

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

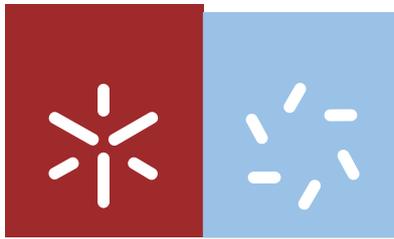
Amaro António Magalhães Rodrigues

**Produção de documentários em vídeo  
para o ensino experimental da Ecologia**

Amaro António Magalhães Rodrigues **Produção de documentários em vídeo para o ensino experimental da Ecologia**

UMinho | 2012

Outubro de 2012



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Amaro António Magalhães Rodrigues

**Produção de documentários em vídeo  
para o ensino experimental da Ecologia**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Ecologia

Trabalho realizado sob a orientação da  
**Prof. Dra. Fernanda Cássio**  
e da  
**Prof. Dra. Cláudia Pascoal**

Outubro de 2012

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

Universidade do Minho, Outubro de 2012

---

(Amaro António Magalhães Rodrigues)

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Fernanda Cássio, e Professora Doutora Cláudia Pascoal, pelo incentivo, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade e dinamismo científico inculcado na realização deste projeto de Mestrado e pela amizade.

À Professora Doutora Margarida Casal, pela motivação que sempre me inculciu no sentido da realização do Mestrado e pela amizade.

À Doutora Célia Pais, pelo apoio enquanto Diretora do Departamento de Biologia e pela amizade.

À Sofia Duarte, mais uma vez, o apoio indispensável para a concretização deste projeto, pela eterna amizade e pela colaboração.

Ao Paulo Geraldes, Arunava Pradhan, pelo apoio e colaboração imprescindíveis.

À Isabel Fernandes, Daniela Batista e Diana Barros, pela colaboração.

Por fim um muito sentido agradecimento à minha família – à minha mulher Paula e aos meus filhos pelo vosso apoio e compreensão – e à minha mãe.

Ao projeto “Desenvolvimento de técnicas moleculares para aceder a diversidade e a actividade de fungos em ecossistemas de água doce – FunDiver” (PTDC/AAC-AMB/113746/2009).

Ao projeto “Impacts of metal nanoparticles to aquatic ecosystems: from community responses to cellular targets – Nanoecotox” (PTDC/AAC-121650/2010).

## **Resumo**

O audiovisual assume uma grande importância na transmissão da informação na sociedade atual, em especial entre os jovens. A linguagem visual tem um alcance maior na sociedade, devido ao imediatismo da compreensão das imagens e, por isso, o documentário em vídeo tem um resultado mais objetivo e dinâmico, sobretudo porque desperta os vários sentidos como a audição, a visão e a sensibilidade, estimulando a aquisição do conhecimento.

O presente projeto pretende ilustrar dois protocolos experimentais, através da realização de dois documentários, utilizando como suporte áudio visual o vídeo. O documentário em vídeo intitulado “Fungos Aquáticos – da Natureza à Coleção em Laboratório”, para além de dar a conhecer um grupo de fungos com um papel chave na decomposição da matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos, evidencia as principais etapas para o isolamento de um fungo aquático, desde a sua recolha no rio até à colocação em coleção. O documentário em vídeo intitulado “O Uso de Microcosmos em Ecotoxicologia Aquática”, mostra como estudar o efeito de tóxicos na diversidade e atividade de organismos aquáticos. Como exemplo, foram considerados os efeitos de nanopartículas de óxido de cobre na decomposição da folhada pelos microrganismos e as consequências para níveis tróficos superiores, nomeadamente para os invertebrados detritívoros.

Para além disso, foi redigido um texto de suporte para uma melhor compreensão dos conteúdos científicos e técnicos apresentados nos documentários em vídeo.

## **Abstract**

Nowadays, audiovisual is of great importance in spreading information in society, especially among young people. The visual language has a greater impact in society, due to the immediacy of understanding the images and, therefore, the video documentary is more objective and dynamic, since it stimulates various senses, such as hearing and vision, encouraging the acquisition of knowledge.

This project aims to illustrate two experimental protocols, using two documentaries in video as audiovisual support. The video documentary entitled "Aquatic Fungi – From Nature to the Collection in the Laboratory", show the main steps for the isolation of aquatic fungi, since its collection in a stream until its deposition in a culture collection. In addition, the video provides information on the role that this group of fungi plays in the decomposition of organic matter in streams. The video documentary entitled "The Use of Microcosms in Aquatic Ecotoxicology" shows how to study the effect of toxic compounds on the diversity and activity of aquatic organisms. As an example, we report the effects of nanoparticles of copper oxide in litter decomposition by microorganisms and the consequences for higher trophic levels, particularly for invertebrate detritivores.

In addition, a text was written to support a better understanding of scientific and technical contents presented in the video documentaries.

A presente Tese de Mestrado é realizada no âmbito de um trabalho de projeto na área da Ecologia, para obtenção do grau de Mestre, de acordo com o Despacho RT-38/2011 de 21 de junho, para acreditação da formação adquirida na Licenciatura em Biologia Aplicada, realizada no sistema de graus anteriores ao lançamento do Processo de Bolonha.

## Índice

### 1. Introdução

1.1. A importância dos hifomicetos aquáticos	1
1.2. Etapas da decomposição dos detritos vegetais nos rios	2
1.3. Métodos para avaliar a diversidade e atividade de hifomicetos aquáticos	3
1.4. A importância da construção de uma coleção de fungos aquáticos	3
1.5. O uso de microcosmos em estudos de toxicidade em sistemas aquáticos	6
1.6. Toxicidade aguda e crónica	7
1.7. Toxicidade dos metais	7
1.8. Toxicidade das nanopartículas metálicas	8

### 2. Objetivos

### 3. Metodologia

3.1. Hifomicetos Aquáticos – da Natureza à Coleção em Laboratório	12
3.1.1. Recolha de hifomicetos aquáticos da natureza	12
3.1.2. Isolamento de espécies de hifomicetos aquáticos	13
3.1.3. Identificação dos hifomicetos aquáticos	13
3.1.4. Preservação das culturas de hifomicetos aquáticos	13
3.1.5. Registo na base de dados	14
3.2. Uso de microcosmos em Ecotoxicologia Aquática	14
3.2.1. Avaliação dos efeitos de nanopartículas em microcosmos	14
3.2.2. Obtenção de uma comunidade microbiana	14
3.2.3. Preparação e manutenção dos microcosmos	14
3.2.4. Liofilização das folhas	15
3.2.5. Avaliação da massa de folha decomposta pelos microrganismos	15
3.2.6. Determinação da biomassa de fungos aquáticos	15
3.2.7. Avaliação da diversidade e atividade reprodutora dos fungos aquáticos	15
3.2.8. Análise da estrutura das comunidades de fungos e bactérias	16
3.2.9. Efeito das nanopartículas nos invertebrados detritívoros	16
3.2.10. Avaliação do consumo de folha pelo invertebrado	16
3.3. Software e hardware para a produção dos vídeos	18

### 4. Considerações finais

### 5. Referências

## **1. Introdução**

### **1.1. A importância dos hifomicetos aquáticos**

Os hifomicetos aquáticos constituem um grupo de fungos anamórficos, filogeneticamente diverso, com um papel importante na decomposição da matéria orgânica em sistemas de água corrente (Gessner e Chauvet, 1994). Estes fungos ocorrem em rios e ribeiros com águas limpas e arejadas, mas também têm sido encontrados em rios eutrofizados (Suberkropp *et al.*, 1988; Pascoal *et al.*, 2003, 2004, 2005) e/ou poluídos com metais (Sridhar *et al.*, 2000).

Os micélios dos hifomicetos aquáticos produzem um número elevado de conídios tetrarradiados, sigmóides ou esféricos o que permite a sua identificação (Gessner *et al.*, 2003), sendo que as características das colónias, tais como a textura, a taxa de crescimento radial e a cor, são também um importante auxiliar na identificação deste grupo de fungos (Marvanová, 2002). A análise molecular do DNA também é uma importante ferramenta para a identificação destes microrganismos, tendo sido proposta a utilização de sequências da região ITS do rRNA como código de barras para a identificação de espécies de hifomicetos aquáticos (Seena *et al.*, 2010).

Mais de 300 espécies de hifomicetos aquáticos foram identificadas (Descals, 1997; Shearer *et al.*, 2007) em ambientes lóticos do equador ao Ártico (Shearer *et al.*, 2007) e à Tierra del Fuego (Godeas, 1985), embora algumas espécies pareçam estar limitadas a determinadas latitudes e altitudes (Bärlocher, 2007). São considerados como um dos grupos de microrganismos mais ativos na reciclagem da matéria orgânica, assumindo um papel crucial na cadeia trófica aquática, devido à sua capacidade de colonizar e decompor o material vegetal ripícola. Realmente, vários estudos indicam que a biomassa dos fungos associada aos detritos vegetais nos rios excede largamente a das bactérias (Baldy *et al.*, 1995, 2002; Weyers e Suberkropp, 1996; Pascoal e Cássio, 2004).

Nos primeiros estádios da decomposição, os hifomicetos aquáticos desempenham um papel importante como intermediários entre os detritos de plantas e os invertebrados em rios e ribeiros (Bärlocher, 1992), principalmente porque possuem um conjunto de enzimas extracelulares capazes de degradar os polissacarídeos das paredes celulares das plantas (Suberkropp, 1988; Rodrigues e Graça, 1997), melhorando a palatabilidade das folhas e aumentando o seu valor nutricional para os invertebrados (Bärlocher, 1985; Suberkropp, 1992; Graça, 1993, 2001). Para além da produção de uma variedade de

enzimas extracelulares, a capacidade de crescer a temperaturas baixas e a capacidade de dispersão e de adesão dos conídios aos substratos, são algumas das características responsáveis pelo sucesso dos hifomicetos aquáticos como decompositores da matéria orgânica nas águas doces (Suberkropp, 1998).

Os conídios podem ser encontrados a flutuar nas espumas que se formam naturalmente nos ribeiros, na coluna de água ou associados a substratos orgânicos em decomposição como as folhas e os galhos (Bärlocher, 1992). Vários estudos têm demonstrado que a distribuição e a atividade dos hifomicetos aquáticos são afetadas pelas características físicas e químicas da água do rio (Pascoal *et al.*, 2005) e pela diversidade e qualidade da vegetação ribeirinha (Graça *et al.*, 2002).

## **1.2. Etapas da decomposição dos detritos vegetais nos rios**

Nos rios e ribeiros florestados, a matéria orgânica proveniente da vegetação ripícola, como a folhada, constitui a principal fonte de carbono e energia para os organismos aquáticos (Cummins, 1974; Benfield, 1996). A decomposição da matéria orgânica é um processo complexo que envolve diversas etapas como a lixiviação, o condicionamento microbiano e a fragmentação física e biológica por parte dos macroinvertebrados. Alguns microrganismos intervêm sobretudo no início do processo, enquanto que outros colonizam o material numa fase posterior, o que se relaciona com as suas capacidades metabólicas e com as características do substrato (Suberkropp, 1991).

Após entrada da folhada na água, dá-se o processo de lixiviação dos compostos solúveis. A duração desta etapa depende das características da própria folha e das condições existentes no curso de água nomeadamente, a temperatura e o pH (Thompson e Bärlocher, 1989). Durante esta fase, ocorre a perda de compostos tóxicos, como os fenóis e poli-fenóis, o que facilita o processo de condicionamento microbiano das folhas por bactérias e fungos. Tanto uns como outros são fundamentais durante a decomposição e facilitam a colonização pelos macroinvertebrados. Esta é facilitada pelo aumento do valor nutritivo das folhas pela presença de biomassa microbiana e pela degradação de compostos recalcitrantes pelos microrganismos. A fragmentação da folhada, durante a alimentação dos invertebrados, e a abrasão física, resultante da corrente, completam o processo de decomposição (Boulton e Boon, 1991; Gessner *et al.*, 1999).

As atividades humanas, tais como a agricultura e urbanização, podem levar ao enriquecimento de nutrientes nos rios, com consequente impacto sobre a decomposição da folhada pelos hifomicetos aquáticos. Em geral, os nutrientes a baixa ou moderada concentração tendem a estimular a atividade dos fungos (Gulis e Suberkropp, 2003 b; Gulis *et al.*, 2006; Pascoal *et al.*, 2001, 2003). No entanto, concentrações elevadas de nutrientes podem conduzir à eutrofização e à depleção de oxigênio, sendo que os efeitos combinados sobre os ecossistemas aquáticos sejam difíceis de prever (Allan, 1995; Pascoal e Cássio, 2004; Elozegi *et al.*, 2006).

### **1.3. Métodos para avaliar a diversidade e atividade de hifomicetos aquáticos**

A análise da contribuição de cada uma das espécies de fungos aquáticos para a decomposição da folhada tem sido tradicionalmente baseada na identificação e contagem ao microscópio dos conídios libertados pelos micélios associados às folhas em decomposição (Hieber e Gessner, 2002; Pascoal *et al.*, 2005a,b,c; Gulis e Suberkropp, 2003a,b). No entanto, as espécies de fungos com taxas elevadas de esporulação nem sempre são as que produzem mais biomassa (Bermingham *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2006), por isso não é fácil avaliar a contribuição de cada espécie para a decomposição. Técnicas de análise do DNA, tais como a eletroforese desnaturante em gel de gradiente (DGGE), têm sido usadas para avaliar a diversidade das comunidades de fungos na folhada em decomposição expressa como número de OTUs (unidades taxonômicas operacionais) (Nikolcheva e Bärlocher 2005; Nikolcheva *et al.*, 2003, 2005; Das *et al.*, 2007, 2008; Duarte *et al.*, 2008a). Contudo, para avaliar a abundância relativa das espécies em comunidades poderão ser usadas técnicas quantitativas de amplificação do DNA como o PCR em tempo real (Fernandes *et al.*, 2011).

### **1.4. A importância da construção de uma coleção de fungos aquáticos**

As coleções de culturas de microrganismos tornaram-se especialmente importantes depois da Convenção sobre Diversidade Biológica, que foi ratificada por muitos países (Hawksworth, 1996). A disponibilidade de microrganismos preservados *ex-situ*, em culturas com qualidade e origem garantidas, tornou-se imprescindível para a investigação, para o desenvolvimento de bioprocessos com aplicações em diversas áreas, desde a medicina à agricultura, mas também para o conhecimento e conservação da biodiversidade. As coleções de culturas respondem a essas necessidades, pois

promovem o armazenamento centralizado de culturas puras, manipuladas e conservadas segundo procedimentos padronizados com vista a garantir a sua genuidade, viabilidade e, por conseguinte, a reprodutibilidade de resultados (Santos e Lima, 2001).

As coleções garantem a conservação da biodiversidade microbiana fora do habitat natural (Glowka, 1996). Os isolamentos depositados nas coleções de culturas constituem a base da maior parte do conhecimento atual sobre a biodiversidade biológica e representam material de arquivo para estudos futuros (Kirsop, 1996).

A seleção das técnicas de preservação de microrganismos em cultura está relacionada com a escala temporal pretendida e com as propriedades biológicas do microrganismo. Quando a escala de tempo é curta, está-se perante uma situação de manutenção das culturas, quando se pretende uma conservação por um período de tempo ilimitado, está-se perante um problema de perpetuação. A perpetuação de uma cultura de hifomiceto aquático tem como objetivo mantê-la viável, pura e geneticamente inalterada. A manutenção a longo prazo implica a preservação de culturas por dez anos sem reinoculação, isto pode ser conseguido através da redução ou mesmo da suspensão do metabolismo do fungo (Santos e Lima, 2001). Existem diversos métodos de preservação para este efeito, mas nenhum deles é universalmente aplicável para todos os microrganismos (Stalpers *et al.*, 1987; Smith e Onions, 1994; Kolkowski e Smith 1995; Hubálek 1996).

As diversas metodologias de preservação existentes podem ser agrupadas tendo por base, a manutenção por crescimento contínuo ou a preservação de culturas desidratadas. A manutenção de culturas de fungos através de transferências sucessivas para meio de cultura fresco pode propiciar alterações morfológicas, fisiológicas ou genéticas no microrganismo, no entanto, quando o número de estirpes a tratar é pequeno e quando se pretende uma manutenção a curto prazo, pode ser uma prática a adotar (Santos, 2004). O período entre as transferências de meio de cultura varia de fungo para fungo e pode ir de entre duas a quatro semanas até aos doze meses, embora dois a quatro meses seja adequado para a maioria dos fungos (Smith e Onions, 1994).

As técnicas de preservação que se baseiam no crescimento contínuo das estirpes isoladas procuram reduzir o número de transferências sucessivas necessárias à sua manutenção. O armazenamento no frio, a temperaturas da ordem dos 4°C, diminui o crescimento das culturas e previne a desidratação do meio de cultura, permitindo assim ampliar o intervalo de tempo entre as transferências. A adição de uma camada de óleo mineral sobre a cultura ativa em meio sólido é outra forma de impedir a desidratação do

agar. O crescimento do fungo torna-se mais lento e a sua atividade metabólica diminui devido à redução da disponibilidade em oxigénio (Edwards *et al.*, 1947). Embora a diminuição da taxa de crescimento, como resultado do armazenamento no frio e/ou baixo teor de oxigénio, não suprima as desvantagens deste método, a taxa à qual a variação genética dos microrganismos ocorre é diminuída (Santos, 2004).

A preservação de suspensões de esporos (McGinnis *et al.*, 1974), ou de blocos de agar retirados das culturas ativas, em água esterilizada (Marx e Daniel, 1976) é uma outra alternativa possível para a diminuição do metabolismo por redução do suplemento em nutrientes.

A diminuição do metabolismo celular também pode ser conseguida pela redução do conteúdo em água das células. Neste tipo de abordagem enquadram-se a desidratação de suspensões de propágulos fúngicos em sílica gel, areia ou solo, a liofilização e a desidratação por ação do frio que ocorre durante a crioconservação. Os fungos produzem diversas estruturas, tais como ascos, esporos sexuais e assexuais, esclerócios, clamidósporos e hifas espessas, que lhes permitem sobreviver em condições adversas, nomeadamente de falta de água e nutrientes. A maioria dos propágulos fúngicos tem um conteúdo em água menor que o micélio vegetativo, tornando-os resistentes a condições de pouca humidade relativa e, por conseguinte, são estruturas que podem ser preservadas por processos de desidratação. A desidratação suspende o metabolismo e só quando a água é repostada é que o fungo reanima e cresce (Santos, 2004).

A técnica de preservação em sílica gel é um método muito fiável para a preservação de vários hifomicetos, coelomicetos e ascomicetos esporulantes (Smith e Onions, 1983). Embora as estirpes preservadas em sílica gel demonstrem geralmente estabilidade das suas características genéticas, fisiológicas e morfologias, a liofilização é considerada um tratamento mais eficaz para a preservação de fungos esporulantes (Smith e Onions, 1983). A liofilização é o processo pelo qual a água e outros solventes são removidos por sublimação de um produto congelado.

A criopreservação é o método de preservação atualmente considerado o mais eficiente para a conservação de microrganismos a longo prazo (mais de 10 anos). A criopreservação pode ser feita em criotubos contendo glicerol a 30% p/v ou 10% p/v e congelamento a uma temperatura de - 80°C ou em azoto líquido (Santos, 2004). Quando se arrefece uma suspensão aquosa de células, o gelo forma-se em primeiro lugar no ambiente extracelular, o que provoca o aumento da concentração extracelular de solutos

e a saída da água das células. Assim, ocorre um processo de desidratação enquanto prossegue o congelamento extracelular. A taxa e a extensão deste processo dependem da taxa de arrefecimento e da permeabilidade das células (Tan, 1997). A formação de cristais de gelo intracelular e a acumulação de solutos são dois fenómenos chave que contribuem para que ocorram danos nas células durante o arrefecimento (Mazur *et al.*, 1972; Mazur, 1984). Se os efeitos negativos nas células fossem provocados apenas pelo aumento da concentração de solutos, um arrefecimento rápido seria o ideal, já que evitaria a desidratação das células. Se, por outro lado, o gelo intracelular fosse o único responsável pelos danos, então as taxas de arrefecimento deveriam ser muito pequenas, pois assim haveria tempo para a água sair das células. Na prática, utilizam-se taxas de arrefecimento de 1 a 10°C por minuto para a maioria dos microrganismos. Os danos provocados pelo frio podem ser minimizados pela ação de agentes crioprotectores como o glicerol. Estes compostos químicos não devem apresentar toxicidade para as células, devem penetrar a membrana celular com facilidade, devem poder ligar eletrólitos que se concentram durante o congelamento ou então ligar moléculas de água para atrasar o congelamento (Smith, 1983b; Hubálek, 2003).

Às temperaturas -70/-80°C a atividade metabólica é mínima mas pode ocorrer recristalização do gelo capaz de provocar danos estruturais nas células. A suspensão total do metabolismo ocorre a temperaturas abaixo dos -139°C (Morris, 1981). Estas condições são conseguidas por imersão das culturas em azoto líquido (Smith, 1992).

### **1.5. O uso de microcosmos em estudos de toxicidade em sistemas aquáticos**

Os estudos em microcosmos têm desempenhado um papel importante na promoção do conhecimento dos processos ecológicos em ecossistemas de rio. Os microcosmos podem ser particularmente úteis no estudo do impacto de compostos potencialmente tóxicos, tal como os metais, uma vez que estes podem ter efeitos adversos o que desaconselha a sua adição *in situ* (Duarte *et al.*, 2004). Além disso, há evidências de que as experiências em microcosmos reproduzem os efeitos de contaminantes nos ecossistemas aquáticos (ex. zinco, Duarte *et al.*, 2004; cádmio e fenantreno, Moreirinha *et al.*, 2011).

A extrapolação dos resultados em microcosmos para os ecossistemas naturais deve ser feita com cuidado uma vez que, em algumas situações, a sua relevância é limitada, nomeadamente em casos em que o tamanho dos microcosmos e a duração da

experiência tendem a excluir ou a distorcer importantes características das comunidades ou dos ecossistemas (Carpenter, 1996).

### **1.6. Toxicidade aguda e crônica**

De um modo geral, um tóxico é um agente que provoca num sistema biológico um efeito adverso, levando a alterações perniciosas na sua estrutura ou função, ou provocando mesmo a morte. Nenhuma substância é totalmente tóxica ou inócua. A inocuidade ou toxicidade de uma substância para um alvo biológico depende da concentração da substância e do tempo de exposição. A severidade da resposta dessa exposição ao tóxico é dada pela relação entre a concentração aplicada e o efeito observado.

Os ensaios de toxicidade são utilizados para avaliar os efeitos adversos dos químicos nos organismos vivos. Estes ensaios devem ser reprodutíveis e devem ser conduzidos em condições padronizadas de modo a permitir a sua comparação.

Os efeitos dos tóxicos podem ser letais (provocando a morte) ou sub-letais (provocando por exemplo, alterações no crescimento, na reprodução, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais). Com base no tipo de efeito que se manifesta e no tempo de exposição, os testes ou ensaios de toxicidade podem ser classificados em dois grupos: testes agudos (efeitos letais) e testes crônicos (efeitos sub-letais) (Rand, 1995). No caso dos testes de toxicidade aguda, o período de exposição é curto geralmente com uma duração de 24 a 96 horas, podendo ir até 10 dias.

### **1.7. Toxicidade dos metais**

Os metais são reconhecidos como tóxicos para os organismos a concentrações relativamente baixas. A exploração mineira, a descarga de efluentes industriais e domésticos e a lixiviação de fertilizantes agrícolas provocam o aumento da concentração de metais nos ecossistemas aquáticos. Os metais não são biodegradáveis e, por isso, podem acumular-se nos organismos ao longo das cadeias tróficas podendo atingir o homem (Ramade, 1979).

Alguns organismos têm desenvolvido tolerância aos metais podendo estar expostos a uma elevada concentração destes compostos sem sofrer qualquer efeito deletério visível. Os hifomicetos aquáticos poderão possuir, à semelhança de outros fungos, mecanismos de proteção contra o efeito dos metais, como a adsorção a nível da parede celular, a transformação do metal (por exemplo, por oxidação, redução ou metilação), a

compartimentação intracelular, transcrição de proteínas com grupos tiol, que podem sequestrar os metais e o efluxo ativo dos metais (Gadd, 1993; Cervantes e Gutierrez-Corona, 1994).

Os efeitos nocivos dos metais nos organismos incluem o bloqueio de grupos funcionais de moléculas biologicamente importantes (enzimas e sistemas de transporte de nutrientes e íons essenciais), remoção e/ou substituição de íons metálicos essenciais de biomoléculas e unidades funcionais, modificações conformacionais, desnaturação e inativação de enzimas, e danos na integridade das membranas celulares e de organelos (Gadd, 1993).

O efeito de íons metálicos nos hifomicetos aquáticos manifestou-se por uma diminuição da reprodução (taxa de produção de conídios) e do crescimento micelar de culturas puras. Os efeitos de toxicidade diferiram com a espécie de fungo e com o tipo de metal (Rodrigues, 2002; Azevedo e Cássio, 2010). Além disso, a reprodução dos hifomicetos foi mais sensível aos metais do que o crescimento.

Estudos em microcosmos com comunidades naturais de hifomicetos aquáticos mostraram que a reprodução, a diversidade e a atividade decompositora da folhada foram afetadas pela exposição a metais (por exemplo: Zn, Duarte *et al.*, 2004; Cu e Zn, Duarte *et al.*, 2008) e a misturas de metais com outros tóxicos (por exemplo: Cd e fenantreno, Moreirinha *et al.*, 2011).

### **1.8. Toxicidade das nanopartículas metálicas**

Partículas de tamanho nano têm estado presentes na Terra há milhões de anos e têm sido utilizadas pela humanidade há milhares de anos. A fuligem, por exemplo, é um produto da combustão incompleta de combustíveis fósseis e combustíveis da vegetação, e é constituída por partículas nas escalas micrométrica e nanométrica. As nanopartículas inorgânicas têm uma ampla distribuição, nomeadamente em solos e sistemas geológicos (Banfield e Zhang, 2001; Waychunas *et al.*, 2005), estão presentes em aerossóis na atmosfera sendo os precursores para a formação de partículas maiores, que são conhecidas por influenciar fortemente o clima global, a atmosfera química, o transporte regional e global de poluentes (Anastasio e Martin, 2001).

As nanopartículas são consideradas substâncias com tamanho menor que 100 nm. Podem ter forma esférica, tubular, ou forma irregular e podem existir nas formas agregadas ou aglomeradas (Nowack *et al.*, 2007). As nanopartículas são cada vez mais utilizadas em áreas como a eletrónica, a biomedicina, a cosmética e o ambiente

(Nowack *et al.*, 2007). Devido às inúmeras aplicações das nanopartículas, tem havido um aumento a nível mundial do investimento na investigação e no desenvolvimento da nanotecnologia (Guzman *et al.*, 2006). Os dados sobre o uso e produção de nanopartículas são escassos. A estimativa para a produção de nanomateriais foi de 2000 toneladas em 2004 mas deverá aumentar para 58 mil toneladas entre 2011 e 2020 (Maynard, 2006). Com o aumento da produção e uso de nanopartículas, é provável que haja um aumento do risco de exposição dos organismos, incluindo o Homem, a estes compostos. Este facto tem atraído a atenção da comunidade científica para o potencial impacto toxicológico das nanopartículas na saúde e no ambiente. Assim, torna-se prioritário proceder à avaliação dos seus efeitos para que os governos, o sector público e privado possam tomar as medidas adequadas para minimizar os riscos de exposição às nanopartículas (Roco, 2005).

O destino e os efeitos das nanopartículas dependem das suas propriedades, tais como o tamanho, composição química, forma, estado de aglomeração e carga de superfície (Pan e Xing, 2010), e das condições ambientais, como a presença de luz, de agentes oxidantes e de matéria orgânica (Zeng *et al.*, 2002). Como resultado da interação entre o ambiente e as nanopartículas, estas podem adquirir novas propriedades, cujos efeitos toxicológicos são difíceis de prever (Manier *et al.*, 2011). Por exemplo, os ácidos húmicos, que são polímeros naturais amplamente distribuídos nas águas, solos e sedimentos, têm a capacidade de complexar os metais alterando a sua biodisponibilidade quer na forma iónica ou nano, com consequências para a ecotoxicidade destes compostos metálicos (Croteau *et al.*, 2011). Para além disso, a absorção de luz pelos ácidos húmicos pode iniciar vários processos fotoquímicos e resultar na produção de radicais peróxidos e radicais hidroxilo podendo danificar macromoléculas nas células (Balarezo *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2004). Os ácidos húmicos podem agir também como uma barreira física entre as células e as nanopartículas e agir como um agente antioxidante, por reagir com espécies reativas de oxigênio (Fabrega *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostraram que nanopartículas metálicas reduzem a diversidade e a atividade de bactérias e fungos decompositores (Pradhan *et al.*, 2011), com consequências para os invertebrados detritívoros e para a decomposição dos detritos vegetais nos rios (Pradhan *et al.*, 2012). Apesar dos efeitos negativos dos metais na sua forma iónica serem geralmente mais pronunciados em comparação com as nanoformas,

é reconhecido que as nanopartículas metálicas podem ser uma ameaça para as comunidades aquáticas (Battin *et al.*, 2009; Pradhan *et al.*, 2011).

## **2. Objetivos**

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo ilustrar dois protocolos experimentais através de dois documentários, utilizando como suporte áudio visual o vídeo.

O documentário em vídeo intitulado “Hifomicetos Aquáticos – da Natureza à Coleção em Laboratório”, para além de dar a conhecer um grupo de fungos com um papel chave na decomposição da matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos, evidencia as principais etapas para o isolamento de um fungo aquático, desde a sua recolha no rio até à colocação em coleção.

O documentário em vídeo intitulado “O uso de Microcosmos em Ecotoxicologia Aquática”, mostra como estudar o efeito de tóxicos na diversidade e atividade de organismos aquáticos. Como exemplo, foram considerados os efeitos de nanopartículas de óxido de cobre na decomposição da folhada pelos microrganismos e as consequências para os níveis tróficos superiores, nomeadamente para os invertebrados detritívoros.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Hifomicetos Aquáticos – da Natureza à Coleção em Laboratório**

O processo da colheita de fungos aquáticos até à sua preservação em laboratório é desenvolvido em várias fases: recolha dos hifomicetos em rios e ribeiros; isolamento de espécies puras; identificação das espécies; preservação e registo na base de dados.

##### **3.1.1. Recolha de hifomicetos aquáticos da natureza**

Os hifomicetos aquáticos podem ser obtidos na natureza a partir de: a) recolha de espumas que se formam naturalmente nos rios e ribeiros; b) recolha de material vegetal existente no rio; c) introdução de material vegetal no rio para ser colonizado pela comunidade de fungos.

###### **a) Recolha de espumas presentes nos rios**

As espumas podem ser recolhidas com uma colher para um tubo de Falcon e serão posteriormente espalhadas numa placa de Petri contendo água-agar, de forma a podermos proceder ao isolamento individual de conídios. Alternativamente, o espalhamento em placa pode ser feito no campo.

###### **b) Recolha de material vegetal existente no rio**

Amostras de material ripícola em decomposição, como folhas ou pequenos galhos, são recolhidas dos rios e transportadas para o laboratório. O material é lavado em água corrente e colocado em Erlenmeyers contendo água estéril. Este conjunto é colocado sob arejamento conseguido por bombas de aquário ou por agitação numa incubadora. Após um período de tempo, geralmente entre 2 a 21 dias, são recolhidas amostras de água que são inoculadas em placas de Petri contendo água-agar e procede-se ao isolamento dos esporos como indicado em 3.1.2..

###### **c) Recolha de material vegetal previamente imerso no rio**

Folhas de uma espécie vegetal comum na vegetação ripícola são colocadas em sacos de rede, e imersas no rio, por um período de tempo entre 2 a 3 semanas, para permitir a colonização pelos microrganismos. Após a recolha dos sacos, as folhas são lavadas para a remoção de sedimentos e invertebrados que possam estar associados. As

folhas colonizadas são então colocadas em Erlenmeyers contendo água estéril e sob arejamento. Periodicamente, são recolhidas amostras que são inoculadas em placas de Petri contendo água-agar.

### **3.1.2. Isolamento de espécies de hifomicetos aquáticos**

As espécies de hifomicetos aquáticos são isoladas a partir de conídios. O isolamento deve ser efetuado quando os conídios iniciam o processo de germinação, pois é indicativo da viabilidade do esporo. Contudo, deve garantir-se que não se isola material proveniente de mais do que um esporo.

O isolamento das espécies pode ser feito com o apoio de um microscópio invertido. Este procedimento passa por cortar o pedaço de agar onde está o conídio e transferi-lo para uma placa de Petri contendo extrato de malte (ME) a 1% p/v com antibiótico (por exemplo, cloranfenicol a 0,05% p/v) para prevenir o crescimento de bactérias. Após o crescimento do fungo e na ausência de contaminação, um pedaço do micélio do fungo é transferido para um meio contendo ME 2% (p/v).

### **3.1.3. Identificação dos hifomicetos aquáticos**

A identificação dos fungos é feita por observação dos conídios ao microscópio ótico tendo em conta o tamanho e a forma dos conídios. Para isso é colocada uma gota da suspensão de conídios numa lâmina de vidro e os conídios são corados com azul de algodão para facilitar a sua visualização. Para a obtenção da suspensão de conídios, procede-se à indução da esporulação do micélio por imersão em água de pedaços de cultura do fungo colocados sob arejamento. Algumas características das colónias, tais como a textura, a taxa de crescimento radial e a cor, também podem ajudar na identificação das espécies. Recentemente, a aplicação de marcadores moleculares de DNA tem-se revelado promissora para a identificação de espécies de fungos aquáticos.

### **3.1.4. Preservação das culturas de hifomicetos aquáticos**

A manutenção a longo prazo implica a preservação de culturas por dez anos sem reinoculação, isto pode ser conseguido através da redução ou mesmo da suspensão do metabolismo do fungo.

A preservação das espécies de fungos aquáticos em coleção pode ser realizada por congelamento de pedaços de micélio crescidos em meio sólido e colocados a -80 °C em

criotubos contendo glicerol ou colocados em azoto líquido. Os pedaços de cultura também podem ser mantidos viáveis em água estéril à temperatura ambiente.

### **3.1.5. Registo na base de dados**

O registo na base de dados é importante para se conhecer o histórico da espécie. Esse registo deverá conter a seguinte informação: i) número da estirpe; ii) nome da espécie, incluindo o nome dos autores que a classificaram; iii) local de colheita, incluindo as coordenadas GPS; iv) data de isolamento; v) substrato de isolamento (ex. água, espumas, folhas, galhos); v) nome do coletor; vi) designação do meio de cultura usado para o crescimento vii); sequência genética quando disponível; viii) documentação fotográfica do esporo e da cultura do fungo em meio sólido e ix) local de armazenamento dos espécimes na coleção.

## **3.2. O Uso de Microcosmos em Ecotoxicologia Aquática**

### **3.2.1. Avaliação dos efeitos de nanopartículas em microcosmos**

Para a documentação do uso de microcosmos em ecotoxicologia aquática foram considerados os efeitos de nanopartículas de óxido de cobre na decomposição da folhada por microrganismos e as consequências para os níveis tróficos superiores, nomeadamente para os invertebrados detritívoros.

### **3.2.2. Obtenção de uma comunidade microbiana**

A primeira etapa consiste na obtenção de uma comunidade natural de microrganismos decompositores. Para isso, são cortados discos de folhas de uma espécie vegetal que são colocados em sacos de malha fina e imersos num rio. Após 8-15 dias, os sacos são recolhidos, e a folhada é lavada para eventual remoção de sedimentos. Os discos de folhas são agora colocados em microcosmos previamente preparados.

### **3.2.3. Preparação e manutenção dos microcosmos**

Os microcosmos consistem em frascos Erlenmeyer com água do rio, previamente esterilizada, e contendo concentrações crescentes da nanopartícula cujo efeito queremos testar. Terão que ser usadas um mínimo de 3 réplicas independentes para cada tratamento.

A cada frasco são adicionados um conjunto de discos de folhas colonizados por microrganismos. Os microcosmos são mantidos sob agitação e temperatura controladas durante cerca de 3 semanas. As suspensões contendo as nanopartículas deverão ser renovadas periodicamente para impedir a acumulação dos produtos resultantes do metabolismo e para manter as condições do meio constantes durante o tempo da experiência. As suspensões retiradas devem ser reservadas para posterior contagem e identificação dos conídeos libertados pelos micélios de fungos.

#### **3.2.4. Liofilização das folhas**

Após a experiência, os discos de folhas são liofilizados e guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação da perda de massa da folha, da biomassa de fungos associados às folhas, e para a análise da estrutura das comunidades de fungos, e bactérias, por métodos moleculares.

#### **3.2.5. Avaliação da massa de folha decomposta pelos microrganismos**

A massa da folha decomposta pelos microrganismos é estimada pela diferença entre a massa da folha no fim e no início da experiência e é uma medida que traduz a atividade decompositora microbiana.

#### **3.2.6. Determinação da biomassa de fungos aquáticos**

A determinação da biomassa de fungos aquáticos associados às folhas em decomposição é feita com base na quantificação do ergosterol. O ergosterol é um lípido que está presente na membrana celular dos fungos e não está geralmente presente em outros microrganismos. Por isso, o ergosterol tem sido usado como um indicador da biomassa dos fungos. Para a quantificação do ergosterol, é necessário primeiramente extrair os lípidos dos fungos que estão a crescer nas folhas, o que pode ser feito por adição de metanol e hidróxido de potássio a quente. Seguidamente, o ergosterol é purificado por extração em fase sólida, e quantificado por HPLC, ou seja por cromatografia líquida de alta precisão.

#### **3.2.7. Avaliação da diversidade e atividade reprodutora dos fungos aquáticos**

A avaliação da diversidade e atividade reprodutora dos fungos aquáticos pode ser feita a partir da identificação e quantificação dos conídeos libertados pela comunidade de fungos durante ou no final da experiência em microcosmos. Para isso, deverá filtrar-

se um volume adequado das suspensões retiradas dos microcosmos e que contém os conídeos a identificar. Os conídeos retidos nos filtros são corados com azul de algodão para facilitar a sua contagem e identificação.

### **3.2.8. Análise da estrutura das comunidades de fungos e bactérias**

A análise da estrutura das comunidades de fungos e bactérias pode ser feita por métodos moleculares. O DNA microbiano é extraído e amplificado, por PCR, usando sondas adequadas para bactérias ou para fungos. Finalmente, o DNA de cada unidade taxonómica é separado por técnicas de eletroforese, de que é exemplo a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

### **3.2.9. Efeito das nanopartículas nos invertebrados detritívoros**

O efeito das nanopartículas de óxido de cobre pode ser testado em microcosmos contendo concentrações crescentes de nanopartículas e alimentando invertebrados detritívoros com folhada. Este procedimento permite avaliar os efeitos das nanopartículas para níveis tróficos superiores. Cada microcosmo poderá conter dois invertebrados detritívoros, de que é exemplo a espécie de tricóptero *Alogamus ligonifer* da família Limnephilidae. Devido à possível variabilidade nos resultados, deverá ser utilizado um número mínimo de 6 réplicas por tratamento. Os animais serão alimentados com folhada e mantidos sob arejamento e temperatura controlada durante um período de cerca de uma semana. Diariamente, deverá ser verificado se os animais se mantêm vivos. Caso contrário, deverão ser substituídos por animais de tamanho e estado larvar equivalente.

### **3.2.10. Avaliação do consumo de folha pelo invertebrado**

No final da experiência, deverá ser estimado o consumo de folha pelos animais nos diferentes tratamentos. Assim, podemos inferir sobre o efeito das nanopartículas no comportamento alimentar dos invertebrados detritívoros que se alimentam de folhada colonizada por microrganismos.

### **3.3 Software e hardware para a produção dos vídeos**

A obtenção das fotos e dos vídeos em HD foi feita utilizando o hardware Canon EOS 550D. A edição do som e a gravação da locução dos documentários foi feita com o programa Magix.

Para a montagem do vídeo foi utilizado o programa Studio 15. Trata-se de um software usado para a edição de imagem e de som que permite a introdução de efeitos diversos e a gravação dos vídeos em vários formatos, nomeadamente mpg4, mpg2 e DVD-HD.

O Computador (Toshiba) utilizado dispunha de uma memória de 4 GB, com um sistema operativo Windows 7 com uma plataforma de 64 bits e um processador Intel® Core™ i5 CPU M430 @ 2.27 GHz. Estas características do computador são necessárias para a utilização do programa Studio 15.

#### **4. Considerações finais**

O produto final desta dissertação foi a realização de dois documentários em vídeo destinados a alunos do ensino secundário da área das Ciências Naturais, de licenciatura na área da Biologia e de pós-graduação em Ecologia, Toxicologia, Limnologia ou Microbiologia. Sabendo-se da importância que os meios audiovisuais têm para a divulgação científica, foi nosso entendimento colocar à disposição dos estudantes uma ferramenta que possa ser utilizada em qualquer local, bastando, para isso, dispor de um computador. O facto de o aluno poder familiarizar-se à priori com um determinado procedimento, através de imagens e textos explicativos, fará com que esteja melhor preparado para a sua execução. Estes documentários podem ser também uma ferramenta de apoio à docência.

Pretende-se sensibilizar os alunos para questões de maior importância, como é o caso da avaliação e conservação da Biodiversidade e do efeito de compostos potencialmente tóxicos no ambiente.

Após a observação do documentário em vídeo “Hifomicetos Aquáticos – da Natureza à Coleção em Laboratório, espera-se que o aluno seja capaz, por exemplo, de: i) definir o que são hifomicetos aquáticos; ii) descrever o papel dos hifomicetos aquáticos na natureza; iii) explicar as técnicas utilizadas para colher hifomicetos aquáticos de rios; iv) nomear técnicas de preservação de fungos e v) indicar vantagens de construir uma micoteca.

No que respeita ao documentário em vídeo “O uso do Microcosmos em Ecotoxicologia aquática”, espera-se que o aluno seja capaz, por exemplo, de: i) definir o que são nanopartículas; ii) descrever o procedimento para a obtenção de uma comunidade microbiana aquática natural; iii) preparar microcosmos no laboratório; iv) indicar parâmetros biológicos adequados para avaliar a toxicidade e v) enunciar vantagens da utilização de microcosmos em ensaios de toxicidade.

## 5. Referências

- Allan JD** (1995). *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. Chapman & Hall, London, 88 pp.
- Anastasio C, Martin ST** (2001). *Atmospheric nanoparticles*. In: Banfield, J.F., Navrotsky, A. (Eds.), *Nanoparticles and the Environment*, pp. 293-349.
- Azevedo MM, Cássio F** (2010). *Effects of metals on growth and sporulation of aquatic fungi*. *Drug and Chemical Toxicology* **33**:269-278.
- Balarezo AL, Jones VN, Yu H, Hwang HM** (2002). *Influence of humic acid on 1-aminopyrene ecotoxicity during solar photolysis process*. *Int J Mol Sci* **3**: 1133–44.
- Baldy V, Chauvet E, Charcosset JY, Gessner MO** (2002). *Microbial dynamics associated with leaves decomposing in the mainstem and floodplain pond of a large river*. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 25–36.
- Baldy V, Gessner M, Chauvet E** (1995). *Bacteria, fungi and breakdown of leaf litter in a large river*. *Oikos* **74**: 93–102.
- Banfield J e Zhang HZ** (2001). *Nanoparticles in the environment*. In: Banfield, J.F., Navrotsky, A. (Eds.), *Nanoparticles and the Environment*, pp. 1-58.
- Bärlocher F** (1985). *The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **91**: 83–94.
- Bärlocher F** (1992). *Community organization*. In Bärlocher F (Editor) *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*, Springer, Berlin and New York, pages 38–76.
- Battin TJ, Kammer FVD, Weilhartner A, Ottofuelling S, Hofmann T** (2009). *Nanostructured TiO<sub>2</sub>: transport behavior and effects on aquatic microbial communities under environmental conditions*. *Environ Sci Technol* **43**: 8098–8104.
- Benfield EF** (1996). *Leaf breakdown in stream ecosystems*. In *Methods in stream ecology*. Hauer F.R. and Lamberti, G. A. (Editors), Academic Press, San Diego, California, USA, pages 579–589.
- Birmingham SL, Maltby L, Dewey FM** (1997). *Use of immune assays for study of natural assemblages of aquatic hyphomycetes*. *Microb Ecol* **33**: 223–9.
- Boulton AJ, Boon PI** (1991). *A review of methodology used to measure leaf litter decomposition in lotic environments: time to turn over an old leaf ?* *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **42**: 1–43.
- Carpenter SR** (1996). *Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology*. *Ecology* **77**: 667-680.
- Cervantes C, Gutierrez F** (1994). *Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 121-137.
- Chefetz B, Deshmukh AP, Hatcher PG** (2000). *Pyrene sorption by natural organic matter*. *Environ Sci Technol*, **34** (14): 2925-2930.
- Chin YP, AiKen GR, Danielsen KM** (1997). *Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity*. *Environ Sci Technol*, **31**(6): 1630-1635.
- Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE** (1998). *Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments*. *Environ Sci Technol.* **32**(2): 264-269.

**Croteau N, Misra K, Luoma S, Jones E** (2011). *Silver Bioaccumulation Dynamics in a Freshwater Invertebrate after Aqueous and Dietary Exposures to Nanosized and Ionic Ag*. *Environmental Science & Technology* **45**: 6600-6607.

**Cummins KW** (1974). *Structure and function of stream ecosystems*. *BioScience* **24**: 61-64.

**Das M, Royer TV, Leffl G** (2007). *Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 756-67.

**Das M, Royer TV, Leffl G** (2008). *Fungal communities on decaying leaves in streams: a comparison of two leaf species*. *Mycol Prog* **7**: 267-75.

**Drenner RW e Mazumder A** (1999). *Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: comment*. *Ecology* **80**: 1081-1085.

**Duarte S, Pascoal C, Alves A, Correia A, Cássio F** (2008a). *Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams*. *Freshw Biol* **53**: 91-101.

**Duarte S, Pascoal C, Cássio F** (2004). *Effects of Zinc on Leaf Decomposition by Fungi in Streams: Studies in Microcosms*. Springer Science Business Media, Inc. **48**: 366-374.

**Duarte S, Pascoal C, Cássio F, Bärlocher F** (2006). *Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms*. *Oecologia* **147**: 658-66.

**Edwards GA, Buell CB, Weston WH** (1947). *The influence of mineral oil on the oxygen consumption of Sordaria fimicola*. *American Journal of Botany* **34**: 551-555.

**Elosegi A, Basaguren A, Pozo J** (2006). *A functional approach to the ecologi of Atlantic Basque Streams*. *Limnetica*, **25**: 123-134.

**Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC, Lead JR** (2009). *Silver nanoparticle impact upon bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter*. *Environ. Sci. Technol.*, *43*, 7285. doi:10.1021/ES803259G.

**Gadd GM** (1993). *Interactions of fungi with toxic metals*. *Transley Rev. N° 47*. *New Phytol* **124**: 25-60.

**Geraldes P, Pascoal C, Cássio F** (2012). *Effects of increased temperature and aquatic fungal diversity on litter decomposition - Fungal Ecology - <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.007>*.

**Gessner MO, Chauvet E** (1994). *Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter*. *Ecology* **75**: 1807-1817.

**Gessner MO, Chauvet E, Dobson M** (1999). *A perspective on leaf litter breakdown in streams*. *Oikos* **85**: 377-384.

**Gessner MO, Bärlocher F, Chauvet E** (2003). *Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams*. In: C.K.M. Tsui & K.D. Hyde, (eds.), *Freshwater Mycology*. Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 127-157.

**Glowka L** (1996). *The Convention on Biological Diversity: issues of interest to the microbial scientist and microbial culture collections*. In: R.A. Samson, J.A. Stalpers, D. van der Mei, & A.H. Stouthamer (eds.), *Culture Collections to Improve the Quality of Life* (pp. 36-60). Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn.

**Graça MAS** (1993). *Patterns and processes in detritus-based stream systems*. *Limnologica*, **23**: 107-114

**Graça, MAS** (2001). *The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review*. *International Review of Hydrobiology* **86**: 383-393.

- Graça MAS, Pozo J, Canhoto C, Elozegi A.** (2002). *Effects of Eucalyptus plantations on detritus, decomposers, and detritivores in streams.* The ScientificWorld, **2**: 1173-1185.
- Gulis V, Ferreira V, Graça MAS** (2006). *Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment.* Freshwat. Biol. **51**: 1655-1669.
- Gulis V, Suberkrop K** (2003a) *Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter.* – Microb. Ecol. **45**: 11-19.
- Gulis V, Suberkrop K** (2003b). *Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream.* – Freshwat. Biol. **48**: 123-134.
- Guzman KAD, Taylor MR, Banfield JF** (2006). *Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000 e 2004.* Environ. Sci. Technol. **40**: 1401-1407.
- Hawksworth DL** (1996). *Microbial collections as a tool in biodiversity and biosystematics research.* In *Culture Collections to Improve the Quality of Life* (R.A. Samson, J.A. Stalpers, D. van der Mei & A.H. Stouthamer, eds.), pp. 26-35. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Helland A, Kastenzholz H, Thidell A, Arnfalk P, Deppert K** (2006). *Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe: an analysis of stakeholder perspectives.* J. Nanopart. Res. **8**: 709-719.
- Hieber M, Gessner MO** (2002). *Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates.* Ecology, **83**, pp. 1026-1038.
- Hubalek Z** (1996). *Cryopreservation of Microorganisms at Ultra-low Temperatures.* Academia, Prague.
- Kirsop BE** (1996). *Access to ex-situ microbial genetic resources within the framework to the convention on biological diversity.* WFCC Biodiversity Committee, World Federation for Culture Collections. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia 'André Tosello', 25 pp.
- Kolkowski JA e Smith D** (1995). *Cryopreservation and freeze-drying of fungi.* In: J. G. Day, & M. R. McLellan (eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* (pp. 49–61), Humana Press. Totowa.
- Marvanova L, Landvik S, Fisher PJ, Moss ST, Ainsworth AM** (2002). *A new fungus with arthroconidia from foam.* Nova Hedwigia, **75**: 255-269.
- Mazur P** (1984). *Freezing of living cells: mechanisms and implications.* American Journal of physiology **247**: C125-C142.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY** (1972). *A two-factor hypothesis of freezing injury – evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.* Experimental Cell Research **71**: 345-355.
- Maynard AD** (2006). *Safe handling of nanotechnology.* Nature, **444**: 267-269.
- Moreirinha C, Duarte S, Pascoal C, Cássio F** (2011). *Effects of cadmium and phenanthrene mixtures on aquatic fungi and microbially mediated leaf litter decomposition.* Archives of Environmental Contamination and Toxicology **61**:211–219.
- Manier N, Garaud M, Delalain P, Chariol O, Pandard P** (2011). *Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests.* Journal of Physics: Conference Series 304 (2011) 012058.
- Marx DH e Daniel WJ** (1976). *Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage.* Canadian Journal of Microbiology **22**: 338-341.
- McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L** (1974). *Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeast, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water.* Applied Microbiology **28**: 218-222.

- Morris GJ** (1981). *Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections*. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge. 27 pp.
- Nikolcheva LG, Cockshutt AM, Bärlocher F** (2003). *Determining diversity of m fresh water fungi on decomposing leaves: comparison of traditional and molecular approaches*. Applied and Environmental Microbiology, 69, pp. 2548-2554.
- Nikolcheva LG e Bärlocher F** (2005). *Seasonal and substrate preference of fungi colonizing leaves in streams: traditional versus molecular evidence*. Environ Microbiol **7**: 270-80.
- Nowack B e Bucheli T** (2007b). *Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment*. Environmental Pollution 150: 5-22.
- Pan B e Xing B** (2010). *Manufactured nanoparticles and their sorption of organic chemicals*. Adv. Agronomy **108**: 137-181.
- Pascoal C, Cássio F, Marcotegui A, Sanz B, Gomes P** (2005a). *Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river*. Journal of the North American Benthological Society **24**: 784-797.
- Pascoal C e Cássio F** (2004). *Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river*. Applied and Environmental Microbiology **70**: 5266–5273.
- Pascoal C, Cássio F, Gomes P** (2001). *Leaf breakdown rates: a measure of water quality?* International Review of Hydrobiology **86**: 407-416.
- Pascoal C, Cássio F, Marcotegui A, Sanz B, Gomes P** (2005a). *Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river*. – J. N. Amer. Benthol. Soc. **24**: 784-797.
- Pascoal C, Cássio F, Marvanová L** (2005b). *Anthropogenic stress may affect aquatic hyphomycete diversity more than leaf decomposition in a low order stream*. Archiv für Hydrobiologie **162**: 481-496.
- Pascoal C, Marvanová L, Cássio F** (2005c). *Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal*. Fungal Diversity **19**: 109-128.
- Pascoal C, Pinho M, Cássio F, Gomes P** (2003). *Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river*. Freshwater Biology **48**: 2033- 2044.
- Paul A, Hackbarth S, Vogt RD, Roder B, Burnison B, Steinberg CEW** (2004). *Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin*. Photochem Photobiol Sci. **3**: 273-80.
- Pompa A** (1998). *Biología unidad, diversidad y continuidad de los seres vivos*. Editora Hartcorut, brace and world, INC.
- Pradhan A, Seena S, Pascoal C, Cássio F** (2011). *Can Metal Nanoparticles Be a Threat to Microbial Decomposers of Plant Litter in Streams?* Microb Ecol **62**: 58-68.
- Ramade F** (1979). *Écotoxicologie*. (2ª edição) Masson, Paris.
- Rand G** (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. (2ª edição). Taylor e Francis. USA.
- Roco MC** (2005). *Environmentally responsible development of nanotechnology*. Environ. Sci. Technol. **39**: 106-112.
- Rodrigues A** (2002). *Efeito do zinco, cobre, níquel e cádmio no crescimento e na esporulação dos hifomicetos aquáticos Tricladium splendens e Heliscus submersus*. Tese de Licenciatura. Universidade do Minho. Braga.

- Rodrigues APL e Graça MAS** (1997). *Enzymatic analysis of leaf decomposition in freshwater by selected aquatic hyphomycetes and terrestrial fungi*. **49**: 160-173.
- Ryan MJ, Smith D, Jeffries P** (2000). *A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 183-186.
- Santos IM** (2004). *Contributos para a implementação de uma colecção de culturas de fungos filamentosos*. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Braga.
- Santos IM e Lima N** (2001). *Criteria followed in the establishment of a filamentous fungal culture collection – Micoteca da Universidade do Minho (MUM)*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 215-220.
- Seena S, Pascoal C, Marvanová L, Cássio F** (2010). *DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species*. *Fungal Diversity* **44**:77-87.
- Siegrist M, Wiek A, Helland A, Kastenholz H** (2007). *Risks and nanotechnology: the public is more concerned than experts and industry*. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 67.
- Smith D** (1992). *Optimising preservation*. *Laboratory practice* **41**: 25-27.
- Smith D e Onions AHS** (1983). *A comparison of some preservation techniques for fungi*. *Transactions British Mycological Society* **81**: 535-540.
- Smith D e Onions AHS** (1994). *The preservation and maintenance of living fungi*. IMI Technical Handbooks N° 2. CAB International, Wallingford. 122 pp.
- Sridhar KR, Krauss G, Bärlocher F, Wennrich R, Krauss GJ** (2000). *Fungal diversity in heavy metal polluted waters in central Germany*. *Fungal Divers* **5**: 119-29.
- Sridhar KR e Bärlocher F** (2000). *Initial colonization, nutrient supply and fungal activity on leaves decaying in streams*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1114-1119.
- Stalpers JA, Hoog S e Vlug IJ** (1987). *Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen*. *Mycologia*, **79**: 82-89.
- Suberkropp K** (1998). *Microorganisms and organic matter decomposition*. In: Naiman, RJ, Bilby, RE (Eds.) *River Ecology and Management: Lessons from the Pacific Coastal Ecoregion*, Springer, New York, pp 120-143.
- Suberkropp K** (1991). *Relationships between growth and sporulation of aquatic hyphomycetes on decomposing leaf litter*. *Mycological Research* **95**: 843-850.
- Suberkropp K** (1992). *Interactions with invertebrates*. In Bärlocher F (Editor) *The ecology of aquatic hyphomycetes*, Springer, Berlin and New York, pages 118-134.
- Suberkropp K, Klug MJ** (1976). *Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a wood land stream*. *Ecology* **57**: 707-19.
- Suberkropp K, Michelis A, Lorch HJ, Ottow JCG** (1988). *Effect of ph on leaf breakdown in freshwater ecosystems*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **17**: 56-594.
- Tan CS** (1997). *Preservation of fungi*. *Cryptogamie Mycol.* **18**: 157-163.
- Thompson PL e Bärlocher F** (1989). *Effect of ph on leaf breakdown in streams and in the laboratory*. *J. N. Am. Benthol. Soc.* **8**: 203-210.
- Waychunas GA, Kim CS, Banfield JF** (2005). *Nanoparticulate iron oxide minerals in soils and sediments: unique properties and contaminant scavenging mechanisms*. *J. Nanopart. Res.* **7**: 409-433.

**Weyers HS, Suberkropp K** (1996). *Fungal and bacterial production during the breakdown of yellow poplar leaves in 2 streams.* J. N. Amer. Benthol. Soc. **15**: 408-420.

**Xing B** (2001). *Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids.* Environ Pollut, **111**: 303-309.

**Zeng K, Hwang H-M, Zhang Y, Yu H** (2002). *Effect of dissolved humic substances on the photochemical degradation rate of 1-aminopyrene and atrazine.* Int JMol Sci **3**: 1048.