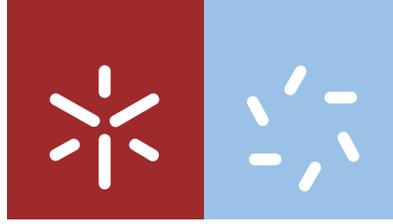




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Natália Lage de Carvalho Pereira

**Efeitos interativos de microplásticos
e ciprofloxacina nos decompositores
microbianos aquáticos**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Natália Lage de Carvalho Pereira

**Efeitos interativos de microplásticos
e ciprofloxacina nos decompositores
microbianos aquáticos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

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

julho 2021

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial
CC BY-NC

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

Agradecimentos

Agradeço a Prof. Fernanda Cássio e Daniela Batista por ter me aceitado com aluna, pela orientação, incentivo, confiança e paciência em me ensinar tanto.

A todos meus professores e colegas, pois sempre tiveram tanta disposição em me ajudar nas minhas muitas limitações (inclusive na língua, porque não é tão simples quanto parece!), e por muitas vezes não me deixarem desistir.

Aos meus pais Isabel e Santareno, por acreditarem em mim, por sempre me apoiarem em meus estudos e em minha vida. Que quando falei que ia fazer um mestrado fora do país não mediram esforços para fazer isso acontecer! Para meus irmãos que estão sempre me apoiando, especialmente minha irmã que gosta mesmo é de implicar, e com todo amor perguntar: Natália já escreveu mais coisas? Não é fácil estar longe, mas sempre me senti amada por minha família.

Ao meu marido e companheiro de vida Plínio por seu amor e paciência comigo quando em momentos de angustia muitas vezes achava que não ia dar conta, que não era capaz, pele sempre me mostrava o contrário. Por meus filhos, que tanto amo e estão sempre me dando amor e força. Por eles sempre ficarem felizes comigo, por gostarem de me levar na universidade, por ver meus gráficos, minhas anotações e me acharem tão inteligente e falar: “nossa mãe quero aprender essas coisas igual você! Me ensina a fazer experiências de cientistas mãe?” Claro que eles não têm noção do tanto que isso era e é importante para mim. A Deus, pela benção de estar em outro país, por ter a certeza do Seu amor, por ver Sua mão em muitos momentos de minha vida sou extremamente grata.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Efeitos interativos de microplásticos e ciprofloxacina nos decompositores microbianos aquáticos

Resumo

Os fungos aquáticos desempenham um papel fundamental nos ecossistemas de água doce, pois estes microrganismos são os principais decompositores de matéria orgânica nestes ambientes lóticos altamente dinâmicos. A decomposição conduzida por estes fungos constitui o elo entre matéria alóctone da vegetação ribeirinha e o biota aquático. As ações antropogénicas, como o uso indiscriminado de plásticos e de antibióticos, que têm como destino final os sistemas aquáticos, podem afetar este grupo de fungos e alterar o processo de decomposição. Este estudo tem como objetivo avaliar os impactos dos microplásticos e do antibiótico ciprofloxacina no processo de decomposição da matéria orgânica vegetal por fungos aquáticos, avaliando a sua actividade e diversidade. Para tal, folhas de amieiro foram imersas num rio para possibilitar a colonização microbiana e após 11 dias foram expostas em microcosmos a microplásticos (MPs) e ciprofloxacina (CIP), individualmente ou em mistura. O nosso estudo mostrou que os MPs e a CIP alteram o processo de decomposição das folhas e alteram a composição da comunidade de espécies de fungos. O impacto destes contaminantes foi mais pronunciado na esporulação dos fungos onde se observou uma inibição com o aumento da concentração de MPs e de CIP sozinhos e em misturas. Uma estimulação da biomassa de fungos foi observada para tratamentos com a maior concentração de CIP e em misturas de MPs com CIP. Em relação à enzima β -glucosidase esta foi inibida para concentrações mais altas de CIP. O uso indiscriminado destes contaminantes podem promover impactos nas cadeias alimentares detritívoras, comprometendo o funcionamento dos ecossistemas de água doce.

Palavras-chave: Ciprofloxacina, decomposição da matéria orgânica, Hifomicetos aquáticos, microplásticos.

Interactive effects of microplastics and ciprofloxacin in aquatic microbial decomposers

Abstract

Aquatic fungi play a fundamental role in freshwater ecosystems, as these microorganisms are the main decomposers of organic matter in these highly dynamic lotic environments. Plant litter decomposition performed by these fungi constitutes the link between the allochthonous organic matter of the riverside vegetation and the aquatic biota. Anthropogenic pressures, such as the indiscriminate use of plastics and antibiotics that have aquatic systems as their final destination, can affect this group of fungi and the process of leaf litter decomposition. This study aims to evaluate the impacts of microplastics and the antibiotic ciprofloxacin on the leaf litter decomposition by aquatic fungi, and on their activity and diversity. For this, alder leaves were immersed in a stream to promote microbial colonization and after eleven days the leaves were exposed in microcosms to microplastics (MPs) and ciprofloxacin (CIP), individually or in mixtures. Our study showed that MPs and CIP alter the decomposition process and the composition of fungal community. The impact of these contaminants was more pronounced in the fungal sporulation, where an inhibition was observed with the increase of MPs and CIP concentrations individually and in mixtures. A stimulation of the fungal biomass was observed for treatments with the highest CIP concentration and in mixtures. The β -glucosidase enzyme activity was inhibited at higher CIP concentrations. With the indiscriminate use of these contaminants, impacts on detritivorous food chains may arise, compromising the functioning of freshwater ecosystems.

Keywords: aquatic hyphomycetes, ciprofloxacin, leaf litter decomposition, microplastics.

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Capítulo 1	1
1 Introdução Geral.....	2
1.1 Decomposição da matéria orgânica alóctona nos ecossistemas de água doce: o papel do biota aquático.....	2
1.2 Contaminantes emergentes.....	4
1.3 Efeitos dos microplásticos e dos antibióticos no biota aquático.....	6
1.3.1 Efeitos dos microplásticos nos organismos.....	8
1.3.2 Efeitos dos antibióticos nos organismos.....	10
1.4 Objetivos e plano da tese.....	11
Capítulo 2	13
2.1 Introdução.....	14
2.2. Material e Métodos.....	16
2.2.1. Microplásticos e antibiótico ciprofloxacina.....	16
2.2.2. Local de recolha da comunidade de fungos.....	17
2.2.3. Preparação dos microcosmos.....	17
2.2.4. Decomposição das folhas.....	19
2.2.5. Actividade da enzima β -glucosidase.....	19
2.2.6. Esporulação e biomassa dos fungos.....	19
2.2.7. Análise estatística.....	20
2.3. Resultados.....	20
2.3.1 Caracterização dos microplásticos e da ciprofloxacina.....	20
2.3.2. Perda de massa das folhas.....	21
2.3.3 Enzima β -glucosidase.....	22
2.3.4 Biomassa de fungos.....	23
2.3.5 Esporulação e diversidade de fungos.....	24
2.4 Discussão.....	26

Capítulo 3	31
Considerações finais e perspectivas futuras	31
Referências	33

Figura 1 MPs extraídos do gel de banho (a, b); discos de folhas expostos em microcosmos a concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP; c, d, e) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP; e, f); a, b - 200 µm; c, e - 500 µm; d, f - 1 mm.....	21
Figura 2 Perda de massa das folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, p <0,05).	22
Figura 3 Actividade da enzima β-glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, p <0,05).	23
Figura 4 Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, p <0,05).	24
Figura 5 Taxa de esporulação das folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, p <0,05).	26

Tabela 1 Parâmetros físicos e químicos da água do rio Algeriz, utilizada na experiência do microcosmo.	17
Tabela 2 Tratamentos de microplástico (MP) e de antibiótico ciprofloxacina (CIP) em mg/L utilizadas na experiência de microcosmo. Cada tratamento possui 3 réplicas.	18
Tabela 3 Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias em microcosmos a diferentes concentrações de microplásticos (5, 50, 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). Misturas 1 a 12, respectivamente 5MP + 0,01CIP; 5MP + 0,1CIP; 5MP + 1CIP; 5MP + 10CIP; 50MP + 0,01CIP; 50MP + 0,1CIP; 50MP + 1CIP; 50MP + 10CIP; 500MP + 0,01CIP; 500MP + 0,1CIP; 500MP + 1CIP; 500MP + 10CIP.	25

Capítulo 1

Introdução Geral

1 Introdução Geral

1.1 Decomposição da matéria orgânica alóctona nos ecossistemas de água doce: o papel do biota aquático

Nos ecossistemas de água doce, a decomposição da matéria orgânica é um processo chave em que os fungos, as bactérias e os invertebrados detritívoros são responsáveis pela reciclagem dos nutrientes (Kubicek & Druzhinina, 2007). A principal fonte de matéria orgânica em rios florestados de baixa ordem é alóctone e é constituída principalmente por detritos de plantas, incluindo folhas e galhos, que entram nos rios e podem ser usados pela biota dos rios, armazenados ou transportados dependendo do tipo de rio (Larrañaga et al., 2003). Nos rios, a decomposição da matéria orgânica ocorre em três fases distintas: i) a lixiviação, que se caracteriza por uma perda abiótica substancial (até 30%) de substâncias solúveis, como compostos fenólicos, carboidratos e aminoácidos, e que ocorre de 24 horas até 7 dias após a imersão das folhas no rio (Canhoto & Graça, 1996; Casas & Gessner, 1999); ii) o condicionamento, que corresponde à colonização e crescimento de microrganismos nas folhas (Graça, 2001); e iii) a fragmentação física e biótica (Cláudia Pascoal et al., 2003). Embora estas fases tendam a ocorrer sequencialmente, a decomposição da matéria orgânica é um processo complexo e algumas dessas fases podem ocorrer simultaneamente (Casas & Gessner, 1999). Sendo assim, o material vegetal original é transformado em vários produtos, incluindo biomassa microbiana, matéria orgânica particulada fina (FPOM), matéria orgânica dissolvida (DOM), nutrientes inorgânicos e dióxido de carbono (Casas & Gessner, 1999).

A decomposição da matéria orgânica é um processo complexo que pode ser afetado por diversos fatores como, por exemplo, a temperatura, a humidade e o oxigénio. A temperatura é fundamental para a decomposição da matéria orgânica, pois acelera o metabolismo dos organismos. Já a humidade está relacionada com um ambiente adequado para a proliferação de fungos e bactérias, para além de gerar um ambiente propício para germinação de esporos; e o oxigénio permite que ocorra a respiração celular, fundamental para os decompositores aeróbicos. Alguns microrganismos intervêm, sobretudo no início do processo de decomposição, como é o caso dos fungos, enquanto que outros colonizam o material numa fase posterior, como é o caso das bactérias, o que se relaciona com as suas capacidades metabólicas e com as características do substrato (Suberkropp & Weyers, 1996).

Algumas atividades humanas, como por exemplo, a agricultura e a urbanização, podem levar ao enriquecimento de nutrientes nos rios, causando um impacto nos fungos aquáticos, nomeadamente nos hifomicetos aquáticos. Em geral, os nutrientes em concentração baixa ou moderada tendem a estimular a atividade dos fungos (Cláudia Pascoal et al., 2001, 2003), porém, a concentrações elevadas, podem conduzir à eutrofização e à diminuição de oxigénio e, por isso, os seus efeitos nos ecossistemas aquáticos são difíceis de prever (Duarte et al., 2004).

Os hifomicetos aquáticos são fungos que estão entre os decompositores microbianos que desempenham um papel dominante na decomposição da matéria orgânica, e transferem nutrientes e energia para níveis tróficos superiores em redes alimentares aquáticas (Baldy et al., 2002; da Costa et al., 2016; Duarte et al., 2004). Este facto deve-se à sua capacidade de esporular em ambientes aquáticos e de colonizar os detritos vegetais (folhas e galhos) provenientes da vegetação ribeirinha (Sridhar et al., 2005). O sucesso dos hifomicetos aquáticos deve-se também às suas adaptações morfológicas e fisiológicas. As altas taxas de produção e germinação dos esporos, bem como suas formas (tetra radiada ou sigmóide) e a mucilagem produzida pelos braços dos esporos permitem sua dispersão e ligação eficientes a novos substratos (Read et al. 1992). Estes fungos têm capacidade de estarem ativos a baixas temperaturas, tornando-se, assim, bem adaptados em climas temperados no inverno (Suberkropp 1998). A maioria das espécies de hifomicetos aquáticos é capaz de produzir uma variedade de enzimas extracelulares com capacidade de degradar polissacarídeos complexos das paredes celulares das plantas, incluindo celulose, linhina e pectina, tornando-as fontes apropriadas de carbono para outros organismos (Suberkropp 1998). A diversidade dos fungos aquáticos é afetada por atividades humanas, como a exploração mineira (Sridhar et al., 2001, 2005), a eutrofização (Claudia Pascoal et al., 2005) e as mudanças na vegetação ribeirinha (Lecerf & Chauvet, 2008). Alguns estudos apontam para a taxa de esporulação dos fungos como um bom indicador da qualidade ecológica dos ecossistemas aquáticos (Lecerf & Chauvet, 2008; Cláudia Pascoal et al., 2003). Os hifomicetos aquáticos são documentados principalmente em rios e ribeiros limpos (Barlocher, 1992), mas também foram encontrados em rios, riachos e ribeiros afetados pela poluição (Claudia Pascoal et al., 2005; Sridhar et al., 2001).

Alguns estudos sobre os impactos de compostos tóxicos como nanopartículas ou metais demonstraram que o processo de decomposição de matéria orgânica é afectado pela sua presença. Por exemplo, estudos com nanopartículas de prata demonstraram que este processo é inibido, provavelmente devido a uma inibição da produção de biomassa microbiana e da esporulação de fungos (Pradhan et al., 2012). Altas concentrações de metais na água dos rios inibem fortemente a esporulação dos fungos

(Niyogi et al., 2001; Sridhar et al., 2001), a atividade microbiana, e a diversidade fúngica (Baudoin et al., 2008; Niyogi et al., 2001, 2002; Sridhar et al., 2001, 2005) e podem promover mudanças na estrutura de comunidades microbianas associadas com a matéria orgânica (Batista et al., 2012). Os metais, acima de certos níveis, podem causar anomalias no comportamento alimentar e no crescimento de macroinvertebrados (Felten et al., 2008; Stuhlbacher & Maltby, 1992; Tessier et al., 2000; Wang et al., 2009). Por exemplo, o cádmio (Cd) é considerado um dos metais mais tóxicos e é relatado como sendo tóxico para muitos organismos aquáticos, incluindo o zooplâncton, mesmo em microgramas por litro, e pode acumular-se nos organismos aquáticos (Alquezar, 2006).

Os fungos, como todos os organismos vivos, desenvolveram um conjunto de mecanismos que controlam e respondem à absorção e acumulação de metais. Por exemplo, *Flagellospora curta*, é uma espécie de hifomiceto aquático que tem sido consistentemente encontrada na decomposição de folhas em rios poluídos no noroeste de Portugal (Duarte et al., 2004; Pradhan et al., 2012). A presença desta espécie em locais poluídos por metais, onde outras espécies amplamente distribuídas não aparecem, sugere que esta espécie deve ter mecanismos para lidar com a toxicidade do metal. Em contraste, *Fontanospora fusiramosa*, uma espécie que tem estado restrita a rios limpos (Claudia Pascoal et al., 2005), pode estar ausente de locais poluídos por metal devido à baixa tolerância a metais (Guimarães-Soares et al., 2007).

A poluição é considerada uma das maiores causas de perda da biodiversidade aquática (Dang et al., 2009). Alguns estudos identificaram como principais fontes de poluição a descarga de efluentes domésticos e industriais não tratados, e a libertação de pesticidas devido à agricultura intensa (Dang et al., 2009).

1.2 Contaminantes emergentes

A expressão “contaminantes emergentes” é uma alusão a contaminantes que estão presentes em baixas concentrações nos ecossistemas aquáticos e não são removidos ou eliminados pelos processos tradicionais de tratamento de águas (Montagner et al., 2017) Entre esses contaminantes temos, por exemplo, as hormonas, as hormonas sintéticas, os anticoncepcionais, os inseticidas, os antibióticos, os herbicidas, os bactericidas, constituintes de produtos de limpeza e de higiene pessoal e dos protetores solares, os microplásticos, os produtos de cloração e de ozonização de águas. A proliferação de contaminantes emergentes em rios e reservatórios é resultado do crescimento das cidades e de novos processos industriais (Montagner et al., 2017) e estas substâncias podem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana. Os contaminantes emergentes têm-se tornado alvo de estudo pelo

crescente uso de produtos que os contêm e, conseqüentemente, o descarte ou eliminação no meio ambiente, principalmente nos cursos de água (Américo et al., 2012).

Atualmente, sabe-se pouco sobre os efeitos destes contaminantes nos organismos aquáticos, embora alguns deles sejam classificados como substâncias ou misturas exógenas que alteram a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos nos organismos, ou na sua descendência. Muitos dos efeitos são atribuídos à exposição crônica a estes compostos que ocorrem em concentrações extremamente baixas, principalmente em matrizes aquáticas, na ordem dos nanograma a picograma por litro, o que torna ainda mais complexa a análise de avaliação de risco na preservação da vida aquática e da saúde humana (Montagner et al., 2017).

Dos poluentes emergentes mais presentes nos ambientes aquáticos, os fármacos recebem cada vez mais atenção devido à sua capacidade de persistência no ambiente e aos possíveis efeitos que podem causar aos seres humanos e no biota (Ghiselli & Jardim, 2007). Os antibióticos pertencem a uma classe de fármacos mais usados, pois são amplamente prescritos para uso terapêutico e profilático contra, por exemplo, as infecções microbianas (Torres, 2012). A presença de fármacos na água pode causar efeitos adversos na saúde, seja humana ou de organismos aquáticos, como por exemplo, os peixes. Existem alguns estudos que indicam alguns efeitos causados no sistema reprodutor de organismos aquáticos (Gimeno et al., 1998; Joon Kang et al., 2002). Sumpter, (1998) descreve a feminização de peixes expostos a estrogênios lançados nos rios através dos efluentes de estações de tratamento de águas residuais.

Atualmente, existe uma preocupação no desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para a quantificação de fármacos residuais em ambientes aquáticos, com limites de detecção na ordem de micro ($\mu\text{g/L}$) e nano (ng/L) gramas por litro (Alder et al., 2001; Hirsch et al., 1998; Ternes et al., 2001; Ternes, 2001). Mesmo em baixas concentrações, estes compostos podem causar impacto ambiental (Bila & Dezotti, 2003). Um ponto crítico é saber se existe um nível elevado dessas substâncias no meio ambiente, que seja suficiente para exercer efeitos adversos nos seres vivos. Esta questão estimula o desenvolvimento de estudos de impacto ambiental causado por diferentes fármacos presentes no meio ambiente. Dados ecotoxicológicos têm sido obtidos por investigadores para identificar fármacos que são potencialmente perigosos para o meio ambiente, porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes. A ocorrência desses fármacos em concentrações residuais em águas superficiais e no subsolo demonstra uma maior necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos desses fármacos no meio ambiente (Bila & Dezotti, 2003).

Outra preocupação é a presença de microplásticos (MPs) no meio aquático, relatada em diversos estudos. Os MPs estão presentes em todo o mundo e no nosso cotidiano de diferentes formas, nomeadamente em produtos de consumo humano, como alimentos, bebidas, produtos de higiene e de beleza, o que tem gerado crescentes preocupações na comunidade científica (Boerger et al., 2010; Hidalgo-Ruz et al., 2012; Van Cauwenberghe & Janssen, 2014).

No ambiente natural, os efeitos dos MPs estão a ser estudados nos ecossistemas aquáticos, em sedimentos e também a sua interação com o biota. As pesquisas mais recentes têm relatado também a presença deste contaminante no ar (Hartmann et al., 2017; Horton et al., 2017). Vários estudos mostram que os MPs foram observados em ecossistemas de água doce da América do Norte, Europa e Ásia (Dris et al., 2016). É importante considerar que os rios contribuem para o transporte de aproximadamente 80% dos resíduos sólidos presentes no oceano (Andrady, 2011), sendo extremamente relevante a investigação dos efeitos dos MPs nos ecossistemas de água doce (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). Além disso, do ponto de vista da saúde humana, pode considerar-se a contaminação da água doce por MPs alarmante, dado a dependência do consumo de água potável pela população e de alimento com origem em ambientes aquáticos que podem estar contaminados (Schymanski et al., 2018).

Os efeitos causados pela contaminação por MPs ainda são objeto de estudos por muitos grupos de investigação no mundo, seja pelo efeito físico que podem causar nos organismos, seja pela capacidade de se tornarem um vetor de transporte de outros contaminantes. Contudo, alguns estudos mostram que os fungos são capazes de usar plásticos como única fonte de carbono (Russell et al., 2011; Yamada-Onodera et al., 2002), inclusive em matrizes sólidas, como o solo (Bhardwaj et al., 2013), destacando assim o potencial uso desses organismos na biorremediação de plásticos, uma vez que esta é uma preocupação crescente em sistemas aquáticos (Cole et al., 2011; da Costa et al., 2016).

1.3 Efeitos dos microplásticos e dos antibióticos no biota aquático

Uma vez no ambiente, os MPs não são removidos de forma efetiva, pois são materiais muito fáceis de se dispersar, e danos ecológicos seriam causados por processos deremediação, uma vez que pequenos organismos provavelmente seriam removidos juntamente com os MPs, para além dos custos serem altos (UNEP, 2005). Como o plástico é altamente resistente à degradação, presume-se que sua abundância nos sistemas aquáticos continue a aumentar, fazendo com que a probabilidade de ingestão pela biota também aumente (Thompson et al., 2004).

Vários problemas estão associados à acumulação de MPs no meio ambiente: i) os polímeros geralmente possuem compostos bioativos que são libertados para o ambiente; ii) os MPs podem ser confundidos com o alimento por animais, como os peixes, podendo causar efeitos adversos em toda a cadeia alimentar; e iii) capacidade dos MPs de se tornarem um vetor de transporte de outros contaminantes. Assim, quando disponível no ambiente, os nano e os microplásticos, podem interagir com os organismos através da ingestão, atravessando as barreiras biológicas, penetrando e acumulando-se nos tecidos e órgãos. Como consequência da ingestão de tais partículas citam-se os efeitos toxicológicos, devido à permanência de poluentes orgânicos persistentes, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, éteres difenílicos polibromados e bifenilos policlorados, além de outros efeitos adversos, como a inibição de crescimento, desordens comportamentais e alimentares, disfunção reprodutiva, viabilidade reduzida, mobilidade e até mesmo a morte (Chae & An, 2017; da Costa, 2018; Ma et al., 2016). De acordo com Mendoza et al., (2018) os MPs são os polímeros sintéticos mais persistentes em ambientes aquáticos, causando efeitos deletérios em organismos aquáticos. De modo geral, estes contaminantes quando presentes em ambientes diversos podem desequilibrar a cadeia alimentar e, por conseguinte, afetar a saúde humana.

Além dos MPs presentes no biota aquático, o uso indiscriminado de antibióticos é preocupante, não só devido à falta de sistemas específicos de tratamento de água e esgotos que removam esses contaminantes, como os seus efeitos na biota aquática e na saúde humana são pouco conhecidos. Existem três vias principais de entrada dos antibióticos em águas doces: i) efluentes de Estações de Tratamento de Efluentes (ETARs), ii) fábricas de produtos químicos e iii) pecuária e agricultura (Klaus Kümmerer, 2009; Nathan & Cars, 2014). Estudos indicam que o consumo de antibióticos em todo o mundo se situa entre 100.000 e 200.000 toneladas por ano, com aproximadamente 50% a ser usado na medicina veterinária e como promotores de crescimento animal (Wise, 2002). O consumo global de antibióticos por humanos aumentou 36% entre 2000 e 2010, o que ilustra que a poluição por antibióticos é um problema cada vez maior (Van Boeckel et al., 2014).

Em sistemas de descarte de águas residuais, os antibióticos podem ser eliminados por meio da retenção na lama e / ou degradação biótica e abiótica. No entanto, é frequente que os antibióticos e os seus metabolitos acabem por entrar águas doces. A proporção do composto original excretado via efluentes da ETAR pode diferir muito entre os antibióticos e o processo usado (Whitacre, 2015), mas foi referido que aproximadamente 70% da quantidade consumida de antibióticos foi excretada inalterada de hospitais e de efluentes domésticos na Alemanha (Kümmerer, 2003). O comportamento de adsorção de antibióticos (isto é, o que eles absorvem preferencialmente na fase sólida) também pode

ser muito complexo. Por exemplo, as fluoroquinolonas tornam-se altamente enriquecidas nas lamias de esgotos (Giger et al., 2003), enquanto no caso das sulfonamidas verificou-se que a eliminação por adsorção a partículas do solo é um processo significativo, o que significa que são preferencialmente encontradas em águas residuais (Heise et al., 2006).

Os antibióticos têm diferentes efeitos sobre o meio ambiente, e um deles é a contribuição para o aparecimento de bactérias resistentes, assunto que tem sido muito discutido (Kolář et al., 2001; Miranda & Castillo, 1998; Witte, 2000). Segundo Beere et al., (2010), há indícios de que o desenvolvimento de resistência aos antibióticos é favorecida por baixas concentrações de antibióticos. Miranda & Castillo(1998) investigaram a incidência de resistência microbiana em uma espécie de *Aeromonas* isolada de ambientes aquáticos, constatando que a resistência ocorreu para vários antibióticos, dentre esses, o cloranfenicol, o trimetopim, o sulfametoxazol e a tetraciclina.

1.3.1 Efeitos dos microplásticos nos organismos

Os plásticos têm uma grande variedade de impactos na vida aquática, embora os efeitos negativos associados aos MPs ocorram principalmente devido à sua ingestão (Andrady, 2011). Alguns efeitos relatados da ingestão de MPs em diferentes organismos aquáticos sugerem a redução do crescimento (Lo & Chan, 2018), reservas de energia diminuídas (Wright et al., 2013) e a função endócrina alterada (Rochman et al., 2014). Além dos impactos físicos da ingestão de MPs, há vários compostos orgânicos persistentes tóxicos associados aos MPs que demonstraram acumular-se nos tecidos gordos dos organismos marinhos (Batel et al., 2016). O pesticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) e os produtos de decomposição associados são alguns dos poluentes mais comuns encontrados absorvidos na superfície dos plásticos recolhidos nas águas costeiras (Van et al., 2012). A implicação de contaminantes associados a MPs na transferência trófica em ecossistemas de água doce é ainda pouco conhecida. Batel et al.(2016) investigaram a transferência trófica de MPs num sistema de água doce como uma via de exposição a poluentes associados a MPs, e verificaram que os MPs podem atuar como um veículo para a exposição de poluentes em peixes adultos de água doce e suas presas. A transferência de contaminantes e a sua consequente ingestão por organismos pode dar-se por diferentes mecanismos como inalação, absorção dérmica e ingestão. Nos organismos em contacto com plásticos contaminados, essas três opções são viáveis de acordo com o ambiente e os hábitos dos mesmos, porém a maior rota de transferência de contaminantes presentes nos plásticos será a ingestão (Teuten et al. 2009). A ingestão de plástico pode ser direta, como por exemplo, em tartarugas, mamíferos e aves marinhas (Laist, 1997) ou indireta, onde os organismos se alimentam de outros

organismos que ingeriram anteriormente o MP (Eriksson e Burton, 2003). Essa ingestão pode causar problemas físicos, como a inanição, o bloqueio do trato gastrointestinal e o sufocamento, que em geral são causadas por macrolásticos. Outra causa menos estudada dos impactos dos plásticos ingeridos por organismos aquáticos é o da transferência dos contaminantes para os tecidos. A liberação dos contaminantes parece ser mais propícia em ambiente gástrico (Sakai et al., 2000) e a correlação entre a quantidade de plástico ingerida e o grau de contaminação dos organismos (Ryan et al., 1988) levam-nos a crer na transferência dos contaminantes nos organismos aquáticos mediada por plásticos.

Dentre os organismos detritívoros, Thompson et al.(2009) observaram a ingestão de MPs no anfípoda *Orchestia gammarellus* e no poliqueta *Arenicola marina*. Segundo Murray & Cowie(2011) estes poderiam ser, em princípio, consumidores primários de MPs. Os mesmos autores também observaram, em laboratório, a ingestão de fragmentos pelo crustáceo predador e bentônico, *Nephrops norvegicus*. Nos organismos filtradores, como as larvas de equinodermos, capturam e ingerem MPs graças à presença de células ciliadas em torno de suas bocas (Hart, 1991) e copépodes como *Arcadia tonsa* (Wilson, 1973) ingerem MPs durante sua alimentação, em laboratório. Os organismos filtradores bentônicos também são susceptíveis à sua ingestão: *Mytilus edulis*, um organismo filtrado muito estudado, filtra e ingere partículas plásticas de diversos tamanhos (Browne et al., 2008; Ward & Targett, 1989; Ward et al., 2003; Ward & Kach, 2009).

Cedervall et al.(2012) mostraram que nanopartículas de poliestireno, fabricadas comercialmente, são transportados através da cadeia alimentar de algas, que posteriormente são ingeridos por zooplâncton e finalmente por peixes, afetando o seu comportamento e metabolismo lipídico. Os efeitos tóxicos dos nano e microlásticos, vêm sendo estudados desde a década de 80, caracterizando seus danos letais e subletais em algas, organismos ciliados, invertebrados, crustáceos, peixes e zooplâncton (Chae & An, 2017). Prata(2018) menciona que os MPs reduzem o processo fotossintético e o crescimento de microalgas, provocando efeitos negativos na cadeia alimentar de zooplâncton, que por sua vez que acumulam os MPs e possivelmente provoca sequelas em brânquias, estômago e hepatopâncreas de caranguejos e induz alterações nos tecidos e nos biomarcadores de peixes.

Em síntese, a parcela lançada no ambiente, principalmente os plásticos de dimensões nano e micro, têm causado grandes prejuízos ao meio ambiente, nomeadamente à ecologia, à economia e à saúde pública. Complementarmente, devido à falta de informação sobre a toxicologia dos nanoplásticos, restringe-se o uso deles para certas aplicações, que estão diretamente em contato com seres humanos, como a inclusão em cosméticos, detergentes e alimentos, a fim de prevenir potencial de

toxicidade dos nanoplásticos e seus efeitos adversos secundários de longo prazo (Schirinzi et al., 2017).

1.3.2 Efeitos dos antibióticos nos organismos

Os antibióticos são drogas antimicrobianas que matam ou inibem o crescimento de bactérias. Existem vários tipos de antibióticos que podem ser classificados com base em seus mecanismos de ação ou estrutura química. Estes têm sido usados em grandes quantidades por algumas décadas e a resistência dos organismos patogênicos aos antibióticos tem sido um ponto fulcral de pesquisas em ambientes clínicos e, nos anos mais recentes, em pesquisas ambientais. Os compostos originais de antibióticos e os metabolitos podem ser destruídos ou estáveis nos processos de tratamento de águas residuais e serem lançados no meio ambiente (Klaus Kümmerer, 2009) e, embora diluídos por um fator de mais de um milhão de vezes, em comparação com as concentrações no corpo humano (Jjemba, 2006), os antibióticos no meio ambiente podem ter consequências importantes para a saúde humana e para os ecossistemas.

Thiele-Bruhn (2003) e Sarmah et al.(2006) sintetizaram as principais referências sobre os efeitos de antibióticos farmacêuticos em organismos terrestres e aquáticos e em diferentes espécies de plantas. De modo geral, a maioria dos dados de toxicidade disponíveis na literatura avaliam efeitos agudos decorrentes da exposição a curto prazo, como por exemplo a letalidade, sendo que estes ensaios foram conduzidos no laboratório e, mais importante, em concentrações acima do que seria esperado em condições ambientais realistas (Sarmah et al., 2006). Portanto, efetivamente pouco se sabe sobre a ecotoxicidade derivada da exposição prolongada a baixas dosagens de antibióticos e, ou, a misturas de diversos resíduos, assim como se desconhecem os impactos causados pelos metabolitos, que também podem apresentar ação biocida, conforme verificado para os produtos de degradação da enrofloxacin e da tetraciclina (Sarmah et al., 2006).

Os testes de toxicidade aguda para espécies aquáticas foram conduzidos principalmente com crustáceos e peixes. As concentrações tóxicas situaram-se na gama de mg/L, ou seja, em concentrações muito acima daquelas normalmente encontradas nesse tipo de ambiente (ng ou µg/L) (Lanzky & Haning-Sorensen, 1997; Migliore et al., 1997). Por exemplo, para três espécies de algas, os antibióticos amoxicilina e sarafloxacin apresentaram concentrações tóxicas (CE_{50}) inferiores a 0,1 mg/L, enquanto as da sulfadiazina, flumequina, ácido oxolínico e oxitetraciclina situaram-se entre 0,1 e 1,0 mg/L (Holten Lützhøft et al., 1999). Wollenberger et al.(2000),ao avaliar a de nove antibióticos de uso veterinário (incluindo oxitetraciclina, tetraciclina, sulfodiazina e tilosina) em *Daphnia*

magna, não observaram efeitos agudos em concentrações ambientalmente relevantes. Os compostos mais tóxicos foram ácido oxolínico e a tiamulina, com valores de toxicidade (CE_{50} , 48 h) iguais a 4,6 e 40 mg/L, respectivamente. Efeitos tóxicos na reprodução (toxicidade crónica) foram observados para oxitetraciclina, sulfadiazina, tetraciclina e tiamulina, mas apenas em altas concentrações (5 a 50 mg/L). Segundo esses autores, a eventual ocorrência de efeitos tóxicos de antibióticos em crustáceos, na natureza, poderia ser consequência da ação desses resíduos nos organismos que fazem parte da cadeia alimentar desses animais, visto que a toxicidade dos antibióticos para bactérias e microalgas é duas a três ordens de magnitude inferiores àquela encontrada em níveis tróficos superiores.

Devido à ampla utilização, a ciprofloxacina (CIP) é um contaminante frequentemente encontrado nos compartimentos aquáticos. Este antibiótico foi encontrado em efluentes hospitalares em valores entre 2 e 11 $\mu\text{g/L}$ (Brown et al., 2006; Seifrtová et al., 2008), em efluentes de estações de tratamento de esgoto (<6 - 310 ng/L) (Brown et al., 2006; Seifrtová et al., 2008), bem como em águas superficiais, como por exemplo, no Rio Lambro (Itália) (14,4ng/L; (Calamari et al., 2003) e no Rio Mondego (Portugal) (79,6 - 119,2 ng/L). No entanto, apesar de detectada em amostras de água naturais, os efeitos ecotoxicológicos da ciprofloxacina para organismos não-alvo, não foram amplamente investigados (Santos et al., 2010). Trabalhos anteriores demonstraram que a CIP é extremamente genotóxica (Hartmann et al., 1997) e apresenta toxicidade aguda para a espécie de alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Grung et al., 2008). Alguns estudos foram realizados com a espécie *Daphnia magna* (e.g. Martins et al., 2012; Wollenberger et al., 2000).

1.4 Objetivos e plano da tese

Este estudo tem como objetivo estudar os impactos dos microplásticos e do antibiótico ciprofloxacina no processo de decomposição da matéria orgânica por fungos aquáticos.

O Capítulo 1 fornece uma visão geral sobre: 1) a decomposição da matéria orgânica em rios e ribeiros e o biota associado, 2) contaminantes emergentes e, 3) como os microplásticos e antibióticos podem afetar o biota aquático. No capítulo 2, apresentam-se os resultados de uma experiência em microcosmo para avaliar os efeitos de microplásticos e da ciprofloxacina nos fungos, especificamente nos hifomicetos aquáticos. Para tal, folhas de amieiro foram imersas num rio para permitir a colonização microbiana antes de serem expostos, em microcosmos a diferentes concentrações de microplásticos e ciprofloxacina, individualmente e em misturas. Os parâmetros funcionais avaliados

foram: perda da massa das folhas, biomassa e reprodução de fungos, contando os esporos libertados das folhas em decomposição, e a actividade da enzima β -glucosidase.

Capítulo 2

Efeitos interativos de microplásticos e ciprofloxacina nos decompositores microbianos aquáticos

2.1 Introdução

O aumento acelerado da produção e do uso de plásticos nas últimas décadas leva-nos a inúmeras preocupações ecológicas e económicas. O uso exagerado em embalagens, transporte, indústria e agricultura, em áreas rurais e urbanas, tem levantado sérios problemas de descarte dos plásticos. A difícil biodegradação no meio ambiente dos polímeros sintéticos que constituem os plásticos representa uma grande ameaça para os sistemas ecológicos naturais. O grande uso de plásticos é facilitado pelo seu baixo custo, durabilidade e facilidade de produção. E mesmo sabendo dos problemas de poluição causados por plásticos, a sua produção continua a aumentar em larga escala (Russell et al., 2011). Em 2019, a produção global de plásticos atingiu quase 370 milhões de toneladas e na Europa, a produção chegou a quase 58 milhões de toneladas. (PlasticsEurope, 2020). A China atingiu 31% da produção mundial de plásticos em 2019 e em 2018, 9,4 milhões de toneladas de resíduos plásticos pós-consumo foram recolhidos na Europa para serem reciclados (dentro e fora da UE) (PlasticsEurope, 2020).

Os plásticos podem entrar nos cursos de água através dos sistemas de drenagem, vazamento de esgotos durante eventos de chuvas intensas (Browne et al., 2010; Eriksen et al., 2013), ou até mesmo por estruturas desenvolvidas, como docas e cais (Ryan et al., 2009). Os microplásticos (MPs) podem entrar no meio aquático através de libertação direta (Browne et al., 2010). Microesferas de polietileno e polipropileno, usadas em muitos produtos de limpeza facial, foram identificadas como possíveis contribuintes para a poluição aquática (Fendall & Sewell, 2009; Gregory, 1996). As instalações de lavagens de têxteis também são fontes potenciais de fibras de MPs e partículas microplásticas suspeitas de poluir o ambiente aquático desde o início da década de 1990 (Gregory, 1996).

Os MPs também podem formar-se pela degradação e fragmentação de grandes itens plásticos por fatores abióticos como a luz ou temperatura (Cole et al., 2011), ou por abrasão de danos causados por veículos e transporte, em componentes tóxicos, contaminando o solo e a água. Os MPs podem ser ingeridos pelos animais e, portanto, entrar na cadeia alimentar, especialmente nos meios aquáticos. Pesquisas realizadas mostraram a ingestão de partículas de MPs em uma ampla gama de espécies de vários níveis tróficos e com diferentes estratégias de alimentação, incluindo detritívoros, filtradores e predadores (Browne et al., 2008). Além da acumulação de partículas nos organismos a níveis tróficos mais baixos, há também evidências de transferência trófica de partículas de MPs entre espécies marinhas, especialmente em bivalves e crustáceos (Farrell & Nelson, 2013; Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). A ingestão de MPs foi relatada numa ampla gama de organismos, incluindo o zooplâncton, que está na base da cadeia alimentar (Cole et al., 2013; Desforges et al., 2015; Long et

al., 2015). Isto representa um risco não só físico inerente aos MPs, mas também pela possível presença de contaminantes e poluentes que aderem ou são adsorvidos aos plásticos, o que pode levar a fenómenos de bioacumulação e bioamplificação (da Costa et al., 2016).

Além dos MPs presentes no biota aquático, o uso indiscriminado de antibióticos é preocupante pois, para além da falta de sistemas específicos de tratamento de água e esgotos que removam esses contaminantes, os seus efeitos no biota aquático e na saúde humana são pouco conhecidos (Bower & Daeschel, 1999). Alguns antibióticos são particularmente problemáticos em termos de sua ocorrência em águas doces e a sua toxicidade. Embora alguns dos antibióticos que afetam os organismos não sejam encontrados com frequência no ambiente, outros como a ciprofloxacina e a ofloxacina, podem ser encontrados em concentrações relativamente altas nas águas doces (Beek der aus et al., 2016; Feitosa-Felizzola & Chiron, 2009), e estão entre os antibióticos mais potentes em baixas concentrações (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016). A ciprofloxacina (CIP) foi identificada como um dos antibióticos de particular preocupação em ambientes aquáticos do Reino Unido, Dinamarca, Suécia, França, Espanha, e EUA (Besse & Garric, 2008; Castensson et al., 2009; Dong et al., 2013; Hughes et al., 2013; Jones et al., 2002; Kaplan, 2013; Lienert et al., 2007; Ortiz de García et al., 2013). A classificação de alto risco deste antibiótico específico tem sido associada ao seu consumo, descarga, persistência e propriedades tóxicas.

Em ecossistemas de água doce um dos processos chave para a manutenção dos fluxos de matéria e energia é a decomposição da matéria orgânica (Fellows et al., 2006). Este é um processo realizado por decompositores, como bactérias, fungos e invertebrados, que em conjunto, são essenciais para o funcionamento do ecossistema, disponibilizando nutrientes de origem alóctone ao biota aquático. Os fungos aquáticos são os intermediários entre estruturas vegetais (folhas e galhos) e invertebrados detritívoros, incrementam a qualidade nutricional dos detritos e degradam polímeros vegetais (celulose, hemicelulose) e, por isso, aumentam a palatabilidade para os invertebrados (Canhoto & Graça, 1996). Geralmente, os efeitos dos stressores ambientais são testados individualmente, embora os ecossistemas estejam expostos a vários tipos de stressores simultaneamente, sendo que os impactos sobre a biodiversidade e os processos do ecossistema são difíceis de prever (Ferreira & Chauvet, 2011; Vinebrooke et al., 2004). Por isso, o principal objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos de microplásticos (MPs) e do antibiótico ciprofloxacina (CIP) na actividade e diversidade dos fungos e no processo de decomposição da matéria orgânica. Para tal, folhas de amieiro foram imersas num rio para permitir a colonização microbiana e, posteriormente, exposta em microcosmos a diferentes concentrações de MPs e CIP, individualmente e em misturas. Os parâmetros funcionais avaliados

foram: perda da massa de folhas, biomassa e reprodução de fungos, e a actividade da enzima β -glucosidase.

É esperado que a presença de MPs e CIP provoque um estímulo na decomposição das folhas e na esporulação dos fungos, se os MPs constituírem uma fonte de nutrientes para os fungos aquáticos. Também se espera que a exposição das folhas aos MPs e CIP alterem a estrutura das comunidades de fungos, o que geralmente acontece na presença de outros contaminantes (Batista et al., 2020). Em relação à enzima β -glucosidase é esperado uma diminuição de sua atividade, como observado por Sinsabaugh et al. (1994), indicando que as atividades enzimáticas extracelulares podem ser um bom indicador do stress induzido por contaminantes como nanopartículas e metais (Batista et al., 2017b).

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Microplásticos e antibiótico ciprofloxacina

Os microplásticos (MPs) utilizados na experiência são de polietileno de baixa densidade (Alfa Aesar – Polyethylene, low density, ≤ 400 micron. powder(CH_2CH_2)). Os MPs foram observados no estereoscópio (Greenough stereo microscope, Leica S8 APO) com uma câmara de alta resolução (Leica MC170 HD) para verificar o tamanho. Após a classificação visual, a espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier-Refletância total atenuada (ATR-FTIR) foi utilizada para confirmar a composição do polímero das partículas. A análise foi realizada com um espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum Two™ IR com detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) e divisor de feixe KBr, acoplado com um acessório UATR (diamante de reflexão única). As partículas foram analisadas diretamente da embalagem devido à sua alta visibilidade a olho nu e facilidade de transferência para o cristal. O cristal foi limpo com papel e metanol e uma varredura de fundo realizada antes de cada partícula ser analisada. Os espectros de FTIR foram recolhidos à temperatura ambiente, na faixa de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando 64 scans. Os espectros resultantes foram processados no software e foram comparados com os espectros FTIR de polímeros comuns (polietileno, poliestireno, polipropileno, náilon, cloreto de polivinila) obtidos da biblioteca espectral.

O antibiótico utilizado foi a ciprofloxacina (CIP) (Ciprofloxacin $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

2.2.2. Local de recolha da comunidade de fungos

A recolha de microrganismos foi realizada num rio de baixa ordem no noroeste de Portugal (rio Algeriz, 41 ° 5863'N 8 ° 22513 'W). A vegetação ribeirinha era composta principalmente por amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) e o substrato do rio era composto por rochas e seixos.

A temperatura, o pH, a condutividade e o oxigénio dissolvido na água do rio foram medidas *in situ* usando uma sonda de campo multiparamétrica (Multiline F / set 3 no. 400327; WTW). Amostras de água do rio foram recolhidas e transportadas para o laboratório (4°C) e utilizadas para análises químicas. Determinou-se as concentrações de nitrito (Kit HACH, programa 371); nitrato (Kit HACH, programa 355), amónia (Kit HACH, programa 385); e fósforo (Kit HACH, programa 480) (Tabela 1). Amostras adicionais de água foram filtradas para reter sólidos suspensos e autoclavadas (120 ° C, 20 min) para as experiências de microcosmo.

Tabela 1 Parâmetros físicos e químicos da água do rio Algeriz, utilizada na experiência do microcosmo.

Parâmetros	Rio Algeriz
Temperatura (°C)	12,2
pH	6,7
Conductividade (µS/cm)	37
O ₂ dissolvido (%; mg/l)	124,5; 12,92
N-NO ₃ - (mg/l)	0,06
N-NO ₂ - (mg/l)	0,010
N-NH ₃ (mg/l)	0,01
P-PO ₄ - (mg/l)	0,03

2.2.3. Preparação dos microcosmos

Para os microcosmos foram utilizadas folhas de amieiro (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn), recolhidas de árvores no norte de Portugal, em setembro em 2015 antes da abscisão e, posteriormente, secas à temperatura ambiente. As folhas foram colocadas em água desionizada para lixiviar os compostos solúveis e cortadas em discos de 12 mm de diâmetro. Conjuntos de 60 discos foram colocados em sacos de rede de malha fina (0,5 mm) para evitar o acesso de pequenos invertebrados e depois submergidos no rio para permitir a colonização microbiana. Após 11 dias, os sacos foram retirados do rio, colocados numa caixa (4°C) e foram transportados para o laboratório. No laboratório, os discos de

folhas de cada saco foram lavados com água desionizada e colocados em frascos Erlenmeyer de 150 ml com 80 ml de água do rio.

Os microcosmos foram suplementados com MPs (5, 50 e 500 mg/L) e com CIP (0,01; 0,1; 1 e 10 mg/L), individualmente e também em misturas como se encontra na tabela 2, e para cada tratamento foram realizadas 3 réplicas. Microcosmos sem MPs e CIP foram usados como controle. Os 60 microcosmos foram colocados com agitação constante a 120 rpm por 28 dias e à temperatura de 16 °C. A água foi trocada a cada 7 dias e as suspensões de esporos foram guardadas para a posterior identificação e contagem de esporos dos fungos aquáticos.

Tabela 2 Tratamentos de microplástico (MP) e de antibiótico ciprofloxacina (CIP) em mg/L utilizadas na experiência de microcosmo. Cada tratamento possui 3 réplicas.

Tratamento	Concentrações (mg/L)
5 MP	5
50 MP	50
500 MP	500
0,01 CIP	0,01
0,1 CIP	0,1
1 CIP	1
10 CIP	10
5 MP + 0,01 CIP	5 + 0,01
5 MP + 0,1 CIP	5 + 0,1
5 MP + 1 CIP	5 + 1
5 MP + 10 CIP	5 + 10
50 MP + 0,01 CIP	50 + 0,01
50 MP + 0,1 CIP	50 + 0,1
50 MP + 1 CIP	50 + 1
50 MP + 10 CIP	50 + 10
500 MP + 0,01 CIP	500 + 0,01
500 MP + 0,1 CIP	500 + 0,1
500 MP + 1 CIP	500 + 1
500 MP + 10 CIP	500 + 10

2.2.4. Decomposição das folhas

Os discos de folhas de cada microcosmo foram liofilizados (Christ alpha 2–4; B. Braun, Melsungen, Alemanha) durante aproximadamente 48h e em seguida pesados. Conjuntos de discos não colonizados foram utilizados para estimar o peso da massa inicial das folhas.

2.2.5. Actividade da enzima β -glucosidase

Uma vez que a enzima β -glucosidase está envolvida na degradação da celulose pelos fungos, a sua atividade foi medida para avaliar o efeito dos MPs e do antibiótico nos fungos. Foi utilizado o substrato fluorescente, 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside (MUF; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) seguindo o protocolo de Romani et al. (2006). Colocaram-se dois discos de folhas colonizadas em tubos de falcon de 15 mL com 4 mL de água e o substrato MUF da enzima foi adicionado a uma concentração final de 0,3 mM. Foram feitas soluções controlo (sem discos de folhas e sem substrato), e os padrões de MUF (0–100 μ M; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) preparados com água estéril. As amostras foram colocadas a agitar por 1h no escuro. Em seguida foi adicionado o tampão glicina (0,05 mM, pH 10,4; 4 mL) a cada amostra para parar a reação enzimática e maximizar a fluorescência de MUF. A fluorescência foi medida a 455 nm e a 365 nm (Spectra Max Plus 384, Molecular Devices, Sunny Vale, CA, USA).

2.2.6. Esporulação e biomassa dos fungos

Foram recolhidas amostras de água dos microcosmos, contendo esporos libertados pelos fungos que estavam nas folhas em decomposição. As suspensões de esporos foram fixadas com formaldeído (concentração de 2%) e para evitar a aderência dos esporos aos frascos foi adicionado Triton X-100. As suspensões com esporos foram filtradas (membranas com tamanho de poro de 0,45 μ m, Millipore), e os esporos corados com azul de algodão a 0,05% em ácido láctico. Aproximadamente 300 esporos por filtro foram identificados e contados num microscópio óptico (ampliação 40x), para determinar a contribuição de cada espécie de fungos aquáticos para a produção total de esporos.

A biomassa dos fungos foi quantificada a partir da concentração de ergosterol nas folhas seguindo o protocolo Gessner (2005). Foram usados 6 discos de folhas dos quais os lipídios foram extraídos em 0,8% de solução KOH-metanol e aquecidos a 80 graus por 30 min. O ergosterol foi eluído em isopropanol e quantificado usando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, UltiMate3000 LCSystems, Thermo Scientific, CA, USA) com detecção do pico de ergosterol à absorvância de 282

nm. A eficiência de extração foi monitorizada usando uma série padrão de ergosterol (Fluka) em isopropanol.

2.2.7. Análise estatística

Para testar os efeitos dos microplásticos e do antibiótico na perda da massa das folhas, biomassa fúngica, actividade da enzima extracelular e na reprodução foram realizadas Two-way ANOVAs (Zar 1996). Os dados tiveram uma distribuição normal e, portanto, não foi necessária nenhuma transformação. Diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos foram analisadas pelo pós-teste Bonferroni post-hoc (Zar, 2010). A normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e F, respectivamente. O programa Graph Pad Prism 8 (GraphPad software Inc., San Diego, CA) foi usado para todos os testes estatísticos descritos acima.

2.3. Resultados

2.3.1 Caracterização dos microplásticos e da ciprofloxacina

Os espectros gerados a partir da análise de partículas de MPs foram comparados com os espectros de polímeros comuns (polietileno, polipropileno e poliestireno) na ferramenta de comparação online Spectra base e confirmaram uma composição de polietileno conforme descrito pelo fornecedor. Os MPs apresentaram uma gama de tamanhos (< 1 mm), com as partículas apresentando um tamanho de 200-500 μm (Fig. 1a, b). Ao fim de 28 dias nos microcosmos foi observada a adsorção dos MPs aos discos de folhas (Fig 1c, d). Com o aumento nas concentrações de MPs e de CIP podemos observar a existência de pontos negros que estão presentes só nos tratamentos expostos a CIP (Fig. 1e, f).

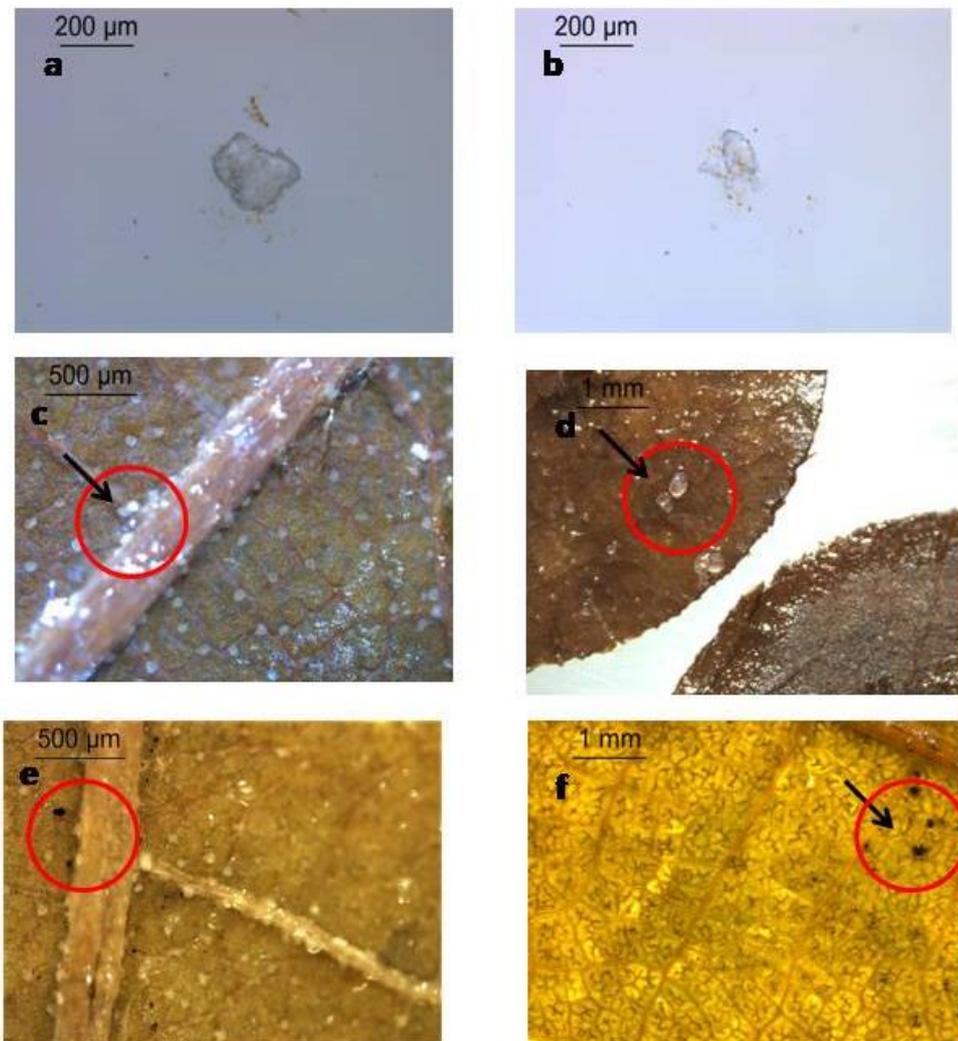


Figura 1 MPs extraídos do gel de banho (a, b); discos de folhas expostos em microcosmos a concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP; c, d, e) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP; e, f); a, b - 200 µm; c, e - 500 µm; d, f - 1 mm.

2.3.2. Perda de massa das folhas

No tratamento controlo, as folhas de amieiro perderam cerca de 64,5% da sua massa em 28 dias (Figura 2). Este parâmetro foi significativamente afetado pela presença de MPs e CIP (two-way ANOVA, $p < 0,001$). Nos tratamentos com antibiótico houve um estímulo significativo da perda de massa ($\pm 72\%$ para 0,01 e 1 mg/L CIP), enquanto que em tratamentos com MPs (50 e 500 mg/L), especialmente na mistura com antibióticos, a perda de massa foi inibida (Bonferroni tests, $p < 0,05$; Fig. 2). A interação entre MPs e CIPs foi significativa (two-way ANOVA, $p < 0,001$).

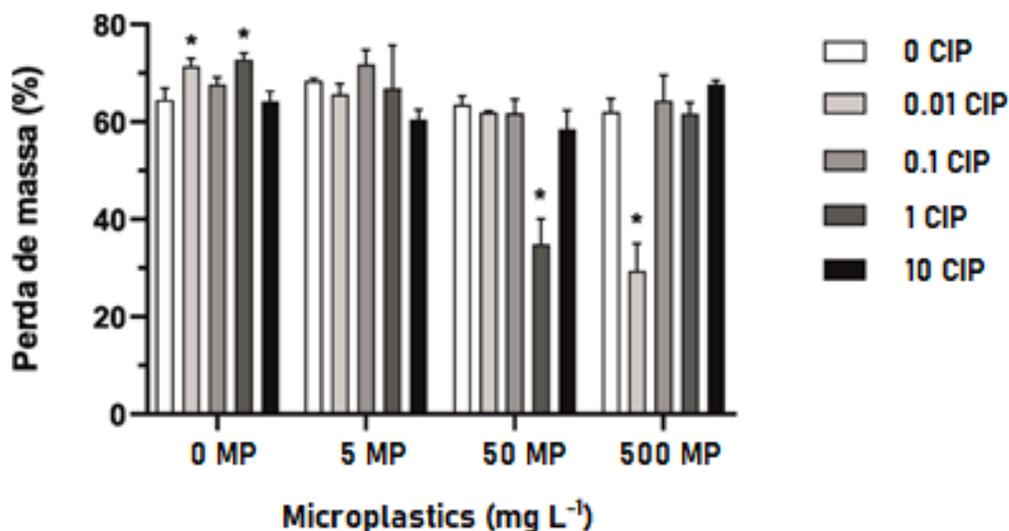


Figura 2 Perda de massa das folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

2.3.3 Enzima β -glucosidase

No controlo, a actividade da enzima β -glucosidase foi de $890,8 \mu\text{mol/g}$ folha seca/hora. A actividade desta enzima foi estimulada em tratamentos com $0,1 \text{ mg/L}$ de ciprofloxacina ou em misturas com MPs (500 MP) (two-way ANOVA, $p < 0,001$). Em mistura com 5 e 50 mg/L de MPs, esta enzima foi inibida para concentrações mais altas de CIP (Bonferroni tests, $p < 0,05$; Fig. 3). A interação entre MPs e CIPs foi significativa (two-way ANOVA; $p < 0,001$).

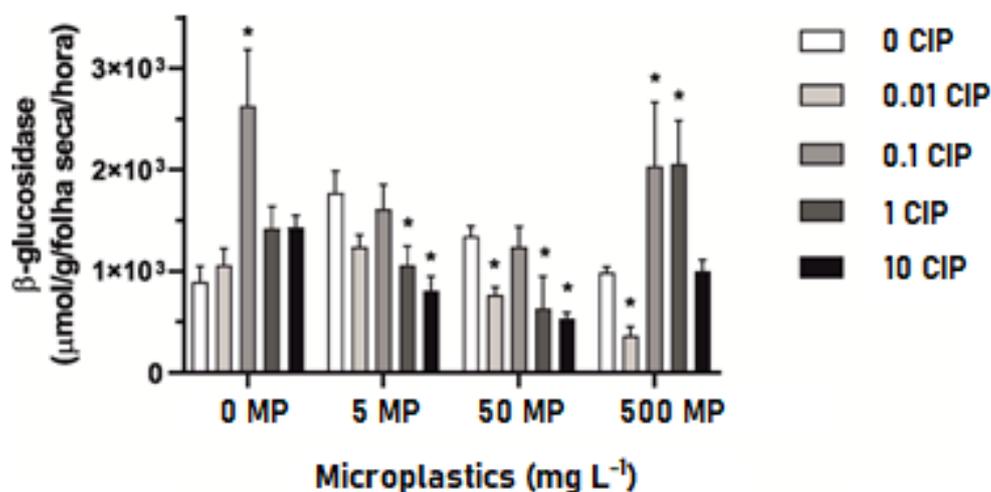


Figura 3 Actividade da enzima β -glucosidase nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

2.3.4 Biomassa de fungos

No final da experiência, o tratamento controlo mostrou uma concentração de ergosterol de 254,6 $\mu\text{g/g}$ de folha seca (Fig. 4). Não existiram diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos com MPs. No entanto, este parâmetro foi significativamente afetado pela presença de CIP (two-way ANOVA, $p < 0,001$). Uma estimulação da biomassa de fungos foi observada para tratamentos com a maior concentração de CIP (10 mg/L) e em misturas de 50 MPs com 0,1 mg/L CIP (Bonferroni tests, $p < 0,05$; Fig. 4). Neste parâmetro a interação entre MPs e CIPs foi significativa (two-way ANOVA, $p < 0,001$).

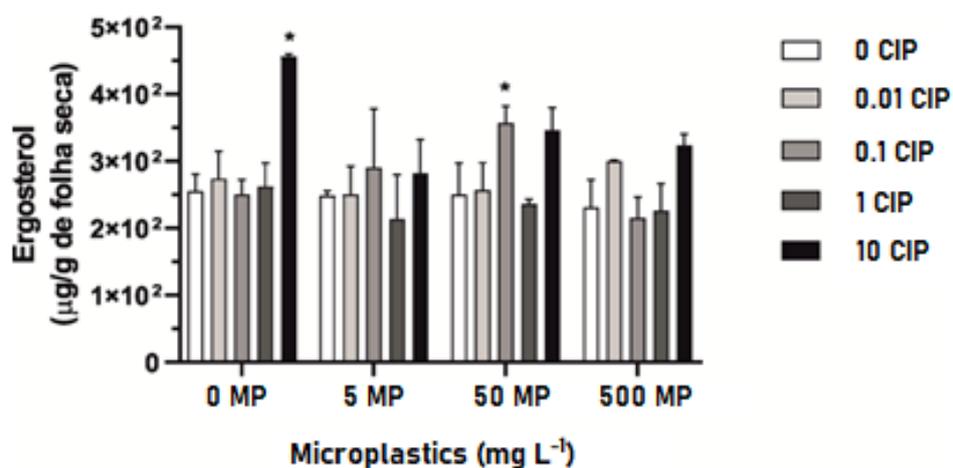


Figura 4 Concentração de ergosterol presente nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

2.3.5 Esporulação e diversidade de fungos

A partir da identificação de esporos de fungos aquáticos, 11 espécies foram encontradas nas folhas de amieiro em decomposição colonizadas no rio Algeriz. As espécies dominantes foram *Articulospora tetracladia*, *Alatospora pulchella* e *Lemoniera aquatica* (Tabela 3). Nos tratamentos em que foram adicionados MPs e CIP observou-se uma diminuição da contribuição das espécies *Tetrachaetum elegans* e *Articulospora tetracladia*, enquanto que a *Alatospora pulchella* tornou-se mais abundante. A espécie *Lemoniera aquatica* só estava presente nos tratamentos com MPs e CIP, especialmente em misturas com estes dois contaminantes (86% a 90%, Tabela 3).

Tabela 3 Percentagem da produção total de esporos de cada espécie de fungos aquáticos presentes nas folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias em microcosmos a diferentes concentrações de microplásticos (5, 50, 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). Misturas 1 a 12, respectivamente 5MP + 0,01CIP; 5MP + 0,1CIP; 5MP + 1CIP; 5MP + 10CIP; 50MP + 0,01CIP; 50MP + 0,1CIP; 50MP + 1CIP; 50MP + 10CIP; 500MP + 0,01CIP; 500MP + 0,1CIP; 500MP + 1CIP; 500MP + 10CIP.

Espécies de fungos aquáticos	Concentrações																			
	0	5 MP	50 MP	500 MP	0,01 CIP	0,1 CIP	1 CIP	10 CIP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Alatospora acuminata</i>	5,8	1,4	-	-	5,3	1,9	0,5	-	3,7	3,4	4,7	3,8	3,1	4,2	4,1	5,6	3,1	3,9	6,1	6,7
<i>Alatospora pulchella</i>	5,5	25,1	26,6	26,8	20,8	16,0	19,9	15,2	19,0	20,2	17,4	20,7	23,1	23,2	24,5	24,0	26,4	24,5	23,8	22,9
<i>Anguillospora longissima</i>	12,6	8,1	3,6	3,6	12,7	6,3	6,2	5,8	6,4	5,9	5,3	5,1	4,7	3,9	3,5	3,9	1,6	1,6	1,8	2,0
<i>Articulospora tetracladia</i>	44,0	8,9	25,7	26,8	16,2	26,0	20,9	29,9	29,1	30,3	30,0	31,9	31,5	30,0	32,1	29,7	35,5	33,7	31,4	32,2
<i>Clavospora longibraciata</i>	2,9	0,4	-	-	1,4	0,6	2,2	0,1	0,4	0,3	2,3	1,6	1,4	1,3	1,1	0,9	1,7	2,7	2,8	2,6
<i>Lemmoniera aquatica</i>	-	7,5	18,9	20,0	16,1	13,7	7,8	85,4	86,6	88,3	88,5	88,2	90,4	90,8	88,7	88,4	87,5	89,0	90,0	89,1
<i>Tetrachaetum elegans</i>	19,6	8,0	6,3	6,3	12,7	11,8	2,1	17,8	9,5	3,3	3,2	3,3	3,0	3,3	2,9	1,6	2,2	1,7	1,4	1,7
<i>Tricladium splendens</i>	1,9	6,3	4,5	3,0	4,3	7,2	4,0	3,4	1,7	2,1	2,0	0,8	0,4	1,3	0,9	2,0	1,9	2,6	2,5	1,9
<i>Triscelosporus acuminatus</i>	4,9	31,3	9,0	8,2	1,3	8,4	0,9	2,1	6,3	5,4	4,8	2,6	1,9	1,0	1,3	2,5	2,1	2,0	1,7	1,9
<i>Varicosporium elodae</i>	2,7	-	-	-	1,0	1,4	-	-	-	-	1,6	1,2	0,5	1,1	1,0	2,2	1,5	1,6	1,4	1,5
<i>Infunibura sp.</i>	-	2,9	5,4	5,2	8,3	6,8	7,7	6,0	3,7	5,4	5,1	5,7	4,2	4,9	4,4	4,0	1,0	1,5	2,1	2,7

Após 28 dias em microcosmos, a taxa de esporulação para o tratamento controlo foi de $3,1 \times 10^4$ esporos/mg de folha seca/dia (Fig. 5). A taxa de esporulação foi significativamente afetada pela presença de MPs e CIP e pela interação entre esses dois fatores (two-way ANOVA, $p < 0,001$). O aumento da concentração de MPs e de CIP levou a uma inibição significativa da taxa de esporulação em comparação com o controlo (Bonferroni tests, $p < 0,05$; Fig. 5).

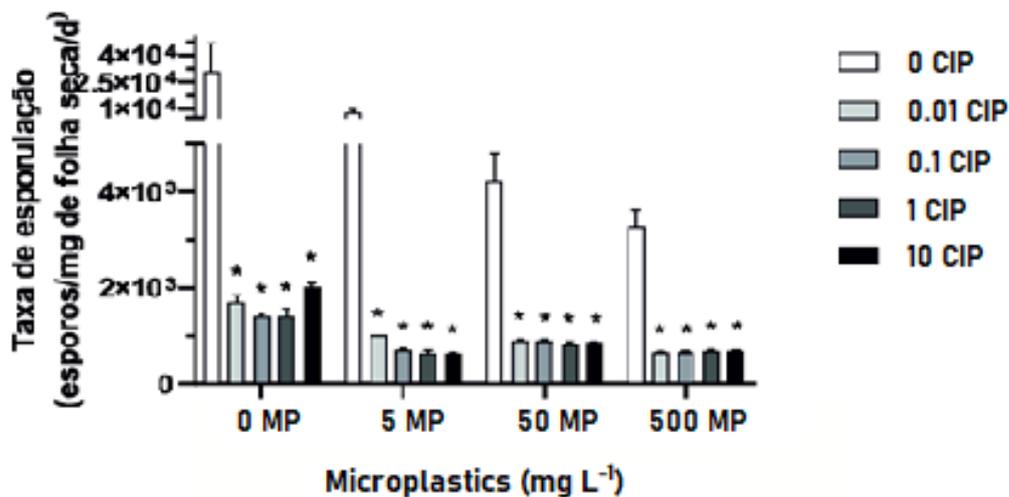


Figura 5 Taxa de esporulação das folhas de amieiro colonizadas no rio Algeriz e expostas por 28 dias a diferentes concentrações de microplásticos (5; 50; 500 mg/L MP) e ciprofloxacina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/L CIP). *, efeitos significativos em relação ao controlo (two-way ANOVA, Bonferroni tests, $p < 0,05$).

2.4 Discussão

Este estudo mostrou que os MPs e a CIP podem afetar o processo de decomposição da matéria orgânica, uma vez que alteram a estrutura da comunidade dos fungos presentes nas folhas em decomposição. O impacto destes contaminantes foi mais pronunciado na esporulação onde se observou que o aumento da concentração de MPs e de CIP, inibiu significativamente este parâmetro. Observou-se também uma alteração na comunidade fúngica: por exemplo a espécie *Lemonieraaquatica* não foi detetada no controlo e nas concentrações mais baixas. Estes resultados sugerem que a dispersão e a sobrevivência dos fungos em águas doces podem estar comprometidas em períodos mais longos, com impactos na alimentação dos invertebrados que dependem da atividade dos fungos nos detritos das folhas (Batista et al., 2017a).

Neste estudo observou-se adsorção dos MPs às folhas expostas a todas as concentrações utilizadas, sendo que a adsorção aumentou com o aumento de concentração de MPs (Fig 1c, d). Também foi possível observar que quanto maior a concentração de CIP maior a existência de pontos negros nas folhas (Fig. 1e, f). Outros contaminantes, como por exemplo, as nanopartículas de metais com tamanhos menores que 100 nm, podem ser absorvidas pelas folhas e podem induzir danos aos tecidos (Batista et al., 2020; Navarro et al., 2008), embora os mecanismos ainda não sejam compreendidos (Yang et al., 2017). Podemos sugerir que esses danos também podem acontecer nas folhas expostas a MPs, uma vez que os MPs estavam absorvidos às folhas. Os antibióticos podem também ter este efeito, uma vez que foram observados estes pontos negros nas folhas expostas a estes tratamentos, embora não possamos ter a certeza porque isto ocorre.

A decomposição da matéria orgânica é uma importante fonte nutricional e energética nos rios de pequena ordem uma vez que estas folhas são processadas por decompositores microbianos, como bactérias e fungos, e por invertebrados (Tank et al, 2010). Estudos demonstram que folhas pré-contaminadas com nanopartículas de prata (AgNPs), acumulavam prata (Ag) e quando analisada a actividade de enzimas antioxidantes nos animais, verificou-se que estes estavam em stress oxidativo (Batista et al., 2020). Pode-se assim referir que sendo os fungos afetados pela adsorção de MPs ou CIP às folhas, este efeito pode desencadear outros efeitos indiretos para um nível trófico superior, como por exemplo, nos invertebrados. Alguns estudos também mostram que a exposição a tóxicos pode alterar a estrutura das comunidades de fungos nas folhas em decomposição (Batista et al., 2012, 2017b; Pradhan et al., 2016) podendo assim afetar a qualidade e palatabilidade das folhas para os invertebrados trituradores e reduzindo, assim, as suas taxas de consumo.

Outras funções ecossistêmicas executadas por fungos aquáticos compreendem a regulação da taxa de perda de massa, a libertação de nutrientes, a captação de iões e a degradação de xenobióticos (Krauss et al., 2011). A presença de MPs e CIP afetou de forma significativa a perda de massa das folhas do nosso estudo. Adicionado o CIP a perda de massa foi estimulada, enquanto que quando adicionados os MPs, a perda de massa foi inibida. A estimulação da perda de massa nas concentrações mais altas provavelmente contribuiu para fornecer energia extra necessária para os hifomicetos desencadear os mecanismos de defesa contra estes contaminantes.

Os fungos produzem uma variedade de enzimas extracelulares que degradam polissacarídeos complexos das paredes das células vegetais, incluindo celulose, hemicelulose e lenhina, tornando o material da folha uma fonte mais apropriada de carbono e energia para os invertebrados trituradores (Suberkropp, 1998) que, por sua vez, transferem energia para níveis tróficos mais elevados (Graça &

Canhoto, 2006). No nosso estudo observamos que a actividade da enzima extracelular β -glucosidase (enzima envolvida na última etapa da degradação da celulose) foi estimulada com concentrações baixas de CIP em misturas com 500 mg/L de MPs, e em misturas das concentrações mais baixas de MPs com concentrações de CIP altas a atividade da enzima foi inibida. Sinsabaugh et al., (1994) observou que a diminuição na atividade de β -glucosidase em fungos pode explicar a redução na atividade de decomposição nas folhas, e esse resultado também foi observado em nosso estudo. Estes resultados sugerem que as atividades enzimáticas extracelulares podem ser um bom indicador do stress induzido por contaminantes como nanopartículas e metais (fungo: (Shah et al., 2010); biofilmes: (Fechner et al., 2012; Gil-Allué et al., 2015) e no caso deste estudo, os MPs e a CIP. Uma possível explicação para esta observação pode ser que, em vez de focar sua energia para produzir enzimas, os fungos estão a direcionar a energia para produzir biomassa, uma vez que este parâmetro no nosso estudo não foi fortemente afetado.

A actividade de decomposição das folhas é potenciada pela presença e dominância de certas espécies de fungos (Chung & Suberkropp, 2009). Foram observadas mudanças na estrutura da comunidade de fungos aquáticos e uma redução na riqueza de espécies nos tratamentos com MPs e CIP, especialmente nos tratamentos com misturas destes contaminantes. Investigações recentes em microcosmos e estudos de campo mostraram que a presença de vários contaminantes (metais pesados como, por exemplo, cádmio) e microplásticos e fármacos neste estudo, induzem mudanças na estrutura das comunidades de fungos (Artigas et al., 2008; Batista et al., 2012; Dang et al., 2005). Batista et al. (2017b) observou que existe uma alteração na comunidade das espécies fúngicas, onde algumas espécies se tornam dominantes na presença de nanopartículas de prata, enquanto que outras desaparecem, independentemente do tamanho ou revestimento das partículas, o que provavelmente indica uma adaptação das comunidades microbianas ao stress imposto por nano metais e / ou precursores iónicos. Neste estudo algumas espécies se tornaram dominantes na presença de MPs (*Alatospora pulchella*), enquanto que outras espécies diminuíram a sua contribuição para a esporulação (*Articulospora tetracladia* e *Tetrachaetum elegans*). A espécie *Lemoniera aquatica* só foi observada na presença dos dois contaminantes. Embora tivesse sido observado uma grande inibição na taxa de esporulação, podemos sugerir que algumas espécies conseguiram resistir melhor ao stress, talvez devido a uma possível adaptação da comunidade microbiana (Batista et al., 2017a).

A exposição a MPs e CIP afectou drasticamente a esporulação dos fungos, especialmente nos tratamentos com misturas. A reprodução de fungos aquáticos é um parâmetro muito sensível, tal como

observado noutros estudos com contaminantes (cádmio: (Batista et al., 2012), nanopartículas:(Batista et al., 2017a; Pradhan et al., 2012).

Os efeitos dos stressores ambientais são geralmente testados individualmente; entretanto os ecossistemas estão expostos a vários stressores, cujos impactos sobre a biodiversidade e os processos do ecossistema são difíceis de prever (Ferreira & Chauvet, 2011; Vinebrooke et al., 2004). Neste estudo observou-se uma significativa interação entre os dois contaminantes nos parâmetros fisiológicos analisados. Porém, esta interação em alguns parâmetros teve um efeito inibitório (perda de massa e esporulação), outros tiveram um efeito de estimulação (biomassa de fungos), e ambos os efeitos dependeram das concentrações, como no caso da actividade enzimática. Estes resultados destacam a importância de examinar o comportamento dos MPs e dos antibióticos de forma geral em diferentes cenários, para determinar os riscos destes contaminantes emergentes na biota de água doce e também nos processos dos ecossistemas.

Capítulo 3

Considerações finais e perspectiva futura

Capítulo 3

Considerações finais e perspectivas futuras

Existe um grande grau de incerteza em torno do volume, composição e diversidade de partículas de MPs que entram no ambiente. Nos ecossistemas de água doce, os dados das concentrações de MPs presentes estão a crescer rapidamente. No entanto, na maioria dos casos, esse conhecimento ainda não foi relacionado com os efeitos ecológicos, e por isso é difícil avaliar a natureza exata do risco destes contaminantes. Por exemplo, o tamanho dos MPs torna-os acessíveis a uma ampla variedade de organismos e podem facilitar a transferência de outros contaminantes presentes na água que adsorvem aos MPs. Isto também se aplica à presença de antibióticos nos ambientes aquáticos.

Um ponto crítico neste tema é saber se a concentração dessas substâncias no meio ambiente é suficiente para exercer efeitos adversos nos seres vivos. Esta questão estimula o desenvolvimento de estudos de impacto ambiental causado por diferentes contaminantes emergentes presentes no meio ambiente. Dados ecotoxicológicos têm sido obtidos para contaminantes que são potencialmente perigosos para o meio ambiente, porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes, particularmente para microplásticos e antibióticos. A ocorrência destes contaminantes emergentes em águas superficiais e de subsolo demonstra uma necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos destes contaminantes no meio ambiente (Bila & Dezotti, 2003).

As águas doces são dos ecossistemas mais ameaçados do mundo pelas atividades humanas. Existe uma necessidade urgente de encontrar alternativas para minimizar e diminuir a presença destes contaminantes dos sistemas aquáticos. Contudo, sem os plásticos e os antibióticos não podemos viver, mas não podemos ignorar os seus potenciais efeitos negativos, sendo assim necessário desenvolver processos eficazes para o descarte e explorar outras alternativas ao uso de plástico. Por exemplo, vários estudos demonstram o potencial de microrganismos para degradar plásticos: existem fungos capazes de usar os MPs como fonte de nutrientes (Russell et al., 2011; Yamada-Onodera et al., 2002), destacando assim o potencial desses organismos na biorremediação de plásticos, já que essa é uma preocupação crescente em todo o mundo em ambientes aquáticos (Cole et al., 2011; da Costa et al., 2016). O problema é que nenhum destes estudos ainda encontrou uma aplicação prática, sendo assim necessário rastrear organismos eficientes e desenvolver tecnologias capazes de degradar o plástico eficientemente. Além disso, pesquisas adicionais e melhorias nas tecnologias de tratamento de água são necessárias para manter ecossistemas aquáticos saudáveis e melhorar a sustentabilidade do abastecimento global de água.

Para além disso, também é necessário avaliar os potenciais efeitos de misturas dos MPs e antibióticos e outros contaminantes. Mais investigações ecotoxicológicas são necessárias para melhor avaliar os seus efeitos reais dos contaminantes particularmente em mistura no ambiente. A bioacumulação e a transferência trófica também são aspectos importantes que devem ser examinados com mais detalhes. Outro ponto a considerar é a inexistência de métodos padronizados para avaliar e monitorizar a presença destes contaminantes na água, para assegurar a conservação da biodiversidade dos ecossistemas aquáticos.

Referências

- Alder, A. C., McArdell, C. S., Golet, E. M., Ibric, S., Molnar, E., Nipales, N. S., & Giger, W. (2001). Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. *ACS Symposium Series*, 791, 56–69. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791.ch003>
- Alquezar, R. (2006). Accumulation of metals by toadfish from sediment and infauna: are fish what they eat? *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 12(3), 95–106.
- Américo, J., Isique, W., Minillo, A., Carvalho, S., & Torres, N. (2012). Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 17(3), 61–67. <https://doi.org/10.21168/rbrh.v17n3.p61-67>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 62, Issue 8, pp. 1596–1605). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Artigas, J., Romani, A. M., & Sabater, S. (2008). Effect of nutrients on the sporulation and diversity of aquatic hyphomycetes on submerged substrata in a Mediterranean stream. *Aquatic Botany*, 88(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.08.005>
- Baldy, V., Chauvet, E., Charcosset, J. Y., & Gessner, M. O. (2002). Microbial dynamics associated with leaves decomposing in the mainstem and floodplain pond of a large river. *Aquatic Microbial Ecology*, 28(1), 25–36. <https://doi.org/10.3354/ame028025>
- Barlocher, F. (1992). *3 Community Organization*.
- Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., & Braunbeck, T. (2016). Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1656–1666. <https://doi.org/10.1002/etc.3361>
- Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2012). Impacts of warming on aquatic decomposers along a gradient of cadmium stress. *Environmental Pollution*, 169, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.021>
- Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2017a). How do physicochemical properties influence the toxicity of silver nanoparticles on freshwater decomposers of plant litter in streams? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140(February), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.039>
- Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2017b). Temperature modulates AgNP impacts on microbial decomposer activity. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1324–1332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.229>
- Batista, D., Pascoal, C., & Cássio, F. (2020). The Increase in Temperature Overwhelms Silver Nanoparticle Effects on the Aquatic Invertebrate *Limnephilus* sp. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(7), 1429–1437. <https://doi.org/10.1002/etc.4738>
- Baudoin, J. M., Guérol, F., Felten, V., Chauvet, E., Wagner, P., & Rousselle, P. (2008). Elevated

- aluminium concentration in acidified headwater streams lowers aquatic hyphomycete diversity and impairs leaf-litter breakdown. *Microbial Ecology*, *56*(2), 260–269.
<https://doi.org/10.1007/s00248-007-9344-9>
- Beek der aus, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Beere, W., Mullet, S., Wingstedt, E., Berg, Ø., Savoainen, S., & Lahti, T. (2010). Model-based condition monitoring techniques for balance of plant analysis using tempo. *7th International Topical Meeting on Nuclear Plant Instrumentation, Control, and Human-Machine Interface Technologies 2010, NPIC and HMIT 2010*, *3*(2), 1920–1924.
- Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. J. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, *86*, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Besse, J. P., & Garric, J. (2008). Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters*, *176*(2), 104–123. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.012>
- Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2013). Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. In *Journal of Polymers and the Environment* (Vol. 21, Issue 2, pp. 575–579). <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0456-z>
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, *26*(4), 523–530.
<https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000400015>
- Boerger, C. M., Lattin, G. L., Moore, S. L., & Moore, C. J. (2010). Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, *60*(12), 2275–2278.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007>
- Bower, C. K., & Daeschel, M. A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1–2), 33–44.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00075-6)
- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., & Mawhinney, D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, *366*(2–3), 772–783.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.007>
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science and Technology*, *42*(13), 5026–5031.
<https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Browne, M. A., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2010). Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environmental Science and Technology*, *44*(9), 3404–3409.
<https://doi.org/10.1021/es903784e>
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., & Fanelli, R. (2003). Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and lambro in Northern Italy. *Environmental Science and*

- Technology*, 37(7), 1241–1248. <https://doi.org/10.1021/es020158e>
- Canhoto, C., & Graça, M. A. S. (1996). Decomposition of Eucalyptus globulus leaves and three native leaf species (*Alnus glutinosa*, *Castanea sativa* and *Quercus faginea*) in a Portuguese low order stream. *Hydrobiologia*, 333(2), 79–85. <https://doi.org/10.1007/BF00017570>
- Casas, J. J., & Gessner, M. O. (1999). Leaf litter breakdown in a Mediterranean stream characterised by travertine precipitation. *Freshwater Biology*, 41(4), 781–793. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00417.x>
- Castensson, S., Eriksson, V., Lindborg, K., & Wettermark, B. (2009). A method to include the environmental hazard in drug prescribing. *Pharmacy World and Science*, 31(1), 24–31. <https://doi.org/10.1007/s11096-008-9260-1>
- Cedervall, T., Hansson, L. A., Lard, M., Frohm, B., & Linse, S. (2012). Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS ONE*, 7(2), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032254>
- Chae, Y., & An, Y. J. (2017). Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.070>
- Chung, N., & Suberkropp, K. (2009). Effects of aquatic fungi on feeding preferences and bioenergetics of *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). *Hydrobiologia*, 630(1), 257–269. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9820-y>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 47(12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 62, Issue 12, pp. 2588–2597). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- da Costa, J. P. (2018). Micro- and nanoplastics in the environment: Research and policymaking. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.002>
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. In *Science of the Total Environment* (Vols. 566–567, pp. 15–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>
- Dang, C. K., Chauvet, E., & Gessner, M. O. (2005). Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships. *Ecology Letters*, 8(11), 1129–1137. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00815.x>
- Dang, C. K., Schindler, M., Chauvet, E., & Gessner, M. O. (2009). Temperature oscillation coupled with fungal community shifts can modulate warming effects on litter decomposition. *Ecology*, 90(1), 122–131. <https://doi.org/10.1890/07-1974.1>
- Desforges, J. P. W., Galbraith, M., & Ross, P. S. (2015). Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3),

320–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0172-5>

- Dong, Z., Senn, D. B., Moran, R. E., & Shine, J. P. (2013). Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *65*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.07.003>
- Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*, *104*(1–2), 290–293. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.006>
- Duarte, S., Pascoal, C., & Cássio, F. (2004). Effects of zinc on leaf decomposition by fungi in streams: Studies in microcosms. *Microbial Ecology*, *48*(3), 366–374. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2032-5>
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, *77*(1–2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007>
- Ericksson, C., & Burton, H. (2003). Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. *Ambio* *32*, 380–384
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, *177*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>
- Fechner, L. C., Dufour, M., & Gourlay-Francé, C. (2012). Pollution-induced community tolerance of freshwater biofilms: Measuring heterotrophic tolerance to Pb using an enzymatic toxicity test. *Ecotoxicology*, *21*(8), 2123–2131. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0964-6>
- Feitosa-Felizzola, J., & Chiron, S. (2009). Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology*, *364*(1–2), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.10.006>
- Fellows, C. S., Valett, H. M., Dahm, C. N., Mulholland, P. J., & Thomas, S. A. (2006). Coupling nutrient uptake and energy flow in headwater streams. *Ecosystems*, *9*(5), 788–804. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-0005-5>
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., & Geffard, O. (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, *86*(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.002>
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, *58*(8), 1225–1228. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>
- Ferreira, V., & Chauvet, E. (2011). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology*, *17*(1), 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ghiselli, G., & Jardim, W. F. (2007). Interferentes endócrinos no ambiente. In *Química Nova* (Vol. 30, Issue 3, pp. 695–706). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>

- Giger, W., Alder, A. C., Golet, E. M., Kohler, H. P. E., McArdell, C. S., Molnar, E., Siegrist, H., & Suter, M. J. F. (2003). Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia*, *57*(9), 485–491. <https://doi.org/10.2533/000942903777679064>
- Gil-Allué, C., Schirmer, K., Tlili, A., Gessner, M. O., & Behra, R. (2015). Silver nanoparticle effects on stream periphyton during short-term exposures. *Environmental Science and Technology*, *49*(2), 1165–1172. <https://doi.org/10.1021/es5050166>
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J., & Bowmer, T. (1998). Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, *43*(2–3), 93–109. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00060-5)
- Goldstein, M. C., Rosenberg, M., & Cheng, L. (2012). Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. *Biology Letters*, *8*(5), 817–820. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0298>
- Graça, M. A. S. (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - A review. In *International Review of Hydrobiology* (Vol. 86, Issues 4–5, pp. 383–393). [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D)
- Graça, M. A. S., & Canhoto, C. (2006). Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica*, *25*(1–2), 1–10.
- Gregory, M. R. (1996). Plastic scrubbers' in hand cleansers: A further (and minor) source for marine pollution identified. *Marine Pollution Bulletin*, *32*(12), 867–871. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(96\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00047-1)
- Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., & Thomas, K. V. (2008). Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *71*(2), 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.015>
- Guimarães-Soares, L., Pascoal, C., & Cássio, F. (2007). Effects of heavy metals on the production of thiol compounds by the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *66*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.005>
- Hart, M., W. 1991 Particle Captures and the Method of Suspension Feeding by Echinoderm Larvae. *Biol. Bull.*, *180* (1), 12-27.
- Hartmann, Kümmerer, K., & Hartmann, A. (1997). Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *36*(2), 174–179. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.1506>
- Hartmann, N. B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H. S., Schmidt, S. N., Mayer, P., Meibom, A., & Baun, A. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *13*(3), 488–493. <https://doi.org/10.1002/ieam.1904>
- Heise, J., Höltge, S., Schrader, S., & Kreuzig, R. (2006). Chemical and biological characterization of non-extractable sulfonamide residues in soil. *Chemosphere*, *65*(11), 2352–2357.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.084>

- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, *46*(6), 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., & Kratz, K. L. (1998). Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *815*(2), 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00335-5)
- Holten Lützhøft, H. C., Halling-Sørensen, B., & Jørgensen, S. E. (1999). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *36*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s002449900435>
- Horton, A. A., Svendsen, C., Williams, R. J., Spurgeon, D. J., & Lahive, E. (2017). Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK – Abundance, sources and methods for effective quantification. *Marine Pollution Bulletin*, *114*(1), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.004>
- Hughes, S. R., Kay, P., & Brown, L. E. (2013). Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 47, Issue 2, pp. 661–677). <https://doi.org/10.1021/es3030148>
- Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *63*(1), 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.11.011>
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, *36*(20), 5013–5022. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00227-0)
- Joon Kang, I., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., & Honjo, T. (2002). Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, *47*(1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00205-3)
- Kaplan, S. (2013). Review: Pharmacological pollution in water. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 43, Issue 10, pp. 1074–1116). <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.627036>
- Kolář, M., Urbánek, K., & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *17*(5), 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00317-X)
- Krauss, G. J., Solé, M., Krauss, G., Schlosser, D., Wesenberg, D., & Bärlocher, F. (2011). Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(4), 620–651. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00266.x>
- Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2007). The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships. In *Environmental and Microbial Relationships* (Vol. 105, Issue 3).
- Kümmerer, K. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and

- households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12), 1203–1214.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x>
- Kümmerer, Klaus. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Laist, D.W., 1987. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 18, 319–326
- Lanzky, P. F., & Haning-Sorensen, B. (1997). Section of Environmental Chemistry Department of Analytical and Pharmaceutical Chemistry The Royal Danish School of Pharmacy. *Chemosphere*, 35(11), 2553–2561.
- Larrañaga, S., Díez, J. R., Elosegi, A., & Pozo, J. (2003). Leaf retention in streams of the Agüera basin (northern Spain). *Aquatic Sciences*, 65(2), 158–166. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0623-3>
- Lecerf, A., & Chauvet, E. (2008). Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshwater Biology*, 53(8), 1658–1672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01986.x>
- Lienert, J., Güdel, K., & Escher, B. I. (2007). Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environmental Science and Technology*, 41(12), 4471–4478. <https://doi.org/10.1021/es0627693>
- Lo, H. K. A., & Chan, K. Y. K. (2018). Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*. *Environmental Pollution*, 233, 588–595.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.095>
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., & Soudant, P. (2015). Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Marine Chemistry*, 175, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003>
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., & Ji, R. (2016). Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environmental Pollution*, 219, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., & Marques, C. R. (2012). Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: Data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 1167–1176.
<https://doi.org/10.1007/s10646-012-0871-x>
- Mendoza, R., M., L., Karapanagioti, H., & Álvarez, N. R. (2018). Micro(nanoplastics) in the marine environment: Current knowledge and gaps. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.004>
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., & Delupis, G. D. Di. (1997). *Research note toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia*. 31(7), 1801–1806.
- Miranda, C. D., & Castillo, G. (1998). Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *Science of the Total Environment*, 224(1–3), 167–176.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00354-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00354-4)

- Montagner, C. C., Vidal, C., & Acayaba, R. D. (2017). Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. In *Química Nova* (Vol. 40, Issue 9, pp. 1094–1110). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>
- Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin*, *62*(6), 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.032>
- Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance – Problems, Progress, and Prospects. *N. England*, 689–691.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, *17*(5), 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Niyogi, D. K., Lewis, W. M., & McKnight, D. M. (2001). Litter breakdown in mountain streams affected by mine drainage: Biotic mediation of abiotic controls. *Ecological Applications*, *11*(2), 506–516. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2001\)011\[0506:LBIMSA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2001)011[0506:LBIMSA]2.0.CO;2)
- Niyogi, D. K., McKnight, D. M., & Lewis, W. M. (2002). Fungal communities and biomass in mountain streams affected by mine drainage. *Archiv Fur Hydrobiologie*, *155*(2), 255–271. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/155/2002/255>
- Ortiz de García, S., Pinto, G. P., García-Encina, P. A., & Mata, R. I. (2013). Ranking of concern, based on environmental indexes, for pharmaceutical and personal care products: An application to the Spanish case. *Journal of Environmental Management*, *129*, 384–397. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.035>
- Pascoal, Cláudia, Cássio, F., & Gomes, P. (2001). Leaf breakdown rates: A measure of water quality? *International Review of Hydrobiology*, *86*(4–5), 407–416. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P)
- Pascoal, Claudia, Marvanová, L., & Cássio, F. (2005). Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal. *Fungal Diversity*, *19*, 109–128.
- Pascoal, Cláudia, Pinho, M., Cássio, F., & Gomes, P. (2003). Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: Studies on a polluted river. *Freshwater Biology*, *48*(11), 2033–2044. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01130.x>
- PlasticsEurope. January 2020. The Circular Economy of Plastics. Uma visão europeia Disponível em : <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>
- Pradhan, A., Seená, S., Pascoal, C., & Cássio, F. (2012). Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder *Allogamus ligonifer*. *Chemosphere*, *89*(9), 1142–1150. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.001>
- Pradhan, A., Silva, C. O., Silva, C., Pascoal, C., & Cássio, F. (2016). Enzymatic biomarkers can portray nanoCuO-induced oxidative and neuronal stress in freshwater shredders. *Aquatic Toxicology*, *180*, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.017>
- Prata, J. C. (2018). Airborne microplastics: Consequences to human health? In *Environmental Pollution*

- (Vol. 234, pp. 115–126). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.043>
- Read SJ, Moss ST, Jones EBG. 1992. Attachment and germination of conidia. In Bärlocher F (Ed) The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 135-151
- Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>
- Russell, J. R., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A. G., Dantzler, K. W., Hickman, D. S., Jee, J., Kimovec, F. M., Koppstein, D., Marks, D. H., Mittermiller, P. A., Núñez, S. J., Santiago, M., Townes, M. A., Vishnevetsky, M., Williams, N. E., Vargas, M. P. N., Boulanger, L. A., ... Strobel, S. A. (2011). Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6076–6084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00521-11>
- Ryan, Connell, A. D., & Gardner, B. D. (1988). Plastic ingestion and PCBs in seabirds: Is there a relationship? *Marine Pollution Bulletin*, 19(4), 174–176. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(88\)90674-1](https://doi.org/10.1016/0025-326X(88)90674-1)
- Ryan, P. G., Moore, C. J., Van Franeker, J. A., & Moloney, C. L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 1999–2012). <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0207>
- Sakai, S., Urano, S., & Takatsuki, H. (2000). Leaching behavior of PCDD/Fs and PCBs from some waste materials. *Studies in Environmental Science*, 71(C), 715–724. [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(97\)80255-5](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(97)80255-5)
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. In *Chemosphere* (Vol. 65, Issue 5, pp. 725–759). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchis, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159(September), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043>
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H. U., & Fürst, P. (2018). Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research*, 129, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.011>
- Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., & Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 799–805.

<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2020-1>

- Shah, V., Dobiášová, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A., & Seal, S. (2010). Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, *178*(1–3), 1141–1145. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.141>
- Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE, McClaugherty CA (1993) Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology* 74:1586–1593
- Sinsabaugh, R.L., Osgood, M.P., Findlay, S., 1994. Enzymatic models for estimating decomposition rates of particulate detritus. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 13, 160–169
- 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*(1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/iroh.200410736>
- Sridhar, K. R., Krauss, G., Bärlocher, F., Raviraja, 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*(1), 73–80. <https://doi.org/10.3354/ame026073>
- Stuhlbacher, A., & Maltby, L. (1992). Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *22*(3), 319–324. <https://doi.org/10.1007/BF00212093>
- Suberkropp, K., & Weyers, H. (1996). Application of fungal and bacterial production methodologies to decomposing leaves in streams. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(5), 1610–1615. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1610-1615.1996>
- 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. 120-143
- Sumpter, J. P. (1998). Xenoendocrine disrupters - Environmental impacts. *Toxicology Letters*, *102–103*, 337–342. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00328-2)
- Tank JL, Rosi-Marshall EJ, Griffiths NA, Entekin SA, Stephen ML. (2010). A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 29:118-146
- Ternes, T. A. (2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *20*(8), 419–434. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00078-4)
- Ternes, T., Bonerz, M., & Schmidt, T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *938*(1–2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01205-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01205-5)
- Tessier, L., Boisvert, J. L., Vought, L. B. M., & Lacoursière, J. O. (2000). Anomalies on capture nets of Hydropsyche slossonae larvae (Trichoptera; Hydropsychidae), a potential indicator of chronic toxicity of malathion (organophosphate insecticide). *Aquatic Toxicology*, *50*(1–2), 125–139. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00089-2)

- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 2027– 204
- Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 166:145-167, 2003
- Thompson, R. C., Olson, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & Vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1973–1976. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054>
- Torres, N. H. (2012). Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17 α - ethinylestradiol and 17 β -estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. *IOSR Journal of Engineering*, 02(05), 984–989. <https://doi.org/10.9790/3021-0205984989>
- UNEP, 2005. Marine litter: An analytical overview. UNEP, pag 47
- Van, A., Rochman, C. M., Flores, E. M., Hill, K. L., Vargas, E., Vargas, S. A., & Hoh, E. (2012). Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. *Chemosphere*, 86(3), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.039>
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>
- Vinebrooke, R. D., Cottingham, K. L., Norberg, J., Scheffer, M., Dodson, S. I., Maberly, S. C., & Sommer, U. (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: The role of species co-tolerance. *Oikos*, 104(3), 451–457. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13255.x>
- Wang, Z., Yan, C., & Zhang, X. (2009). Acute and chronic cadmium toxicity to a saltwater cladoceran *Moina monogolica* Daday and its relative importance. *Ecotoxicology*, 18(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0255-4>
- Ward, J. E., & Targett, N. M. (1989). Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 101(3), 313–321. <https://doi.org/10.1007/BF00428127>
- Ward, J. Evan, & Kach, D. J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research*, 68(3), 137–142.

<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>

Ward, J. Evan, Levinton, J. S., & Shumway, S. E. (2003). Influence of diet on pre-ingestive particle processing in bivalves I: Transport velocities on the ctenidium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293(2), 129–149. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00218-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00218-1)

Wilson, D.S., 1973. Food Size Selection Among Copepods. *Ecology* 54, 909-914

Whitacre, D. M. (2015). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 233. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9>

Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 585–586. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585>

Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4), 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00144-8)

Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., & Kusk, K. O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40(7), 723–730. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00443-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00443-9)

Wright, S. L., Rowe, D., & Thompson, R. C. (2013). Correspondences Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *CURBIO*, 23(23), R1031–R1033. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.068>

Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y., & Tani, Y. (2002). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 828–831.

Yang, J., Cao, W., & Rui, Y. (2017). Interactions between nanoparticles and plants: Phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 158–169. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>