15 g L⁻¹ de KCl; Canhoto & Graça, 1999) devidamente arejado com o auxílio de um compressor.

Consumo. Quarenta larvas ($24,1 \pm 0,56$; mg peso seco médio \pm Erro padrão (EP)) foram individualmente distribuídas por copos contendo, cada um, folhas condicionadas em água de referência ($n=20$) ou água contaminada ($n=20$). Grupos simétricos de três discos foram cortados das áreas contíguas de folhas com um cortador, evitando as grandes nervuras das folhas. Os discos controle foram colocados num saco de rede ($4 \times 3,5$ cm, malha 0,5 mm) e pendurados por um clipe ao copo ficando indisponíveis para consumo. O grupo simétrico foi oferecido aos invertebrados. Após 3 dias, o material foliar remanescente de cada copo e as respectivas larvas foram retirados, secos na estufa (105°C , 24h) e pesados.

O consumo (C) foi estimado pela diferença de peso seco foliar (mg) entre o disco controle (P_i) e o disco oferecido correspondente (P_f) e expresso por mg de peso seco de indivíduos (P_t) por dia (d), através da equação $C = (P_i - P_f) / (P_t \times d)$ (Graça *et al.*, 2005).

Preferência alimentar. Neste teste o procedimento foi idêntico ao anterior sendo, no entanto, oferecidos simultaneamente a cada larva ($26,7 \pm 0,49$; mg peso seco médio \pm Erro padrão (EP); $n= 20$), simultaneamente, dois discos: um condicionado em água de referência e outro condicionado em água contaminada. Os discos foram devidamente identificados com alfinetes de cores distintas. Os respectivo controles (pares) serviram para determinar o peso seco inicial dos discos oferecidos aos organismos. Após 3 dias, o material foliar remanescente e as larvas foram retirados, secos na estufa (105°C , 24h) e pesados. O consumo (C) foi estimado pela diferença de peso seco foliar (mg) entre os discos controle (P_i) e os discos oferecidos correspondentes (P_f) e

expresso por mg de peso seco de indivíduos (Pt) por dia (d), através da equação $C = (P_i - P_f) / (P_t \times d)$ (Graça *et al.*, 2005).

Crescimento e sobrevivência. Um total de 40 larvas em estádios larvares precoces ($11,4 \pm 0,74$; mg peso seco médio \pm Erro padrão (EP)) foram individualmente acondicionadas como acima e alimentadas, *ad libitum*, durante 60 dias. A metade (n= 20) foram fornecidas folhas condicionadas em água de referência e à outra metade, folhas condicionadas em água contaminada. O alimento, areia e APW foram substituídos, cada três dias, durante o decorrer da experiência. A sobrevivência dos indivíduos foi registada semanalmente. O peso seco das larvas foi avaliado no início e fim do teste através da equação $\ln P_s = (L_c - 1.664) / 0.599$, em que P_s = peso seco (mg) e L_c = largura máxima anterior do casulo (mm) (Canhoto, 1994).

2.4 Quantificação dos metais

As concentrações de metais na água recolhida, folhas oferecidas aos invertebrados e invertebrados após consumo e crescimento foram avaliadas por análise fluorométrica usando um "Fluorat-02-2M analyser (Lumex, Rússia). As amostras de folhas e tecidos animais foram previamente queimadas durante 8h a 500 °C. As cinzas foram digeridas em ácido nítrico saturado em nitrato alumínio e o conteúdo de urânio extraído com acetato de etilo, de acordo com Paulo *et al.*, (2006) A concentração de urânio foi determinada através da emissão de fluorescência de amostras aquosas de iões de urânio ($\lambda = 530$) (Carnall, 1982).

2.5 Análise estatística

O efeito da contaminação da água na perda de massa foliar, biomassa fúngica, penetrometria, taxas de consumo e crescimento dos invertebrados foi avaliado através do teste t (Zar, 1999). Um teste t emparelhado foi utilizado para comparar as preferências alimentares dos invertebrados. O nível de significância para o teste t foi sempre de $p = 0,05$.

CAPITULO 3

- RESULTADOS -

3. RESULTADOS

3.1 Características da água

A medição dos parâmetros físico-químicos nas águas de referência e contaminada indicou níveis de pH ácidos, condutividade elevada e, em particular, valores significativamente mais elevados (teste t; $p < 0,05$) de arsénico (As), ferro (Fe), mercúrio (Hg), urânio (U) e zinco (Zn) na água contaminada recolhida em relação à água de referência (Tabela I). Apesar disso, os valores de metais registados são inferiores aos valores máximos recomendáveis estabelecidos pela legislação Portuguesa e permitidos em regas agrícolas (MA, 1998; Tabela II). No que diz respeito ao U, esses valores não estão legislados.

Tabela I: Parâmetros físicos e químicos da água do local referência (Ribeira de Alhões) e local contaminado (Ribeira da Pantanha). Os valores correspondem às médias \pm erro padrão.

	Água referência	Água contaminada
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	2,69	184,7
pH	6,44	5,6
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	4,1	10,3
Ca^{2+} (mg L^{-1})	$0,34 \pm 0,000$	$126,2 \pm 0,770$
Cl^{-} (mg L^{-1})	$6,17 \pm 0,167$	$49,32 \pm 0,879$
HCO_3^{-} (mg L^{-1})	$3,89 \pm 0,203$	$5,29 \pm 0,203$
H_2PO_4 (mg L^{-1})	$0,06 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,003$
K^{+} (mg L^{-1})	$0,11 \pm 0,003$	$2,06 \pm 0,000$
Mg^{2+} (mg L^{-1})	$0,17 \pm 0,000$	$20,72 \pm 0,000$
$\text{N}^{-} \text{NO}_3^{-}$ (mg L^{-1})	$0,23 \pm 0,007$	$3,36 \pm 0,015$
Na^{+} (mg L^{-1})	$1,60 \pm 0,003$	$25,02 \pm 0,113$
As ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$0,25 \pm 0,009$	$1,21 \pm 0,025$
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$15,73 \pm 0,422$	$12,19 \pm 0,639$
Fe (mg L^{-1})	$0,042 \pm 0,002$	$0,24 \pm 0,005$
Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$0,24 \pm 0,0105$	$0,64 \pm 0,023$
U ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$0,67 \pm 0,004$	$27,80 \pm 0,415$
Zn (mg L^{-1})	$0,005 \pm 0,0003$	$0,02 \pm 0,002$

Tabela II: Valores máximos permitidos por lei (segundo a Legislação Portuguesa; Ministério do Ambiente Decreto-Lei Nº. 236/98 de 1 de Agosto: <http://www.povt.qren.pt/tempfiles/20080213150349moptc.pdf>) de metais presentes em meio aquático.

Metal	mg/L (ppm)
Arsénio	0,1
Cobre	0,2
Ferro	5
Mercúrio	0,001
Urânio	0,003
Zinco	2

3.2 Testes de decomposição

Não foram encontradas diferenças significativas (teste t: $p= 0,174$) na perda de massa entre as folhas condicionadas em meio de referência e em meio contaminado. As perdas de massa registadas variam entre 6% (meio referência) e 12% (meio contaminada) (Fig. 1).

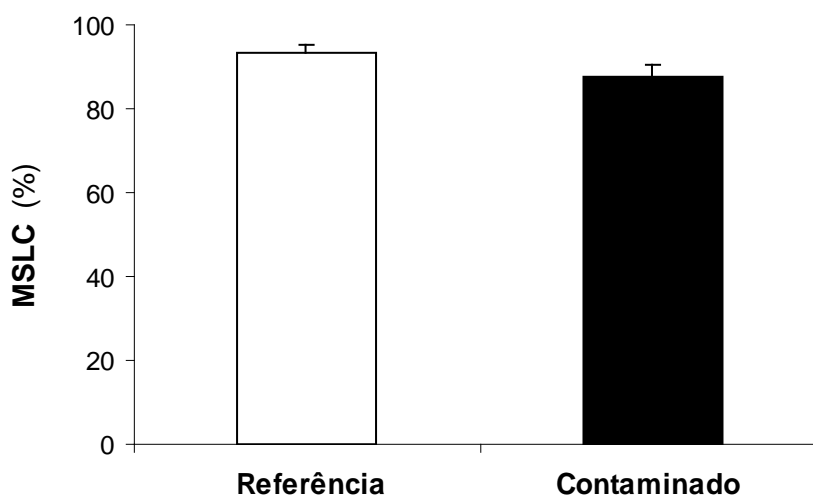


Figura 1: MSLCr (massa seca livre de cinzas) de folhas de *Q. robur* condicionadas em meio de referência (água da Ribeira de Alhões) ou meio contaminado (água da Ribeira da Pantanha), durante três semanas em laboratório. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão.

A biomassa fúngica das folhas condicionadas em água de referência não foi significativamente distinta da observada em folhas condicionadas em água contaminada (teste t: $p= 0,998$). Registou-se um valor médio de biomassa fúngica associada às folhas de carvalho de ambos os tratamentos de $102 \text{ mg/g MSLCr} \pm 14 \text{ EP}$ (Fig. 2).

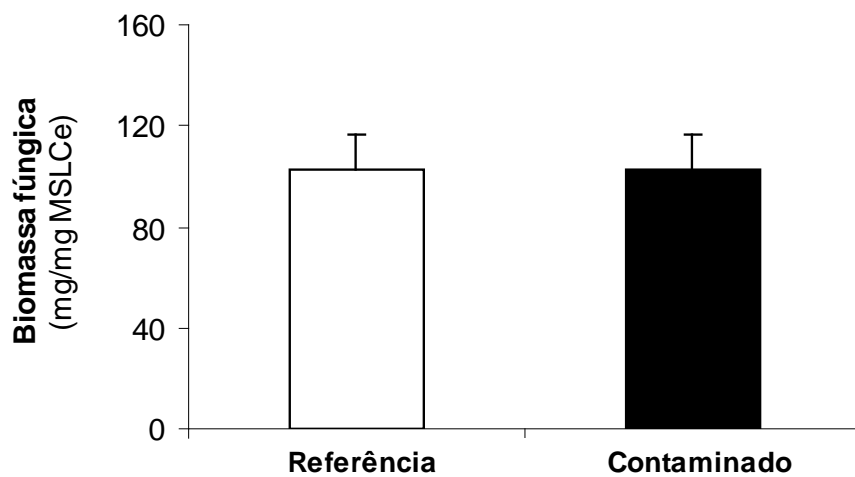


Figura 2: Biomassa fúngica (por g de MSLCr) em folhas de *Q. robur* imersas em meio de referência (água da Ribeira de Alhões) e meio contaminado (água da Ribeira da Pantanha) durante três semanas em laboratório. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão.

Não se observaram diferenças significativas nos valores de penetrometria (*i.e.* resistência foliar) em ambos os tipos de discos (teste t: $p=0,476$; Fig. 3). Os valores registados oscilaram entre as 82g e 88g.

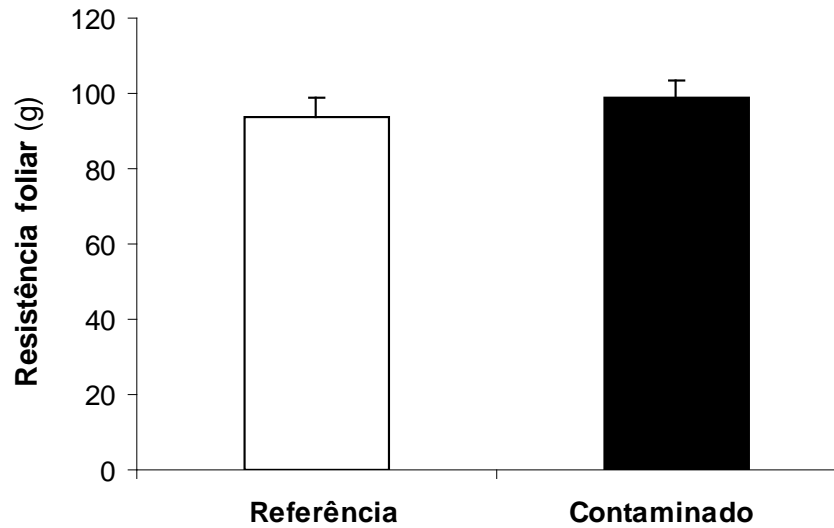


Figura 3: Resistência de folhas de *Q. robur* condicionadas, durante três semanas, em meio de referência (água da Ribeira de Alhões) e meio contaminado (água da Ribeira da Pantanha) em laboratório. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão.

3.3 Testes com invertebrados

Os invertebrados consumiram (teste t $p= 0,0168$; Fig.4), preferiram (teste t; $p = 0,027$; Fig. 5) e cresceram (teste t; $p = 0,0006$) mais quando alimentados com folhas condicionadas em água de referência (taxa de crescimento $\text{dia}^{-1} = 2,33\%$) do que com folhas condicionadas em água contaminada (taxa de crescimento $\text{dia}^{-1} = 1,43\%$). Não se registou mortalidade durante o teste de crescimento.

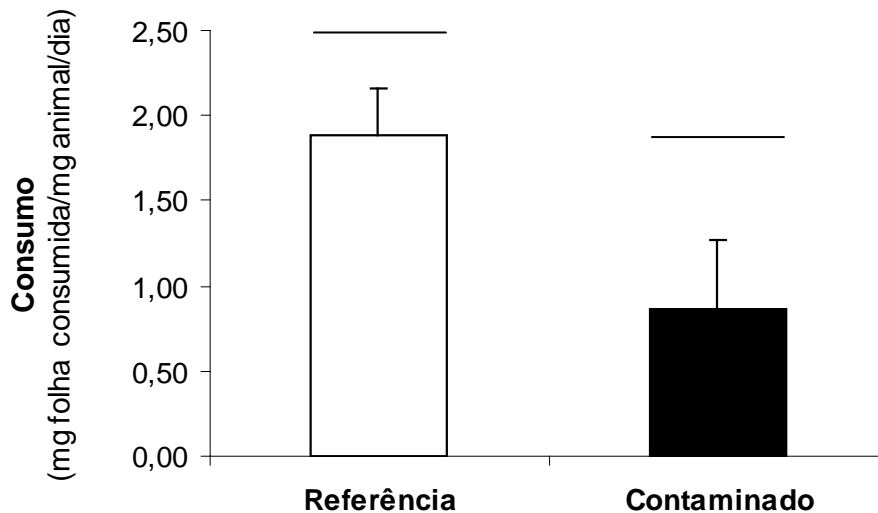


Figura 4: Taxas de consumo médio (mg de folhas consumidas /mg de peso seco larvar/dia \pm erro padrão) de *S. vittatum* ($n= 20$) de folhas colonizadas em meio de referência (água da Ribeira de Alhões) e em meio contaminado (água da Ribeira da Pantanha) em laboratório. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão. Diferenças estatísticas entre médias estão assinaladas por linhas distintas ($p < 0,05$).

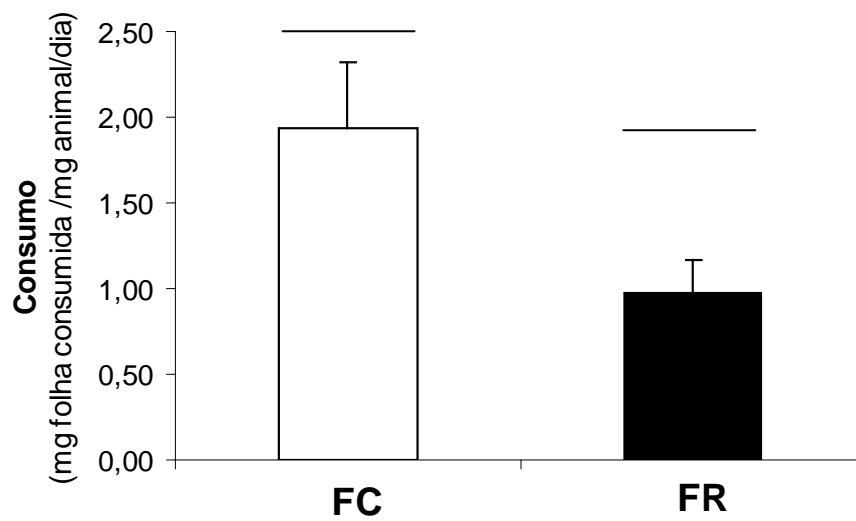


Figura 5: Preferências alimentares de *larvas de S. vitatum* (n= 20) alimentadas simultaneamente com folhas condicionadas em meio de referência (FR) (água da ribeira de Alhões) e em meio contaminado (FC) (água da ribeira da Pantanha) em laboratório. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão. Diferenças estatísticas entre médias estão assinadas por linhas distintas ($p < 0,05$).

3.4 Quantificação dos metais pesados

Foi feita a quantificação de metais das folhas condicionadas e larvas após o término do teste de crescimento e foram encontradas diferenças significativas (teste t; $p < 0,05$) nas concentrações de metais das folhas expostas a água do local referência e água do local contaminado. Verifica-se uma bioacumulação de todos os metais nas larvas alimentadas com os dois tipos de folhas não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos, apenas no caso do Cu (Tabela III).

Tabela III: Concentração de metais nas folhas condicionadas em água proveniente do local de referência e do local contaminado, e larvas alimentadas com essas folhas. Os dados correspondem a médias \pm erro padrão.

Material	Água colectada	As ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Cu (mg Kg^{-1})	Fe (mg Kg^{-1})	Hg ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	U (mg Kg^{-1})	Zn (mg Kg^{-1})
Folhas	Referência	846 $\pm 5,28$	7,31 $\pm 0,03$	78,86 $\pm 1,37$	52 $\pm 3,79$	0,50 $\pm 0,01$	30,27 $\pm 1,81$
Folhas	Contaminada	4836 $\pm 58,13$	7,55 $\pm 0,25$	62,34 $\pm 2,12$	153 $\pm 7,69$	17,80 $\pm 0,21$	37,91 $\pm 1,44$
Larvas	Referência	216 $\pm 5,21$	58,18 $\pm 0,55$	1114,78 $\pm 50,15$	<250 $\pm 0,00$	2,52 \pm 0,02	154,09 $\pm 2,44$
Larvas	Contaminada	804 $\pm 2,54$	55,16 $\pm 1,18$	809,61 $\pm 5,21$	1955 $\pm 45,76$	6,62 $\pm 0,06$	196,62 $\pm 1,79$

CAPITULO 4

- DISCUSSÃO -

4. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm incidido sobre a problemática das escorrências mineiras na estrutura e/ou funcionamento dos sistemas ribeirinhos um pouco por todo o mundo (Birmingham *et al.*, 1996, Niyogi *et al.*, 2003, Braha *et al.*, 2007). Em comparação com os vários contaminantes, os efeitos da contaminação da água por U são pouco estudados e a sua importância ignorada em termos de legislação nacional. Este trabalho pretendeu contribuir para preencher essa lacuna; as águas de escorrência utilizadas nos testes (Ribeira da Pantanha) foram recolhidas numa área que se insere numa das regiões do País onde se verificaram das maiores concentrações de metais pesados como o Urânio (JEN, 1964). Neste trabalho foram registados valores de $27 \mu\text{g U L}^{-1}$ enquanto, em trabalhos anteriores, na mesma área, os teores de U atingiram $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Antunes *et al.*, 2007). Estas concentrações *per se* são consideradas como prejudiciais para as comunidades de água doce por Sheppard *et al.*, (2005); estes autores apontam $5 \mu\text{g U L}^{-1}$ como limite máximo previsível de ausência de toxicidade para plantas e invertebrados de águas doces. No entanto, tal como tem vindo a ser referido em muitos trabalhos e ficou patente nesta investigação, a contaminação com U é frequentemente concomitante com a presença no meio de misturas complexas de outros metais cujas interações podem determinar efeitos antagonistas ou sinérgicos sobre o biota. Os estudos sobre os efeitos das actividades mineiras uraníferas deverão, portanto, considerar o meio como um todo sob pena de não serem realistas.

Neste trabalho, não se observaram diferenças significativas na perda de massa da folhada nas folhas condicionadas em água do local contaminado ou água do local referência. O mesmo aconteceu com a biomassa fúngica e, como expectável, resistência foliar. De facto, a capacidade degradativa química e mecânica dos compostos estruturais foliares promovida pela colonização dos hifomicetes aquáticos determina uma redução da resistência foliar (Suberkropp & Klug, 1980; Niyogi *et al.*, 2003). Uma biomassa fúngica foliar semelhante poderá justificar, portanto, uma perda de resistência semelhante. Alguns trabalhos referem mesmo a relação entre a dureza da folha e a sua taxa de degradação (Quinn *et al.*, 2000), tendo mesmo sido sugerida a utilização desta metodologia como indicador fiável da degradação microbiana (Niyogi *et al.*, 2003).

A ausência de diferenças significativas entre tratamentos nos parâmetros perda de massa e biomassa fúngica está de acordo com resultados obtidos por outros autores (e.g. Barnden & Harding, 2005). Pascoal *et al.* (2005) por exemplo, num estudo num curso de água rico em metais pesados observaram que nem as taxas de decomposição foliar, nem a biomassa fúngica foram afectadas pela presença de metais em detrimento de parâmetros como a diversidade e esporulação que sofreram alterações significativas. A justificação apresentada prende-se com a possibilidade de existir alguma redundância fúngica, ou seja, quando sujeitas a stress (neste caso promovido pela presença de metais pesados), espécies tolerantes aumentam a sua biomassa compensando a perda das espécies mais sensíveis; logo, os parâmetros taxa de decomposição foliar e a biomassa fúngica não sofrem modificações detectáveis (Pascoal *et al.*, 2005). De facto, é possível que as espécies

presentes na água contaminada se tenham tornado tolerantes ou que as espécies mais sensíveis tenham sido substituídas pelas espécies mais adaptadas garantindo a funcionalidade e estabilidade do ecossistema (Braha *et al.*, 2007; Pascoal *et al.*, 2005). Esta estabilidade pode implicar que espécies sensíveis e tolerantes tenham funções similares e redundantes (Lawton *et al.*, 1994; Frost *et al.*, 1995; Pratt & Cairns, 1996; Pascoal *et al.*, 2005). De acordo com Niyogi *et al.*, 2002 só um grau de stress muito elevado poderá afectar a biomassa das comunidades aquáticas e as funções do ecossistema. Os presentes resultados confirmam a já referenciada tolerância dos hifomicetes aquáticos à contaminação por metais pesados e sugerem que os níveis de acidez do meio contaminado também não afectaram o processamento foliar microbiano (Abel & Bärlocher, 1984; Krauss *et al.*, 2001). De facto, valores superiores de metais têm sido referidos como geradores de respostas negativas em parâmetros microbianos - As $>13\text{mg.L}^{-1}$ (Sridhar *et al.*, 2001); Zn $> 0,98\text{mg.L}^{-1}$ (Duarte *et al.*, 2004); Cu = $16,17\text{mg.L}^{-1}$, Mn = $13,67\text{mg.L}^{-1}$ e Zn = $16,05\text{mg.L}^{-1}$ (Sridhar *et al.*, 2005); U = $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Ferreira *et al.*, em preparação). Neste trabalho, os valores de perda de massa observados e biomassa fúngica nos dois tratamentos encontram-se entre os valores registados em trabalhos previamente publicados (Pascoal *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). No entanto é preciso salientar que os resultados não são consensuais e que vários autores sugerem que a poluição promovida pelas minas de drenagem tem um efeito negativo sobre a comunidade de hifomicetes aquáticos dos ribeiros afectando não só a sua reprodução e diversidade mas também a sua biomassa (Sridhar *et al.*, 2005; Lecerf & Chauvet, 2008). Os efeitos da presença de metais na esporulação não foram analisados neste

estudo. Sabe-se, no entanto, que as escorrências mineiras (devido a metais e/ou acidez do meio) podem inibir (Sridhar *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2008), estimular (Niyogi *et al.*, 2002c; Roussel *et al.*, 2008) ou não afectar a produção de conídias. Esta divergência poderá dever-se não só às condições ambientais específicas de cada estudo mas também à metodologia frequentemente adoptada – esporulação- em detrimento de técnicas moleculares complementares e, eventualmente, mais fiáveis para a avaliação da diversidade fúngica (Nikolcheva *et al.*, 2003).

É geralmente reconhecido que o condicionamento foliar estimula o consumo pelos invertebrados (Canhoto & Graça, 2009). Considerando que a contaminação da água não afecta os parâmetros microbianos testados, os valores de consumo e crescimento superiores das larvas alimentadas com folhas condicionadas em água de referência e a discriminação positiva destas folhas em testes de preferência alimentar levam-nos a crer que a qualidade foliar é afectada pelos metais presentes na água, mesmo considerando que as folhas contaminadas apresentam teores de N e P superiores (não publicado). As larvas de *S. vittatum* parecem ser capazes de detectar e ser afectadas na sua performance por este decréscimo de qualidade. Comportamento semelhante foi registado em *Echinogammarus meridionalis* (Macedo-Sousa *et al.*, 2007), *Atyaephyra desmarestii* (Pestana *et al.*, 2007) e *Allogamus ligonifer* (Medeiros *et al.*, 2008) face a folhas condicionadas em meios ricos em metais. A alteração de parâmetros da história da vida dos invertebrados pode estar ligada a uma capacidade de detecção de metais adsorvidos à folha, incorporados pelos fungos, alterações na diversidade e/ou fisiologia fúngicas

promovidas pela contaminação e/ou a uma alteração da composição da comunidade fúngica. Muitos trabalhos apontam para a capacidade de adsorção, bioacumulação e transformação de alguns metais pesados por microorganismos e, em particular, por hifomicetes aquáticos (Peterson *et al.*, 2001). O papel biorremediador dos hifomicetes aquáticos tem mesmo vindo a ser sugerido em estudos realizados em sistemas lóticos (e.g. , Krauss *et al.*, 2001, 2003; Ferreira *et al.*, em preparação). Por outro lado, é também reconhecida a capacidade dos trituradores detectarem e preferirem determinadas espécies de hifomicetes aquáticos (Canhoto & Graça, 2009).

O consumo continuado de folhas condicionadas em meio contaminado não afectou a sobrevivência de larvas de *S. vittatum* durante o período de crescimento - 60 dias. No entanto, ocorreu uma diminuição da taxa de crescimento que poderá ser devida a um menor consumo mas que parece ser concomitante com uma maior bioacumulação de metais adquiridos, neste caso, por ingestão. A confirmar-se esta relação, os efeitos nefastos na produção secundária e funcionamento do curso de água são previsíveis. É, aliás, geralmente aceite que as águas de drenagem, ricas em metais pesados, afectam a densidade e riqueza dos invertebrados e a estrutura da comunidade (DeNicola & Stapleton, 2000; Soucek *et al.*, 2003; Niyogi *et al.*, 2002b).

S. vittatum parece partilhar com espécies de diferentes grupos taxonómicos (e.g. *Heptagenia sulphurea*, *Physa fontinalis*, *Gammarus fossarum*, *Niphargus rhenorhodanensis*, *Asellus aquaticus* ou *Hydropsiche pellucidula*; Norwood *et al.*, 2006) a capacidade de bioacumular (e eventualmente depurar; Cu?) metais. No entanto, esta capacidade de bioacumulação não é generalizada nos invertebrados aquáticos e apresenta

padrões específicos para cada espécie em termos de dinâmica de acumulação e tecido afectado (e.g. Norwood *et al.*, 2007). De referir, no entanto, que em ambiente natural, o aumento de teor de metais corporal poderá resultar não só da ingestão de folhas enriquecidas em metais após imersão, como de folhas provenientes de árvores ripícolas de ribeiros afectados, mais ricas em metais (Pontinha, 2008), da água do ribeiro ingerida ou da adsorção ao corpo do animal (Harding, 2005).

É actualmente aceite que o processo da decomposição foliar é um parâmetro válido para avaliar a integridade funcional dos ribeiros ao nível do ecossistema (Gessner & Chauvet, 2002). De acordo com os presentes resultados, os efluentes de U parecem poder afectar o funcionamento do ribeiro não tanto através da sua acção na comunidade microbiana mas através dos seus efeitos na ecologia dos invertebrados, eles importantes no processamento da matéria. À semelhança de outros trabalhos, a sensibilidade dos invertebrados à contaminação por metais parece, de facto, ser mais fiável e consistente que a resposta microbiana (e.g. Chaffin *et al.*, 2005). Sugere-se, por isso, utilização do comportamento alimentar (primeira linha de resposta face a perturbações ambientais; McLoughlin *et al.*, 2000) de espécies ecologicamente relevantes como ferramenta adicional válida para avaliar a qualidade da água; respostas fisiológicas individuais são facilmente relacionadas com potenciais efeitos ao nível das populações e comunidades (Maltby *et al.*, 2000).

Muito há ainda a fazer para avaliar, de forma completa, os efeitos das escorrências das minas de U na estrutura e funcionamento dos cursos de água. Sob as características modeladoras da água (dureza, pH, ...), a elevada mobilidade e solubilidade do U, a presença comum de metais como o As, Ra ou Hg nas escorrências uraníferas e sua toxicidade radiológica fazem das águas que drenam as explorações uraníferas cocktails letais para o biota e um perigo para o Homem. É pois necessário criar e usar ferramentas fidedignas para criar regulamentação e implementar medidas de mitigação protectoras das comunidades de água doce e da saúde pública.

CAPITULO 5
- REFERÊNCIAS -

5. REFERÊNCIAS

- Abel, T. H. & Bärlocher, F., (1984). Effects of cadmium on aquatic hyphomycetes. – *Applied Environmental Microbiology*. 48: 245-251.
- Abelho, M., (2001). From litterfall to breakdown in streams: a review. *The Scientific World*, 1: 656-680.
- Allan, J. D., (1995). *Stream ecology, structure and function of running waters*. Chapman & Hall, London.
- Antunes S.C., Figueiredo, D.R., Marques, S. M., Castro, B. B., Pereira, F. & Gonçalves, F., (2007). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment*, 374: 252-259.
- Arsuffi, T. L. & Suberkropp, K., (1984). Leaf processing capabilities of aquatic hyphomycetes: interspecific differences and influence on shredder feeding preferences. *Oikos*, 42: 144-154.
- Arthington, A. H. & Welcomme, R. L., (1995). The condition of large river systems of the world. In *Proceedings of the World Fisheries Congress*. (Ed. C. W. Voitlander) pp. 44-75. Oxford and IBH Publishing Co Pty Ltd.. New Delhi.
- Bärlocher, F., (1991). Intraspecific Hyphal Interactions among Aquatic Hyphomycetes. *Mycologia*, 83: 82-88.
- Bärlocher, F. & Brendelberger, H., (2004). Clearance of aquatic hyphomycetes spores by a benthic suspension feeder. *Limnology Oceanographic*, 49: 2292–2296.

- Barnden, A. R. & Harding, J. S., (2005). Shredders and leaf breakdown in streams polluted by coal mining in the South Island, New Zealand. *New Zealand Natural Sciences* 30: 35-48.
- Bermingham, S., Maltby, L. & Cooke, R. C., (1996). Effects of a coal mine effluent on Aquatic Hyphomycetes: I. Field study. *The Journal of Applied Ecology*, 33: 1311-1321.
- Boling, R. H., Googman, E. D., Van Sickle, J. A., Zimmer, J.O., Cummins, K. W., Petersen R. C. & Reice S. R., (1975). Toward a model of detritus processing in a woodland stream. *Ecology*, 56: 141–151.
- 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: 93-105.
- Canhoto C., (1994). A decomposição e utilização das folhas de *Eucalyptus globulus* como fonte alimentar por detritívoros aquáticos. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Canhoto, C. & Graça, M. A. S., (1995). Food value of introduced eucalypt leaves for a Mediterranean stream detritivore: *Tipula lateralis*. *Freshwater Biology*, 34: 209–214.
- Canhoto, C. & Graça, M. A. S., (1999). Leaf barriers to fungal colonization and shredders (*Tipula lateralis*) consumption of decomposing *Eucalyptus globulus*. *Microbial Ecology*, 37: 163–172.
- Canhoto, C. & Graça, M. A. S., (2006). Digestive tract and leaf processing capacity of the stream invertebrate *Tipula lateralis*. *Canadian Journal of Zoology*, 84: 1087–1095.

- Canhoto, C. & Graça, M. A. S., (2008). Interactions between fungi and stream invertebrates: back to the future. In: Novel Techniques and Ideas in Mycology (eds. S. Sridhar, F. Bärlocher, & K.D. Hyde). Fungal Diversity Research Series 20: Hong Kong University Press.
- Canhoto, C. e Graça, M. A. S., (2009). Interactions between fungi and stream invertebrates. *In*: Sridhar KR, Bärlocher F and Hyde KD (eds). Novel Ideas in Mycology. Fungal Diversity Research Series, University of Hong Kong. In press.
- Carlisle, D. M. & Clements, W. H., (2005). Leaf litter breakdown, microbial respiration and shredder production in metal-polluted streams. *Freshwater Biology*, 50: 380-390.
- Carnall, W. T., (1982). Uranium-Spectroscopy, *Gmelin Handbuch Anorganische Chemie*, 85: 175.
- Carvalho, F. P., Oliveira, J. M., Madruga, M. J., Lopes, I., Líbano, A. & Machado, L., (2006). Contamination of hydrographical basins in uranium mining areas of Portugal. In: Merkel, B. J., Hasche-Berger, A. (Eds). *Uranium in the Environment: Mining Impacts and consequences*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 691-702.
- Chaffin, J. L., Valett, H. M. & Webster, J. R., (2005). Influence of elevated As on leaf breakdown in an Appalachian headwater stream of North America. *Benthological Society*, 24: 553-568.
- Chamier, A.-C. & Tipping, E., (1997). Effects of aluminium in acid streams on growth and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Environmental Pollution*, 96: 289-298.
- Chergui, H. & Pattee, E., (1991). An experimental study of the breakdown of submerged leaves by hyphomycetes and invertebrates in Morocco. *Freshwater Biology*, 26: 97-110.

- Covich, A. P., Ewel, K. C., Hall, R. O., Giller, P. E., Goedkoop, W. e Merritt, D. M., (2004). Ecosystem services provided by freshwater benthos. In *Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in Soil and Sediments* (ed. D. H. Wall), Island Press, Washington D.C., U.S.A. 45–72.
- Cummins, K. W., (1974). Structure and function of stream ecosystems. *Bioscience*, 24: 631–641.
- DeNicola, D. M. & Stapleton, M. G., (2000). Recovery of streams following passive treatment for acid mine drainage. – *Verh International Verein Limnology* 27: 3034-3039.
- Duarte, S., Pascoal, C. & Cássia, F., (2004). Effects of zinc n leaf decomposition in streams: studies in microcosm. *Microbial Ecology*, 48: 366-374.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A., Soto, D., Stiassny, M. L. J. & Sullivan, C. A., (2005). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biology Review*, 81: 163–182.
- Fernandes, I., Duarte, S., Cássio, F., & Pascoal, C., (2009). Mixtures of zinc and phosphate affect leaf litter decomposition by aquatic fungi in streams. *Science of the Total Environmental*.
- Ferreira, V., Graça, M. A. S., Lima, J. L. M. P. & Gomes, R. (2006). Role of physical fragmentation and invertebrate activity in the breakdown rate of leaves. *Archives Hydrobiology*, 165: 493–513.
- Fomina, M., Charnock, J. M., Hillier, S., Alvarez, R. & Gadd, G. M., (2007) Fungal transformations of uranium oxides. *Environmental Microbiology*, 9: 1696–1710.

- Forrow, D. M. & Maltby, L., (2000). Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2100-2106.
- Frost, T. M., Carpenter, S. R., Ives, A. R. & Kratz, T. K., (1995). Species compensation and complementarity in ecosystem function. In: Jones C. G., Lawton, J. H., editors. *Linking species and ecosystems*. New York: Chapman & Hall. 224-239.
- Gadd, G. M. & Sayer, G. M., (2000). Fungal transformation of metals and metalloids. In: *Environmental Microbe – Metal Interactions*, edition D. R. Lovley, Washington D. C.: American Society for Microbiology. 237-256.
- Gadd, G. M., (2001). *Fungi in Bioremediation – Volume 23 of British Mycological Society symposium series*. Cambridge University Press.
- Gessner, M. O. & Chauvet, E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 502-507.
- Gessner, M. O., Chauvet, E. & Dobson, M., (1999). A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*, 85: 377-384.
- Gessner, M.O. & Chauvet, E., (2002). A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Application*, 12: 198-510.
- Gonçalves, A. L., Gama, A. M., Ferreira, V., Graça, M. A. S. & Canhoto, C. (2007). The breakdown of Blue Gum (*Eucalyptus globulus* Labill) bark in a Portuguese stream. *Fundamental and Applied Limnology/Archive für Hydrobiologie*, 168: 307–315.

- González, J. M. & Graça, M. A. S. (2003). Influence of detritus on the structure of the invertebrate community in a small Portuguese stream. *International Review of Hydrobiology*, 90: 534–545.
- Graça, M. A. S., Cressa, C., Gessner, M. O., Feio, M. J., Callies, K. A. & Barrios, C., (2001). Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biology*, 46: 947–957.
- Graça, M. A. S., (2005). Allochthonous organic matter as a food resource for aquatic invertebrates in forested streams. Adolfo Cordero Rivera (ed). *Forests and Dragonflies. Fourth WDA International Symposium on Odonatology*. Pontevedra (Spain). July 2005. 37-47.
- Graça, M. A. S., Bärlocher, F. & Gessner, M. O. (2005). *Methods to study litter decomposition. A practical guide*. Springer, the Netherlands.
- Gulis V., Ferreira, V. & Graça, M. A. S. (2006). Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshwater Biology*, 51: 1655–1669.
- Harding, J. S., (2005). Impacts of metals and mining on streams communities. In 'Metal Contaminants in New Zealand'. (Eds T. A. Moore, A. Black, A. A. Centeno, J. S. Harding and D. A. Trumm). (Caxton Press, Christchurch). 343-357.
- Hickey, C.W. & Clements, W. H., (1998). Effects of heavy metals on benthic macroinvertebrate communities in New Zealand streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 2338-2346.
- Hieber, M. & Gessner, M. O., (2002). Contribution of stream detritivores, fungi and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology*, 84: 1026-1038.

- Kiffney, P.M. & Clements, W. H., (1993). Bioaccumulation of heavy metals by benthic organisms at the Arkansas River, Colorado. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1507-1517.
- 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., Sridhar, K. R., Jung, K., Wennrich, R., Ehrman, J. & Bärlocher, F., (2003). Aquatic hyphomycetes in polluted groundwater habitats of central Germany. *Microbial Ecology*, 45: 329-339.
- Lawton, J. H. & Brown, V. K., (1994). Redundancy in ecosystems. In: Schulze, E-D. & Monkey, H. A. (editions): *Biodiversity and ecosystem function*. Springer-Verlag, Berlin. 255-270.
- Lecerf, A. & Chauvet, E., (2008). Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshwater Biology* doi: 10.1111/j.1365-2427.2008.01986.x.
- Maltby, L., Clayton, S. A., Yu, H. X., McLoughlin, N., Wood, R. M. & Yin, D. Q., (2000). Using single-species toxicity tests, community-level responses and toxicity identification evaluation to investigate effluent impacts. *Environmental toxicology and chemistry*, 19: 151-157.
- McKnight, D. M. e Feder, G. L., (1984); The ecological effect of acid conditions and precipitation of hydrous metal oxides in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia*, 119: 129-138.
- McLoughlin, P. D., Ferguson, S. H. & Messier, F., (2000). Intraspecific variation in home range overlap with habitat quality: a comparison among brown bear populations. *Evolutionary Ecology*, 14: 39-60.

- Medeiros, A. O., Rocha, P., Rosa, C. A. & Graça, M. A. S., (2008). Litter breakdown in a stream affected by drainage from a gold mine. *Hydrobiologia*, volume 171.
- Molinero, J., Pozo, J. & Gonzalez, E., (1996). Litter breakdown in streams of the Āguera catchment: influence of dissolved nutrients and land use. *Freshwater Biology*, 36: 745–756.
- Nakajima, A. & Sakaguchi, T., (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, 24: 59-64.
- Nikolcheva, L. C, Cockshutt, A. M. & Bärlocher, F., (2003). Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2548-2554.
- Niyogi, D. V., McKnight, D. M. & Lewis Jr., W. M., (2002). Effects of mine drainage on breakdown of aspen litter in mountain streams. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 2: 329-341.
- Niyogi, D. K., Lewis, W. M. & McKnight, D. M., (2002b). Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems*, 5: 554-567.
- Niyogi, D. K., McKnight, D. M. & Lewis Jr., W. M., (2002c). Fungal communities and biomass in mountain streams affected by mine drainage. *Archive Hydrobiology*. 2: 255-271.
- Niyogi, D. K., Simon, K. S. & Townsend, C. R., (2003). Breakdown of tussock grass in streams along a gradient of agricultural development in New Zeland. *Freshwater Biology*, 48: 1698-1708.

- Norwood, W. P, Borgmann, U. & Dixon, D. G., (2007). Interactive effects of metals in mixtures on bioaccumulation in the amphipod *Hyaella azteca*. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 84:255-67.
- Pascoal, C., Cássio, F. & Ludmila, M., (2005). Anthropogenic stress may affect aquatic hyphomycete diversity more than leaf decomposition in a low-order stream. *Archiv für Hydrobiologie*, 162: 481-496.
- Paulo C., Pratas, J. & Rodrigues, N. (2006). Rhizofiltration of uranium from contaminated mine water. *Metal ions in Biology and Medicine*, 9: 187-192.
- Pestana, J. L. T., Ré, A., Nogueira, A. J. A. & Soares, A. M. V. M., (2007). Effects of cadmium and zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmaretii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere* 68: 1556-1562.
- Peterson, B. J., Wollheim, W. M., Mulholland P.J., Webster J.R., Meyer J.L., Tank J.L., Marti E., Bowden W.B., Valett H.M., Hershey A.E., McDowell W.B., Dodds W.K, Hamilton S.K., Gregory S. & Morrall D.J. (2001). Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams. *Science* 292: 86–90.
- Pontinha, D., (2008). Efeitos da contaminação dos ribeiros por U na decomposição foliar e ecologia dos invertebrados *Sericostoma vittatum* e *Physa acuta*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Pratt, J. R. & Cairns Jr., J., (1996). *Ecotoxicology and the redundancy problem: understanding effects on community structure and function*. By CRC Press, Inc.

- Quinn, J. M., Smith, B. J., Burrell, G. P. & Parkyn, S. M., (2000). Leaf litter characteristics after colonization by stream invertebrates and growth of *Olinga fededayi* (Trichoptera: Conoesicidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34: 273-287.
- Robinson, C. T. & Jolidon, C., (2005). Leaf breakdown and the ecosystem functioning of alpine streams. *Journal of North American Benthological Society*, 24: 495–507.
- Roussel, H., Chauvet, E. & Bonzom, J.M., (2008). Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 637-644.
- Saraiva, M. G. A. N., (1999). *Textos universitários de ciências sociais e humanas*. Fundação Calouste Gulbenkian. Ministério da Ciência e Tecnologia.
- Sheppard, S. C., Sheppard, M. I., Gallerand, M. O., Sanipelli, B., (2005) Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79: 55–83.
- Soucek, P., Petrik, P., Vágner, M., Tykva, R., Václav, P., Petrová, S. & Vanek, T., (2003). Botanical survey and screening of plant species which accumulate ²²⁶Ra from contaminated soil of uranium waste depot. *European Journal of Soil Biology*, 43: 251-261.
- Spänhoff, B. & Meyer, E. I., (2004). Breakdown rates of wood in streams. *Journal of North American Benthological Society*, 23: 189–197.
- Sridhar, K. R., Krauss, G., Bärlocher, F., Wennrich, R. & Krauss, J., (2000). Fungal diversity in heavy metal polluted waters in Central Germany. – *Fungal Diversity*, 5: 119–129.

- Sridhar K. R., Bärlocher, F., Ravijara N. S., Wennrich, R., Baumbach, R. & Krauss, G. J., (2001). Decomposition of alder leaves in two heavy metal-polluted streams in central Germany. *Aquatic Microbial Ecology*, 26: 73–80.
- Sridhar, K. R., 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.
- Suberkropp, K. & Klug, M.J., (1980). The maceration of deciduous leaf litter by aquatic hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 58: 1025–1031.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R. & Cushing, C. E., (1980). The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 130-137.
- Wallace, J. B., Webster, J. R. & Cuffney, T. F., (1982). Stream detritus dynamics: regulation by invertebrate consumers. *Oecologia*, 53: 197–200.
- Webster, J. R. & Benfield, E. F., (1986). Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17: 567–594.
- Winde, F. & Sandham, L.A., (2004); Uranium pollution of South African streams – An overview of the situation in gold mining areas of the Witwatersrand; *Geojournal*, 61: 131-19.
- Young, J. C., (1995). Microwave-Assisted Extraction of the Fungal Metabolite Ergosterol and Total Fatty Acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2904-2910.
- Zar J. H., (1999): *Biostatistical Analysis* 4th edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. NJ.