



Sc

2.º ciclo

FCUP
2014



Tardígrados como
Bioindicadores da Qualidade
do Ar em Meio Urbano

Daniel Ricardo
Almeida dos Santos



Tardígrados como Bioindicadores da Qualidade do Ar em Meio Urbano

Daniel Ricardo Almeida dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em

Biologia

2014

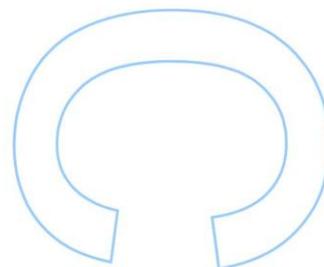
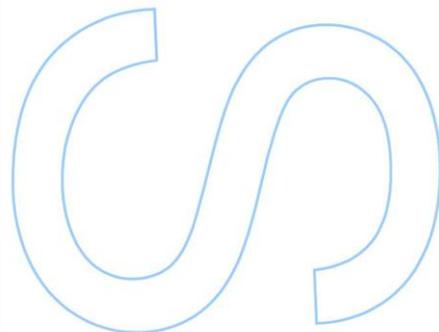
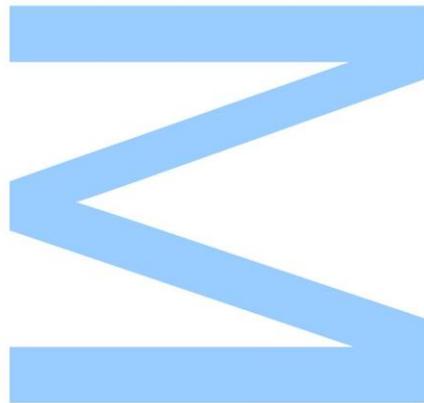


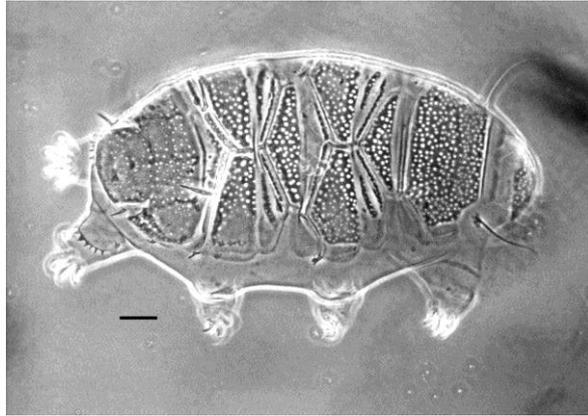


Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

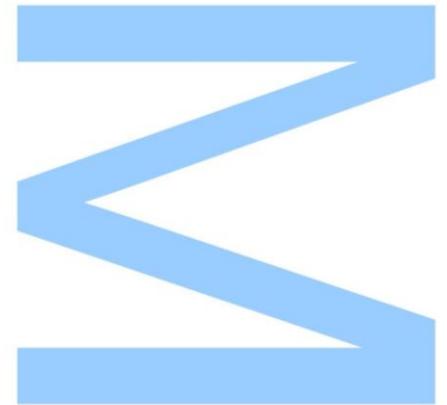
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____





Tardígrados como Bioindicadores da Qualidade do Ar em Meio Urbano



Daniel Ricardo Almeida dos Santos

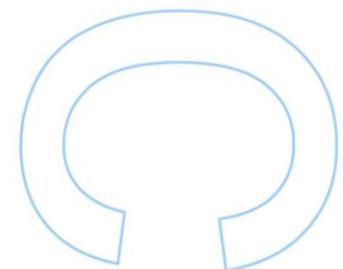
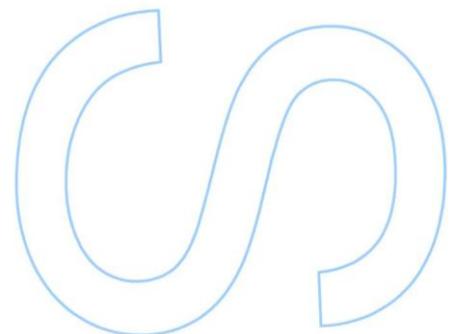
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

2014

Orientador

António Paulo Fontoura Pinheiro de Magalhães, Professor associado,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Agradecimentos

Gostaria de registar uma palavra de sincero agradecimento ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Fontoura, do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo apoio contínuo na projeção e elaboração deste projeto, principalmente nos seus esforços na identificação das espécies presentes e colaboração na escrita deste documento, mas também pelo saber que me transmitiu, pela disponibilidade que me ofereceu e pelo abrir de generosas e diversas oportunidades.

Agradeço também muito especialmente à Professora Doutora Marisa Almeida do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto e Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pela sua disponibilização de tempo e recursos e que pelo seu contributo, através da elaboração do doseamento de metais através de espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama, permitiu a esta dissertação atingir uma abrangência interdisciplinar.

Resumo

Amostras de musgos e líquenes foram recolhidas de oito locais de amostragem localizados na região do grande Porto. Cada um destes locais foi caracterizado de acordo com o nível de poluição atmosférica através de dados fornecidos pela APA (Agência Portuguesa do Ambiente), que tem em consideração as concentrações de 5 poluentes distintos: ozono (O₃), dióxido de azoto (NO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂) e partículas finas ou inaláveis (PM₁₀). Para complementar esta informação as amostras de musgos e líquenes foram sujeitas a espectrofotometria de absorção atómica com atomização de chama para determinar as concentrações de Cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) presentes no substrato.

Os tardígrados foram extraídos, triados e identificados até à espécie, com base na sua morfologia e morfometria. A sua distribuição pelos diferentes locais de amostragem sugere que as espécies *Milnesium tardigradum*, *Macrobiotus harmsworthi*, *Macrobiotus persimilis* e *Minibiotus intermedius*, constituirão um grupo de espécies mais sensíveis, enquanto *Hypsibius dujardini*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, *Macrobiotus lusitanicus*, *Paramacrobiotus areolatus* e *Tenuibiotus* sp. serão mais tolerantes.

Em relação aos parâmetros estruturais das comunidades de tardígrados podemos inferir a existência de uma fraca correlação entre estes e o grau de poluição dos locais de amostragem, já que os locais menos poluídos tendem a registar valores mais elevados de regularidade e diversidade.

Palavras-chave: Tardígrados; Qualidade do ar; Bioindicadores; Musgos; Líquenes

Abstract

Samples of mosses and lichens were collected from eight sample sites located in the greater Porto area. Each of these places was characterized by the gradient of atmospheric pollution as determined by data collected by APA (Agência Portuguesa do Ambiente), which accounts for the concentrations of 5 distinct pollutants: ozone (O₃), nitrate dioxide (NO₂), carbon monoxide (CO), sulphur dioxide (SO₂) and particulate matter (PM₁₀). In order to complement this information the samples of lichens and mosses were subjected to Flame Atomic Absorption Spectrometry to determine the concentrations of copper (Cu), zinc (Zn) and lead (Pb).

The tardigrades were extracted, triaged and identified to the species, based on morphology and morphometrics. Its distribution between the different sample sites suggests that the species *Milnesium tardigradum*, *Macrobiotus harmsworthi*, *M. persimilis* e *Minibiotus intermedius*, are more susceptible, while *Hypsibius dujardini*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, *Macrobiotus lusitanicus*, *Paramacrobiotus areolatus* e *Tenuibiotus* sp. are more tolerant.

In regards to the structural parameters of the tardigrade community we can infer the existence of a weak correlation between these and the pollution level of the sampling sites, as the least polluted sites tend to contain communities with larger values of diversity and regularity.

Key-Words: Tardigrades; Air Quality; Bioindicators; Mosses; Lichens

Índice

| | |
|---|----|
| Agradecimentos..... | 5 |
| Resumo | 6 |
| Abstract | 7 |
| Índice..... | 8 |
| Lista de Tabelas e de Figuras..... | 9 |
| Lista de Abreviaturas | 10 |
| Introdução..... | 11 |
| Bioindicadores..... | 11 |
| Os tardígrados como bioindicadores | 14 |
| Objetivos do trabalho | 16 |
| Material e métodos | 17 |
| Localização das estações de amostragem..... | 17 |
| Caracterização das estações de amostragem..... | 18 |
| Técnicas de amostragem | 21 |
| Determinação das concentrações em metais nas amostras de musgos e líquenes | 22 |
| Preparação das amostras..... | 22 |
| Digestão | 22 |
| Doseamento de metais | 22 |
| Métodos de estudo dos tardígrados | 23 |
| Extração e triagem..... | 23 |
| Identificação | 23 |
| Parâmetros estruturais da comunidade | 24 |
| Tratamento estatístico..... | 25 |
| Correlação não paramétrica..... | 25 |
| Análise multivariável..... | 25 |
| Resultados e discussão | 27 |
| Concentrações de metais em musgos e líquenes | 27 |
| As comunidades de tardígrados..... | 29 |
| A estrutura da comunidade de tardígrados e relação com a qualidade do ar..... | 31 |
| Conclusão..... | 39 |
| Referências Bibliográficas | 41 |
| Anexos | 45 |

Lista de Tabelas e de Figuras

| | |
|-----------------|----|
| Figura 1 | 18 |
| Tabela 1..... | 21 |
| Tabela 2..... | 21 |
| Figura 2..... | 27 |
| Figura 3..... | 28 |
| Figura 4..... | 29 |
| Tabela 3..... | 31 |
| Tabela 4..... | 33 |
| Tabela 5..... | 34 |
| Figura 5 A..... | 36 |
| Figura 5 B..... | 36 |
| Figura 6 A..... | 37 |
| Figura 6 B..... | 38 |

Lista de Abreviaturas

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

PCA – Análise de Componentes Principais

Pb – Chumbo

Cu – Cobre

NO₂ – Dióxido de Azoto

SO₂ – Dióxido de Enxofre

AAS-F – Espectrofotometria de Absorção Atómica com Atomização em Chama

H' – Índice de Diversidade Shannon-Weaver

IQ – Índice de Qualidade

CO – Monóxido de Carbono

S – Número de Espécies

O₃ – Ozono

PM₁₀ – Partículas finas ou inaláveis

E – Regularidade

Zn – Zinco

Introdução

Bioindicadores

Até meados do século XX a noção de prosperidade era em grande medida correlacionada com o nível de desenvolvimento urbano e industrial. No entanto, os graves desastres ambientais causados por um crescimento desregulado levaram a uma alteração de atitude da sociedade que passou a reivindicar ações governamentais para a proteção do ambiente (Casarett e Doull, 2008).

Com efeito, um dos mais graves problemas ambientais que então surgiram foi a poluição, que contaminou de forma crescente, não só os ecossistemas aquáticos, mas também os solos e deteriorou ainda a qualidade do ar.

Assim, foi necessário concentrar esforços no sentido de procurar desenvolver técnicas capazes de avaliar o grau de poluição e, simultaneamente, produzir legislação para mitigar os efeitos dos poluentes.

No que diz respeito à qualidade do ar, a legislação inicial, proposta no início dos anos 70, centrou-se principalmente na monitorização e regulação da concentração atmosférica de alguns poluentes, nomeadamente ozono, dióxido de enxofre, dióxido de azoto, monóxido de carbono, chumbo e carbonetos, considerados perigos moderados para a saúde humana (Casarett e Doull, 2008). A determinação da qualidade do ar era considerada sobretudo numa perspetiva antropológica sendo os parâmetros de qualidade determinados de acordo com testes de toxicidade que medem as respostas dos seres humanos a esses tóxicos.

Nessa época, eram utilizados sobretudo ensaios químicos para determinar a qualidade do ar. Contudo, na maior parte dos casos, os resultados traduziam apenas a qualidade do ar no momento da análise, não refletindo o efeito da ação continuada desses contaminantes.

Por isso, e tendo também em conta a crescente preocupação com o impacto dos poluentes sobre os ecossistemas e recursos naturais, observou-se um crescente desenvolvimento e aplicação de bioindicadores para determinação do nível de poluição ambiental.

Os bioindicadores podem ser divididos em 3 categorias: indicadores ambientais, indicadores ecológicos e indicadores de biodiversidade. Os indicadores

ambientais são organismos que respondem de modo previsível, observável e quantificável a alterações ambientais, permitindo a monitorização do meio ambiente. Indicadores ecológicos são organismos que reagem não diretamente a alterações ambientais mas a alterações nos sistemas bióticos (como fragmentação do habitat). Por sua vez, indicadores de biodiversidade são organismos cuja diversidade reflete a diversidade de outras espécies presentes no habitat (McGeoch, 1998). Idealmente, um bioindicador deve possuir várias características: elevada sensibilidade, reagindo a mudanças, mesmo que graduais, no ecossistema, distribuição geográfica alargada, capacidade de providenciar avaliação contínua durante condições variáveis de *stress*, utilização fácil e economicamente viável. É importante referir que nenhum bioindicador, por si só, é capaz de possuir todas estas características, pelo que é necessário o uso de indicadores suplementares, assim como estratégias de monitorização mais abrangentes envolvendo habitats chave e alterações a nível da estrutura das comunidades (Noss, 1990).

Note-se que a utilização de bioindicadores deve ser considerada como complementar dos métodos químicos e não como substituto. Entre as vantagens resultantes da utilização dos bioindicadores podem avançar-se as seguintes: Permitem a deteção de poluentes em concentrações muito baixas que, de outro modo, apenas podem ser detetados por métodos químicos especializados com custos elevados. Permitem, como já foi dito, a integração de fatores espaciais e temporais, distinguindo entre situações de elevados níveis de poluição súbitos e de poluição moderada que surge de modo intermitente ao longo de longos períodos de tempo, ao contrário dos indicadores químicos que apenas fornecem informação relativa ao momento em que a amostragem é realizada. Os bioindicadores são ainda mais eficazes para detetar os efeitos indiretos dos poluentes sobre os ecossistemas, já que ensaios químicos dificilmente refletem a redução em diversidade das comunidades ou, por exemplo, o modo como o crescimento populacional de algumas espécies pode afetar outras espécies através da competição. Os efeitos dos poluentes sobre os ecossistemas são particularmente difíceis de determinar por ensaios químicos no caso de ocorrer bioacumulação, uma vez que as concentrações de poluentes tendem a aumentar ao longo da cadeia trófica, sendo as suas concentrações muito mais elevadas a nível dos tecidos dos organismos em comparação com os níveis encontrados no meio ambiente (Holt e Miller, 2010).

No entanto os bioindicadores também têm desvantagens. Frequentemente as variações nas populações ou comunidades usadas como indicadores podem ser provocadas não por poluentes ou qualquer tipo de ação humana mas por perturbações

naturais como por exemplo a competição ou o parasitismo (Holt e Miller, 2010). Por outro lado, muitos organismos usados como indicadores são de difícil identificação, requerendo a intervenção de especialistas e, conseqüentemente, um dispêndio de tempo considerável.

Diversos grupos de organismos podem ser usados como bioindicadores, incluindo organismos pertencentes à microfauna, mesofauna e macrofauna. Ao nível dos solos os protozoários são frequentemente utilizados como bioindicadores. Tendem a reagir mais rapidamente a alterações ambientais graças ao seu crescimento rápido e ao facto de possuírem membranas externas delicadas (Foissener, 1999).

Os principais bioindicadores usados na determinação da qualidade da água são os macroinvertebrados bentônicos, os peixes e as algas. O facto de os macroinvertebrados estarem confinados a um determinado local e de durante o seu ciclo de vida apresentarem longos períodos de vida aquática, torna-os ideais para avaliar as condições locais. A presença de espécies de maior sensibilidade é útil para detetar alterações ambientais de curto prazo. Por outro lado, os impactos ambientais tendem a manifestar-se sobre as comunidades de macroinvertebrados bentônicos de maneira previsível através, por exemplo, da redução da diversidade e do tamanho dos indivíduos de espécies dominantes. Os peixes, devido à sua elevada mobilidade e longevidade, são boas ferramentas para analisar conseqüências de poluição a longo prazo, já que as suas populações são sensíveis a variações de transparência, concentração de oxigénio dissolvido, condutividade e concentração de nutrientes, principalmente o fósforo. Contudo os peixes podem não ocorrer em ecossistemas aquáticos de pequenas dimensões. As algas, por apresentarem ciclos de vida curtos, são sensíveis a alterações súbitas e temporárias de nutrientes, sendo ideais para a identificação destas alterações (Keeler e McLemore, 1996; Naigaga *et al*, 2011).

A nível da poluição atmosférica os musgos e líquenes, sendo organismos cosmopolitas com grande capacidade de acumulação, são utilizados eficazmente como bioindicadores, permitindo a deteção da poluição por metais assim como a de poluentes orgânicos e radioativos. A sua grande capacidade de acumulação é explicada pela ausência de raízes, pela sua cutícula reduzida (musgos) ou ausente (líquenes), a ausência de estomas (líquenes) e pela reduzida espessura foliar com uma única célula, que permite receber e absorver os nutrientes e outros elementos diretamente por deposição atmosférica (Varga *et al*, 2002).

Os vertebrados são utilizados para quantificar o valor de grandes espaços naturais, nomeadamente o “valor de conservação” (Helliwell, 1978; Hiraldo e Alonso, 1985).

Em meio urbano a utilização de bioindicadores é problemática. Com efeito, devido à destruição de habitats naturais e crescimento exagerado de estruturas artificiais com predomínio do betão, a biodiversidade é reduzida, tornando-se difícil encontrar bons bioindicadores, principalmente no que se refere a elementos da macrofauna.

Assim e tendo em conta que musgos e líquenes são relativamente abundantes no meio urbano, por isso sendo já utilizados como indicadores de qualidade ambiental, e que podem servir de habitat (temporário ou permanente) a uma vasta fauna microbiana e de micrometazoários (rotíferos, nematodes, tardígrados, etc...), a possibilidade de incluir também esta fauna em estudos da qualidade de ar não é de desprezar (Conti *et al.*, 2001).

Os tardígrados como bioindicadores

Os tardígrados, vulgarmente designados: “*Ursos de Água*” – são animais microscópicos, de biologia ainda muito desconhecida. Apresentam simetria bilateral e corpo subdividido em cinco segmentos: Um segmento cefálico e quatro segmentos que constituem o tronco. Cada um dos segmentos do tronco apresenta um par de patas não articuladas e frequentemente adornadas com garras (Nelson e Marley, 2000; Brusca e Brusca, 2003).

São considerados como um filo independente, o filo Tardigrada, composto por cerca de 1200 espécies repartidas por três classes: Heterotardigrada, Mesotardigrada e Eutardigrada (Degma *et al.* 2009 – 2014).

A sua taxonomia é baseada sobretudo na morfologia das estruturas esclerificadas como o aparelho buco-faríngeo, garras e cutícula e, nalgumas espécies, também na ornamentação da casca dos ovos (Bertolani e Altiero, 2009).

Os tardígrados podem encontrar-se por todo o globo e em todo o tipo de habitats: Terrestres, marinhos e de água doce. Contudo, os tardígrados terrestres necessitam de um grau de humidade elevado para permanecer num estado metabolicamente ativo. Por isso são frequentemente designados como tardígrados limnoterrestres. Encontram-se sobretudo no solo, na manta-morta, em líquenes e em musgos (Nelson, 2002).

As densidades de tardígrados são altamente variáveis, não sendo conhecidas as condições ótimas de crescimento populacional. Em musgos e líquenes as densidades tendem a variar entre 50 a 200 indivíduos por centímetro cúbico. Variações na densidade populacional dos tardígrados estão associadas a diversos fatores ambientais como temperatura, disponibilidade de alimento, humidade e poluição do ar. É de notar, no entanto, que microhabitats com condições ambientais aparentemente semelhantes localizados na mesma região exibem frequentemente populações diferenciadas quer em termos de densidade quer de riqueza de espécies (Nelson, 2002; Bertolani e Altiero, 2009).

Outros fatores como a competição, parasitismo e predação também são importantes na distribuição dos tardígrados. Entre os predadores de tardígrados encontramos nematodes, outros tardígrados, aracnídeos, ácaros e larvas de insetos. Adicionalmente podem ser infetados por diversos parasitas incluindo protozoários e fungos. Como competidores dos tardígrados pode apontar-se alguns crustáceos e nematodes que também consomem matéria vegetal no mesmo tipo de habitat. Por seu lado a dieta dos tardígrados é altamente variável podendo apresentar-se como predadores de outros micrometazoários (rotíferos, nematodes e outras espécies de tardígrados), ou alimentando-se dos fluídos celulares de algas, musgos, bactérias e detritos orgânicos. (Nelson, 2002).

Uma das principais características dos tardígrados é a sua enorme capacidade para sobreviver em condições ambientais extremas como as motivadas pela dessecação, frio, anoxia, radiações e substâncias químicas (Nelson e Marley 2000). Quando as condições se tornarem desfavoráveis os tardígrados têm a capacidade de entrar num estado de latência denominado de criptobiose. Neste estado perdem virtualmente toda a água intracelular (Hengherr *et al*, 2009) e os processos de crescimento, reprodução, metabolismo e senescência são reduzidos consideravelmente ou interrompidos.

Apesar das enormes lacunas no conhecimento sobre a biologia dos tardígrados, nomeadamente sobre a sua ecologia, atrás referidas, da dificuldade do seu estudo, nomeadamente de identificação (Guidetti e Bertolani, 2005), e, ainda, pelo facto de as capacidades criptobióticas poderem complicar a interpretação dos efeitos dos poluentes, a sua utilização como bioindicadores, nomeadamente como bioindicadores da qualidade do ar, embora em fase embrionária, parece ser promissória. Uma vez que os tardígrados são organismos aquáticos, a sua utilização para estudos de qualidade do ar pode parecer despropositada, mas essa utilização

parece ser potenciada pela sua associação a musgos e líquenes, pela sua ubiquidade e pelas suas reduzidas dimensões, podendo ser extremamente importante em meio urbano onde a predominância de atividades e construção humana condicionam a biodiversidade e conseqüentemente, a disponibilidade de bioindicadores.

Com efeito, os tardígrados foram já utilizados com algum sucesso na avaliação do impacto sobre a qualidade ar provocado por uma central termoelétrica a carvão no Missouri (E.U.A.). Os resultados deste estudo (Hohl *et al.*, 2001) apontaram para uma maior sensibilidade de espécies de Eutardígrados (*Ramazzottius* sp.) e maior tolerância dos Heterotardígrados (*Echiniscus* sp.). Por outro lado, nas estações localizadas sob a influência da central, a abundância de tardígrados era menor. Num outro estudo realizado na Hungria (Vargha *et al.*, 2002), estudou-se a influência de vários metais (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, V e Zn) nas comunidades de tardígrados presentes no musgo *Hypnum cupressiforme*. Os resultados revelaram que a diversidade e densidade de tardígrados diminuíram quando as concentrações de apenas um dos metais aumentaram. De facto, em função daquele impacto, os valores médios de cerca de 100 animais pertencentes a 5-6 espécies, passaram para cerca de 40 animais de 4 -5 espécies.

Objetivos do trabalho

Com este trabalho pretende-se contribuir para um melhor conhecimento sobre a fauna de tardígrados de Portugal e, sobretudo, averiguar as suas potencialidades como indicadores da qualidade do ar em meio urbano. Julga-se, desta forma, dar seguimento a algumas recomendações que a comunidade científica considera fundamentais para a compreensão da biologia destes interessantes organismos (Kinchin, 1994). Por outro lado, espera-se que a informação obtida permita contribuir para, num futuro próximo, melhorar as estratégias de gestão da qualidade ambiental em meio urbano.

Em particular, pretende alcançar-se os seguintes objetivos:

- Inventariar as espécies de tardígrados presentes na área metropolitana do Porto e obter informações relevantes para compreender a ecologia dessas espécies.
- Procurar encontrar relações entre os parâmetros estruturais das comunidades de tardígrados, a qualidade do ar e os teores em metais (cobre, zinco e chumbo) do substrato.

Material e métodos

Localização das estações de amostragem

Para a realização deste estudo escolheram-se oito estações de amostragem na área metropolitana do Porto (Figura 1).

- 1 – Senhora da Hora
- 2 – Afonso Henriques
- 3 – Francisco Sá Carneiro (Campanhã)
- 4 – D. Manuel II
- 5 – Pe Joaquim Neves (Baguim)
- 6 – Meco, Perafita
- 7 – Mindelo, Vila do Conde
- 8 – Espinho

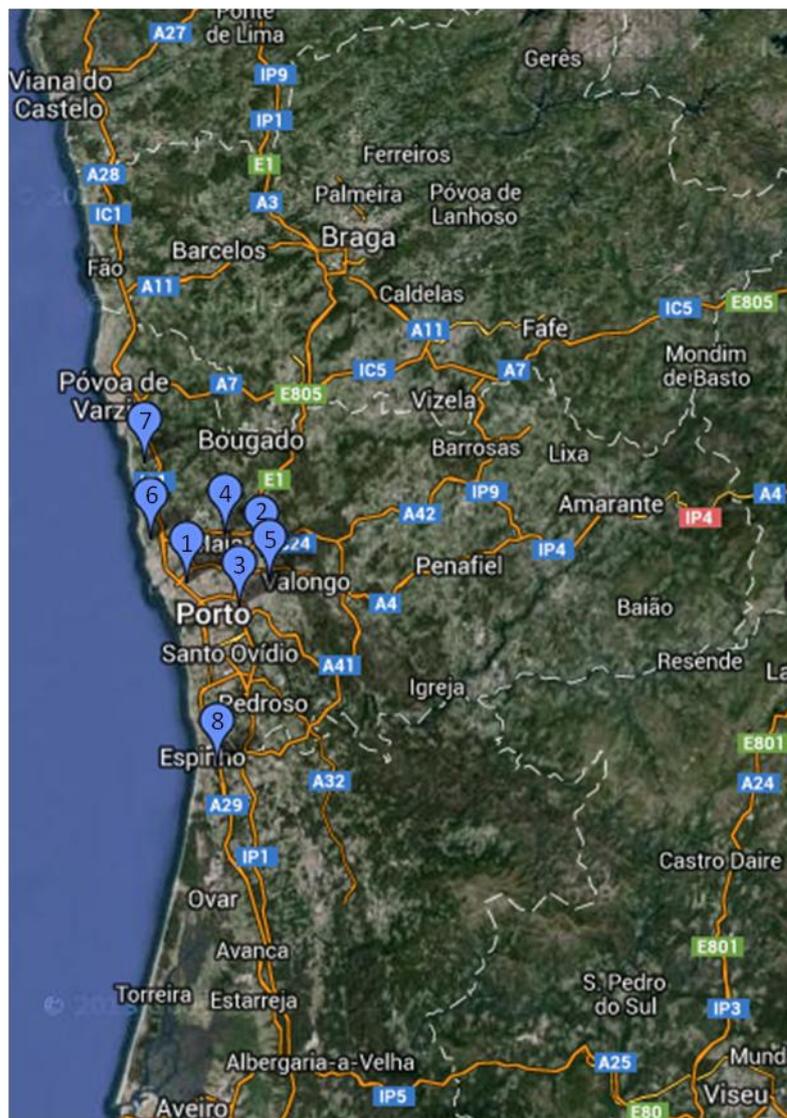


Figura 1 – Localização das estações de amostragem: 1- Sr. da Hora. 2- Afonso Henriques, Águas Santas. 3- Francisco Sá Carneiro, Campanhã. 4- D.Manuel II, Vermoim. 5- Pe. Joaquim Neves, Baguim. 6– Meco, Perafita. 7- Mindelo, Vila do Conde. 8- Espinho.

Caracterização das estações de amostragem

A seleção das estações não foi arbitrária. Pretendeu-se que elas traduzissem diferentes graus de contaminação atmosférica. Para isso teve-se em conta a intensidade de tráfego automóvel e a proximidade de zonas industriais. Recorreu-se, ainda, à informação sobre a qualidade do ar disponibilizada diariamente pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA) (<http://qualar.apambiente.pt/>) no período entre 01/01/2011 e 15/09/2011 (anexo 1). Face ao exposto, as diferentes estações podem ser assim caracterizadas:

Local 1 - Senhora da Hora: Área urbana, com tráfego intenso, junto ao Itinerário Complementar n.º 1. Presença de pequenas áreas verdes. Concelho de

Matosinhos. Coordenadas geográficas: 41°11'10"N por -8°39'47"W. Possui a mais elevada percentagem de dias classificados como muito maus para SO₂, assim como a terceira mais elevada percentagem do mesmo para NO₂ e PM₁₀. Para CO esta percentagem é moderada. Valores de O₃ não disponíveis.

Local 2 - Afonso Henriques: Área urbana, com tráfego intenso, junto ao Itinerário Principal n.º 1. Concelho de Maia. Coordenadas geográficas: 41°11'55"N por -8°34'32"W. Sem zonas verdes. Possui a mais elevada percentagem de dias classificados como muito maus para NO₂, a segunda maior percentagem do mesmo para CO e a terceira maior para SO₂. Valores de O₃ e PM₁₀ não disponíveis.

Local 3 - Francisco Sá Carneiro: Área urbana, com tráfego intenso, junto ao Itinerário Principal n.º 1. Presença de áreas verdes: Parque de S.Roque e Jardim Dr. Francisco Sá Carneiro. Concelho do Porto. Coordenadas geográficas: 41°09'52"N por -8°35'22"W. Possui as mais elevadas percentagens de dias classificados como muito maus para PM₁₀ e CO, assim como a segunda maior percentagem do mesmo para NO₂. Percentagens baixas de O₃. Valores de SO₂ não disponíveis.

Local 4 - D.Manuel II: Área urbana, com tráfego intenso, junto à Circular Regional Exterior do Porto. Sem áreas verdes. Concelho de Maia. Coordenadas geográficas: 41°14'08"N por -8°37'07"W. Possui a mais elevada percentagem de dias classificados como muito maus para O₃, a segunda maior percentagem do mesmo para SO₂, e a terceira maior percentagem para CO. Percentagens intermédias de NO₂ e PM₁₀.

Local 5 - Pe. Joaquim Neves: Área urbana, com tráfego intenso. Presença de abundantes áreas verdes. Concelho de Gondomar. Coordenadas geográficas: 41°11'17"N por -8°32'58"W. Possui a segunda mais elevada percentagem de dias classificados como muito maus para O₃, a quarta menor percentagem do mesmo para NO₂ e CO. Valores de PM₁₀ e SO₂ não disponíveis.

Local 6 - Meco, Perafita: Área suburbana. Proximidade da Refinaria de Matosinhos. Abundantes áreas verdes. Concelho de Matosinhos. Coordenadas geográficas: 41°13'56"N por -8°42'47"W. Possui a menor percentagem de dias classificados como muito maus para O₃, a segunda mais elevada percentagem do mesmo para PM₁₀, a segunda menor percentagem de SO₂ e as terceiras mais baixas percentagens para CO e NO₂.

Local 7 - Mindelo: Área suburbana. Abundantes áreas verdes. Presença de zonas agrícolas. Concelho de Vila do Conde. Coordenadas geográficas: 41°18'31"N por -8°43'15"W. Possui a menor percentagem de dias classificados como muito maus para SO₂, a terceira maior percentagem do mesmo para O₃ e a segunda menor percentagem para NO₂, PM₁₀ e CO.

Local 8 - Espinho: Área suburbana. Abundantes áreas verdes. Em proximidade do Itinerário Complementar n.º 1. Concelho de Espinho. Coordenadas Geográficas: 40°59'58"N por -8°37'24"W. Possui as menores percentagens de dias classificados como muito maus para NO₂, CO e PM₁₀ e a 3ª menor percentagem do mesmo para SO₂. Valores de O₃ não disponíveis.

Através da informação disponibilizada pela APA foi, ainda, realizada a valorização do grau de poluição local. Foram tidos em consideração as concentrações de 5 poluentes distintos: ozono (O₃), dióxido de azoto (NO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂) e partículas finas ou inaláveis (PM₁₀).

Para o efeito, os valores de concentração dos poluentes considerados foram subdivididos em classes às quais se atribuiu uma determinada pontuação cuja média forneceu um índice global correspondente a uma classe de qualidade. Como critério de qualidade recorreu-se ao Decreto-Lei n.º 102/2010, de 23 de Setembro, que estabelece para cada um destes poluentes um valor limite, definido como: *“um nível fixado com base em conhecimentos científicos com o intuito de evitar, prevenir ou reduzir os efeitos nocivos na saúde humana e ou no ambiente, a atingir num prazo determinado e que, quando atingido, não deve ser excedido”*. Esse valor limite permite classificar uma qualidade do ar como sendo “muito má”. Note-se que os valores divulgados pela APA para o monóxido de carbono foram sempre muito superiores ao limite considerado no Decreto-Lei n.º 102/2010 que é de 10µg/m³. Por isso, e para ser possível diferenciar as estações de amostragem, todas de péssima qualidade quanto a este parâmetro, foi arbitrariamente criado um novo valor limite de 1000µg/m³. Com base nestes valores limite foram consideradas três outras classes de qualidade do ar: Má, Razoável e Boa (Tabela 1 e 2).

| | O ₃ | NO ₂ | CO | SO ₂ | PM ₁₀ | Pontuação |
|----------|----------------|-----------------|----------|-----------------|------------------|-----------|
| Muito má | >120 | >200 | >1000 | >125 | >50 | 1 |
| Má | 120-100 | 200-100 | 1000-500 | 125-30 | 50-30 | 2 |
| Razoável | 100-50 | 100-50 | 500-150 | 30-005 | 30-15 | 3 |
| Boa | <50 | <50 | <150 | <5 | <15 | 4 |

Tabela 1 – Correspondência de classe de qualidade de ar com concentração de poluente expressa em µg/m³

Como as concentrações dos parâmetros considerados variam consideravelmente ao longo do tempo, calculou-se o número de dias em que os valores dessas concentrações correspondiam a determinada classe (Tabela 1). Entende-se que o resultado obtido pela multiplicação da pontuação referente a cada classe de qualidade pela frequência de ocorrência de dias em que os valores se encontravam dentro de cada classe (exemplo para O₃ em D. Manuel II: Pontuação O₃ = (0,064 x 1) + (0,098 x 2) + (0,695 x 3) + (0,144 x 4) = 2,92, representativo de qualidade razoável) fornece um valor bem mais consistente.

Assim, embora de forma grosseira, verificou-se que todas as estações apresentam uma qualidade do ar que, globalmente, se pode considerar “razoável”. Contudo, as estações 6, 7 e 8 salientaram-se pela melhor qualidade global do ar, cada uma delas com dois parâmetros de boa qualidade (pontuação > 3,50). Com pior qualidade do ar destacaram-se as estações 1, 2 e 3 (pontuação global 2,90). As estações 4 e 5 encontravam-se numa posição intermédia (tabela 2).

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| O ₃ | ND | ND | 3,12 | 2,92 | 2,92 | 3,25 | 2,88 | ND |
| NO ₂ | 3,05 | 2,48 | 2,63 | 3,41 | 3,40 | 3,57 | 3,74 | 3,73 |
| CO | 2,60 | 2,38 | 2,16 | 2,56 | 2,93 | 2,84 | 3,11 | 2,58 |
| SO ₂ | 3,03 | 3,47 | ND | 3,09 | ND | 3,70 | 3,90 | 3,54 |
| PM ₁₀ | 2,52 | ND | 2,43 | 2,97 | ND | 2,65 | 2,94 | 3,07 |
| Qualidade do ar | 2,80 | 2,78 | 2,59 | 2,99 | 3,08 | 3,20 | 3,31 | 3,23 |

Tabela 2 – Correspondência de classe de qualidade de ar com concentração de poluente expressa em µg/m³. ND – Dados não disponíveis.

Técnicas de amostragem

A amostragem foi realizada no período compreendido entre 1 de Outubro e 30 Novembro de 2012. Para cada uma das estações de amostragem precedeu-se à recolha de subamostras de musgos e líquenes presentes em árvores, muros e formações rochosas para o estudo das comunidades de tardígrados e para determinação da concentração em metais (zinco, cobre e chumbo). As amostras de musgos e líquenes recolhidas foram secas até peso constante a temperatura

ambiente, e guardadas em envelopes de papel até ao momento das análises químicas e biológicas.

Determinação das concentrações em metais nas amostras de musgos e líquenes

Preparação das amostras

Em cada estação de amostragem selecionaram-se 1,5g de líquenes e 1,5g de musgos que foram cuidadosamente limpos e divididos em 3 réplicas de 0,5g para eliminar eventuais erros experimentais.

Digestão

A cada amostra foi adicionado 1ml de HNO₃ concentrado e 6ml de H₂O₂. Seguidamente as amostras foram colocadas no micro-ondas onde foi realizada a digestão do material biológico. No micro-ondas as amostras foram expostas a 5 min sobre potência de 250W, seguido por 5 min a 400W e 5 min a 500W, num total de 15 minutos de exposição. Posteriormente, foram sujeitas a um período de arrefecimento de 10 minutos, removidas do micro-ondas e colocadas numa hote por um período não inferior a 30 minutos. Após a realização da digestão, e posterior arrefecimento, o material foi diluído através da adição de água destilada até perfazer um volume de 15ml.

Doseamento de metais

Para o doseamento dos metais recorreu-se à espectrofotometria de absorção atómica com atomização de chama (AAS-F). Para cada metal a analisar, zinco (Zn), cobre (Cu) e chumbo (Pb) foi previamente elaborada uma reta de calibração através da determinação da absorvância de soluções padrão de diferentes concentrações: 0mg/L, 0,1 mg/L, 0,25mg/L, 0,5mg/L, 1mg/L e 3mg/L.

Para a determinação da concentração de metais nas amostras (em µg/g), realizada através da respetiva absorvância, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C = \frac{(A - I)}{D} * F * 1000$$

Onde:

A – absorvância

D – Declive da reta de calibração

I – Interceção da reta de calibração

F – Fator de diluição.

M – Massa de amostra de substrato

Existindo 3 réplicas, a concentração de metais foi determinada através do cálculo da média dos resultados obtidos para cada réplica.

Métodos de estudo dos tardígrados

Extração e triagem

A extração e triagem dos tardígrados presentes nos musgos e líquenes foi, com algumas modificações, efetuada de acordo com a técnica descrita por Degma (2010). Para extrair os tardígrados as amostras de musgos e líquenes foram reidratadas. Para o efeito, foram colocadas em gobelets e imersas em água por um período de 24 horas. Deste modo, os tardígrados em anidrobiose regressam a um estado ativo. Findo este período de tempo, os musgos e líquenes foram lavados e espremidos como se de uma esponja se tratasse. A água residual proveniente da lavagem foi colocada em pequenas placas de Petri e observada ao estereoscópio (Wild, com ampliação de 50x). Os tardígrados e ovos foram então recolhidos com o auxílio de uma micropipeta, contados e, de seguida, processados para identificação.

Identificação

Imediatamente após a triagem, os tardígrados foram transferidos com auxílio de micropipeta para lâminas de microscopia, dando-se início ao processo de montagem. Para que os animais ficassem plenamente distendidos foi necessário provocar um estado de asfixia que se conseguiu através do aquecimento da gota de água em que se encontravam passando a lâmina por uma chama. Depois, o excesso

de água foi removido com a ajuda de papel absorvente. Colocou-se então uma gota de meio de montagem, tendo-se utilizado um meio aquoso - líquido de Hoyer. Para evitar a formação de cristais e proporcionar algum contraste à preparação, adicionou-se uma gota de iodeto de potássio.

Depois de cobertas com lamela e devidamente etiquetadas, as preparações foram colocadas em estufa, a cerca de 45° C, durante aproximadamente uma semana para secagem. Após esta etapa foram seladas com verniz de unhas vulgar.

As preparações foram observadas com objetiva de imersão em óleo (x100) num microscópio de contraste de fase Axioscope Zeiss equipado com câmara digital e software Axiovision 4.7 Imaging System com módulo de medição. Sempre que possível, os indivíduos foram identificados até à espécie, com base na morfologia e morfometria, com auxílio à monografia de Ramazzotti e Maucci (1983) e à descrição original das várias espécies. Em muitos casos de Eutardígrados a ausência de ovos impediu que a identificação prosseguisse até ao nível espécie.

Parâmetros estruturais da comunidade

A informação relativa à estrutura das comunidades de tardígrados foi sintetizada através de parâmetros estruturais da comunidade. Calculou-se o índice de diversidade de Shannon e Weaver (1949). Este índice, independente do tamanho da amostra, traduz a estabilidade da comunidade e é obtido através da seguinte equação:

$$H' = - \sum \frac{n_1}{N} \ln \frac{n_1}{N}$$

Onde:

n_1 – Número de indivíduos de cada espécie

N - Número total de indivíduos

A diversidade é máxima quando todos os grupos são equiparáveis o que pode ser avaliado através da regularidade que é determinada pela seguinte fórmula:

$$E = \frac{H'}{\ln (s)}$$

Onde:

H' - Valor do índice de diversidade Shannon-Weaver

s - Número de espécies na comunidade

Além dos índices mencionados, também se recorreu à redução da informação obtida de uma forma simplista, através da comparação do número de espécies e de indivíduos.

Tratamento estatístico

Correlação não paramétrica

Para correlacionar alguns conjuntos de variáveis, utilizou-se um índice de correlação não paramétrico, o índice de Correlação de Spearman, descrito, entre outros por Corder e Foreman (2009). Esta correlação varia entre -1 e +1, conforme há, respetivamente, uma discordância ou uma concordância absoluta entre a magnitude (categoria) das variáveis dos dois conjuntos.

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n^3 - n}$$

Onde:

d – Diferença aritmética entre as categorias das duas variáveis

n – Número de unidades de amostragem

Análise multivariável

Alguns métodos utilizados para exprimir a informação biológica de que os índices de diversidade e regularidade atrás referidos são exemplo, são demasiado sintéticos, obrigando ao recurso a métodos estatísticos que permitam uma melhor conservação da informação como é o caso da análise multivariável. Com efeito, os dados ecológicos são multidimensionais (na maior parte dos casos as amostras são caracterizadas por várias variáveis, como número de organismos de cada espécie), resultando em matrizes ininterpretáveis no seu estado bruto. As técnicas de análise

multivariável permitem detetar relações complexas entre variáveis e estrutura-las de forma operacional. Neste trabalho, a informação contida nos dados biológicos foi extraída através duma técnica de ordenação. A ordenação é a colocação de um conjunto de objetos (estações de amostragem, por exemplo) num dado espaço devidamente dimensionado (Sneath e Sokal, 1973). A técnica utilizada neste trabalho foi a “Análise em Componentes Principais” (PCA). Para realizar esta análise recorreu-se ao programa Statistica, versão 12 (Stat-Soft. Inc 1984-2013). Pela Análise em Componentes Principais foi calculada uma matriz de correlações entre variáveis a partir da matriz original de dados (objetos = estações de amostragem x variáveis = número de indivíduos de cada espécie), previamente transformada através da equação $x' = \log(x + 1)$ para reduzir a variância. A partir da matriz de correlações foram extraídos os valores e vetores próprios associados às variáveis. Os vetores próprios, tanto como as variáveis, são ortogonais e descrevem, com economia, as relações entre os objetos. Os valores próprios traduzem a percentagem de variabilidade total expressa para cada uma das componentes principais. Pela multiplicação da matriz original pela matriz de vetores próprios obteve-se uma nova matriz que permitiu a projeção dos objetos num sistema de eixos ortogonais (as componentes principais). A direção do primeiro eixo (PC1 - componente 1) corresponde à direção segundo a qual se verifica uma maior dispersão dos objetos; a direção do segundo eixo (PC2 – componente 2) é perpendicular à do primeiro e corresponde à segunda maior dispersão. Também se fez a representação gráfica das variáveis sobre as componentes principais cujas coordenadas foram os vetores próprios.

Resultados e discussão

Concentrações de metais em musgos e líquenes

As concentrações de zinco (anexo 2; figura 2) podem ser consideradas elevadas para quase todas as estações de amostragem. Apenas nas estações 7 (Mindelo) e 8 (Espinho) os valores se situaram próximo dos 50 $\mu\text{g/g}$. Nas estações 5 (Pe. Joaquim Neves) e 6 (Meco, Perafita) as concentrações já ultrapassaram o limiar de 55 $\mu\text{g/g}$, indicado por Varga *et al.* (2002) como “valor limite relativo” que, se ultrapassado, se traduz num impacto significativo sobre as comunidades de tardígrados.

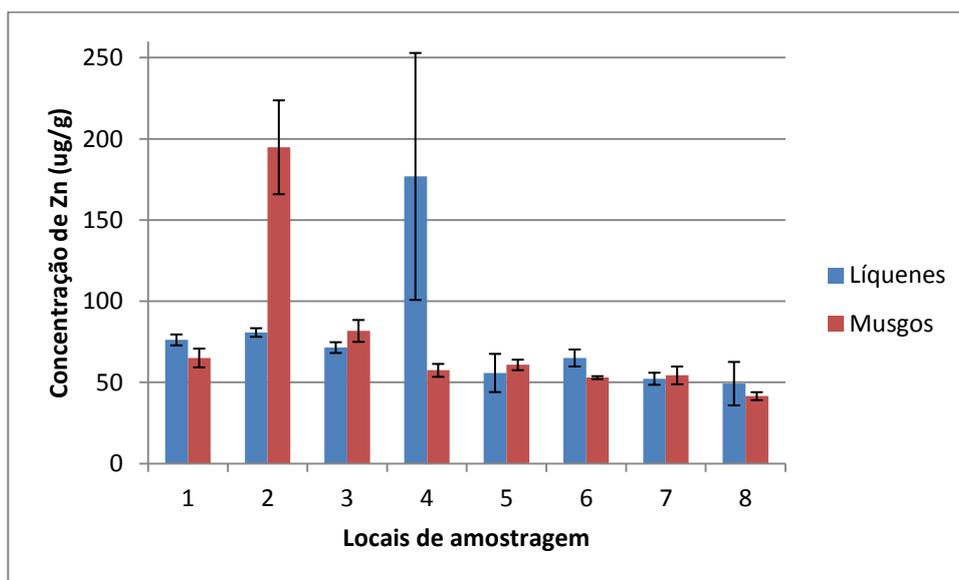


Figura 2 – Concentrações de Zinco por local de amostragem e por substrato

As estações 1 (Senhora da Hora) e 3 (Francisco Sá Carneiro, Campanhã) ultrapassaram claramente aquele limiar com valores próximos dos 75 $\mu\text{g/g}$. Muito preocupante é a situação das estações 2 (Afonso Henriques) e 4 (D. Manuel II) com valores próximos dos 200 $\mu\text{g/g}$ em musgos e líquenes respetivamente. Com exceção destas últimas estações em que as concentrações de zinco foram muito diferentes conforme o tipo de substrato, nas restantes os valores obtidos para musgos e líquenes foram muito semelhantes.

No que diz respeito às concentrações de cobre (anexo 2; figura 3), e tendo como referência o “*valor limite relativo*” de 20 $\mu\text{g/g}$ capaz de causar perturbações nas comunidades animais (Varga *et al*, 2002), verificou-se que nas estações 4, 6, 7 e 8 as concentrações se situaram abaixo do limiar de referência, com especial ênfase para as estações 6 e 8.

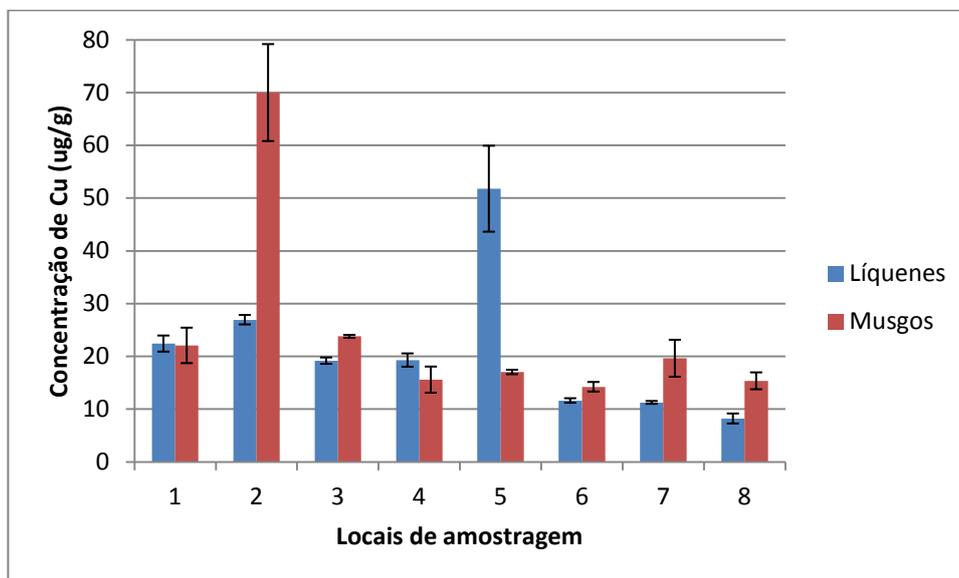


Figura 3 – Concentrações de Cobre por local de amostragem e por substrato

Nas estações 1 e 3 o limiar de referência foi ligeiramente ultrapassado, mas nas estações 2 (Afonso Henriques) e 5 (Pe. Joaquim Neves) obtiveram-se valores consideravelmente elevados, superiores a 50 $\mu\text{g/g}$ respetivamente em musgos e líquenes. Com exceção destas duas estações, também para este metal se verificou uma certa homogeneidade entre as concentrações obtidas em musgos e líquenes.

As concentrações de chumbo (anexo 2; figura 4) apenas ultrapassaram o “*valor limite relativo*” de 25 $\mu\text{g/g}$ nocivo para as comunidades de tardígrados (Varga *et al*, 2002) nos musgos das estações 1 (Senhora da Hora), 2 (Afonso Henriques), com valores próximos dos 60 $\mu\text{g/g}$, e 3 (Francisco Sá Carneiro, Campanhã). Nas restantes estações as concentrações obtidas nos musgos e nos líquenes foram semelhantes. Nas estações 4, 7 e 8 as concentrações de chumbo situaram-se bem abaixo do limiar de 20 $\mu\text{g/g}$ que foi atingido nas estações 5 e 6.

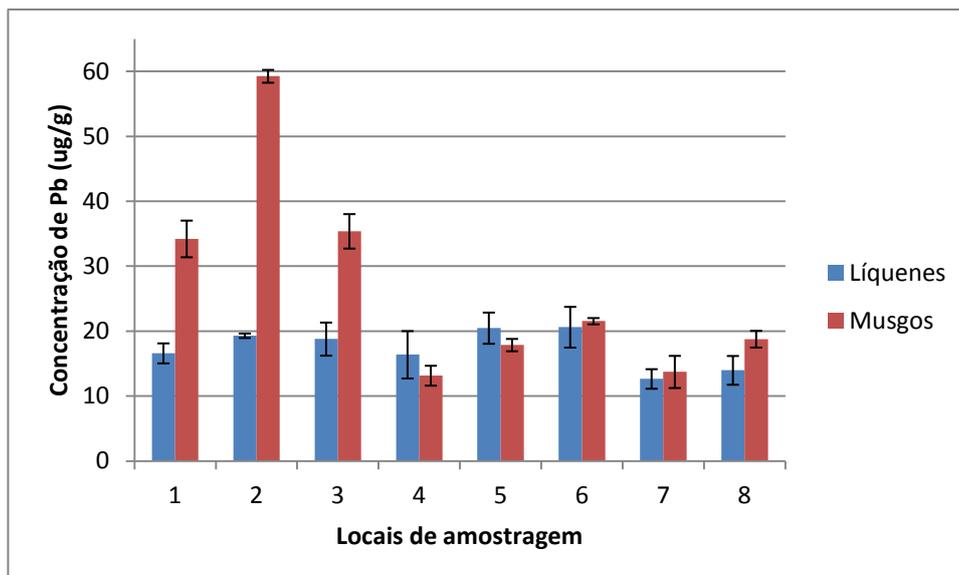


Figura 4 – Concentrações de Chumbo por local de amostragem e por substrato

Uma análise global mostra que a estação 2 (Afonso Henriques) se destacou como sendo a mais poluída já que as concentrações dos três metais estudados foram consistentemente elevadas. Contudo, as estações 1 (Senhora da Hora) e 3 (Francisco Sá Carneiro, Campanhã) apresentaram valores muito elevados de chumbo e ainda elevados para o zinco e o cobre. Na estação 5 (Pe. Joaquim Neves) a concentração de cobre foi muito elevada, enquanto na 4 (D. Manuel II) se obteve um valor elevado para zinco. As estações 6 (Meco, Perafita), apenas com valores próximos do limiar para o chumbo e cobre, e sobretudo 7 (Mindelo) e 8 (Espinho) foram aquelas em que a qualidade do ar, relativamente aos três metais estudados, foi de melhor qualidade.

É interessante verificar que os resultados obtidos para os metais estudados (zinco, cobre e chumbo) estão em perfeita consonância com o índice de poluição atmosférica calculado com base na informação fornecida pela Agência Portuguesa do Ambiente. Assim, as estações 1, 2 e 3 foram as que evidenciaram uma pior qualidade do ar, com especial destaque para a estação 2, as estações 6, 7 e 8 foram as menos poluídas, enquanto as estações 4 e 5 apresentaram níveis intermédios de poluição.

As comunidades de tardígrados

No decurso deste trabalho foi contabilizado um total de 3908 tardígrados pertencentes a 23 espécies e 9 géneros diferentes (anexo 3). Cerca de 90% das amostras estudadas continham tardígrados. Contudo, na realidade, o número de espécies poderá não ultrapassar as 21 porque, de acordo com Ramazzotti e Maucci

(1983) é provável que *Echiniscus canadensis* Murray, 1910, *Echiniscus mediantus* Marcus, 1930 e *Echiniscus trisetosus* Cuénot, 1932 sejam diferentes morfotipos da mesma espécie. A presença do género *Tenuibiotus* Pilato & Lisi, 2011, merece uma referência especial, pois trata-se da primeira citação para Portugal. Infelizmente não foram encontrados ovos, o que impossibilitou a identificação até ao nível espécie. A inclusão de alguns indivíduos no género *Tenuibiotus* baseou-se na morfologia das garras, devendo a sua presença em Portugal ser confirmada no futuro.

As espécies mais abundantes foram *Ramazzottius oberhaeuseri* (Doyère, 1840), à qual pertenciam mais de metade (53,5%) dos indivíduos encontrados, e *Minibiotus furcatus* (Ehrenberg, 1859), que representou cerca de 22%. Estas duas espécies foram também as que apresentaram uma distribuição mais ampla, tendo sido encontradas em todas as estações de amostragem (tabela 3). As espécies *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840, *Macrobiotus hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834, *Minibiotus intermedius* (Plate, 1889) e *Minibiotus orthofasciatus* Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 encontraram-se também bem representadas nas diferentes estações de amostragem. Pelo contrário, os Heterotardígrados, representados pelas seis espécies do género *Echiniscus*, foram observados sempre em números muito reduzidos e de forma muito localizada, apenas em uma ou duas estações. Este elenco de espécies corresponde à comunidade típica de tardígrados presente em musgos e líquenes da região norte de Portugal (Fontoura *et al.* 2009). Inclui também algumas espécies consideradas cosmopolitas como *Ramazzottius oberhaeuseri*, *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840), *Macrobiotus hufelandi*, *Milnesium tardigradum* e *Macrobiotus persimilis* Binda & Pilato, 1972 (Meyer *et al.*, 2013; Peluffo *et al.*, 2006; Peluffo *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2011). Contudo, deve referir-se que estas espécies são consideradas em sentido lato, pois o resultado de estudos recentes aponta para que, cada uma delas, seja, na verdade, um complexo de várias espécies crípticas.

| Espécies | Locais de amostragem | | | | | | | |
|--|----------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>Echiniscus canadensis</i> Murray, 1910 | | 0,52 | | | | | | |
| <i>Echiniscus mediantus</i> Marcus, 1930 | | 0,26 | | | | | | |
| <i>Echiniscus quadrispinosus</i> (Richters, 1902) | | 0,09 | | | | | | |
| <i>Echiniscus scabrospinosus</i> Fontoura, 1982 | | | | | | | | 0,08 |
| <i>Echiniscus testudo</i> (Doyère, 1840) | | | | | 0,09 | 0,21 | | |
| <i>Echiniscus trisetosus</i> Cuénot, 1932 | | 0,26 | | | | | | |
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 1,19 | | | 0,91 | 0,73 | 1,11 | 1,50 | 2,92 |
| <i>Diphyscon pingue</i> (Marcus, 1936) | | | | 0,15 | | | | 1,00 |
| <i>Hypsibius convergens</i> (Urbanowicz, 1925) | | 0,34 | 0,12 | | | | | |
| <i>Hypsibius dujardini</i> (Doyère, 1840) | | 2,92 | | | 0,09 | | | 0,50 |
| <i>Astatumen trinacriae</i> (Arcidiacono, 1962) | | | | | | 0,14 | | 0,17 |
| <i>Ramazottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 35,58 | 50,65 | 19,54 | 46,04 | 0,37 | 0,42 | 0,70 | 14,02 |
| <i>Macrobiotus echinogenitus</i> Richters, 1904 | | | | 0,08 | | 0,42 | | |
| <i>Macrobiotus harmsworthi</i> Murray, 1907 | 0,20 | | | | | 0,97 | 1,60 | 1,50 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 0,13 | 1,89 | | 0,23 | 2,65 | 0,76 | 0,10 | 2,67 |
| <i>Macrobiotus lusitanicus</i> Maucci & D. Pasa, 1984 | 1,19 | | | | 1,00 | | | |
| <i>Macrobiotus persimilis</i> Binda & Pilato, 1972 | | | | | 0,55 | | 11,53 | |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 2,90 | 7,91 | 17,68 | 3,10 | 4,93 | 24,22 | 2,00 | 10,18 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,86 | | 0,35 | 0,23 | 0,73 | 9,97 | 0,10 | 2,75 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 0,92 | 2,92 | | 0,23 | 1,46 | 0,07 | 1,30 | 0,75 |
| <i>Paramacrobiotus areolatus</i> (Murray, 1907) | | 5,68 | | | 1,28 | | | |
| <i>Paramacrobiotus richtersi</i> (Murray, 1911) | | 0,17 | | | 0,55 | | | |
| <i>Tenuibiotus sp.</i> Pilato & Lisi, 2011 | 4,02 | | | | | | | |

Tabela 3 – Densidade das espécies de Tardígrados presentes em cada local, expressas em número de indivíduos por grama.

Apesar de escassos, os trabalhos realizados em áreas urbanas têm identificado um número de espécies de tardígrados compreendido entre 4 e 10 (Meyer *et al*, 2013; Peluffo *et al*, 2006; Peluffo *et al*, 2007; Johansson *et al*, 2011). De modo semelhante, neste trabalho, realizado na área metropolitana do Porto, obteve-se, para cada local, um número de espécies semelhante (entre 4 e 12), contudo, não pode esquecer-se que se amostraram áreas periféricas com características mistas (urbano/suburbano), não permitindo uma comparação apropriada.

A estrutura da comunidade de tardígrados e relação com a qualidade do ar.

Face à abundância e distribuição das diferentes espécies de tardígrados pelas estações de amostragem, não é fácil definir espécies mais ou menos sensíveis à

poluição atmosférica. Os resultados parecem apontar para uma maior tolerância das espécies de heterotardígrados do género *Echiniscus* (com exceção de *E. scabrospinosus* Fontoura, 1982), e dos eutardígrados *Hypsibius convergens* (Urbanowicz, 1925), *Macrobotus lusitanicus* Maucci & D. Pasa, 1984, *Paramacrobotus areolatus* (Murray, 1907), *P. richtersi* (Murray, 1911) e *Tenuibiotus* sp. Na verdade, estas espécies apenas se encontraram nas estações de pior qualidade. Pelo contrário, *Echiniscus scabrospinosus*, *Astatumen trinacriae* (Arcidiacono, 1962) e *Macrobotus persimilis* restringiram a sua presença às estações de melhor qualidade. No entanto, a grande maioria destas espécies ocorreu em densidades extremamente reduzidas, sendo mais provável que essa distribuição seja devida ao acaso ou a fatores não relacionados com a qualidade do ar.

Tendo em conta as espécies que ocorreram em densidade mais elevada (> 1 indivíduo/g) e distribuição alargada, os resultados parecem permitir, agora com um maior grau de confiança, a definição de dois grupos de espécies com diferentes graus de tolerância à poluição atmosférica. Assim, as espécies *Milnesium tardigradum*, *Macrobotus harmsworthi* Murray, 1907, *Macrobotus persimilis* e *Minibiotus intermedius*, constituirão um grupo de espécies mais sensíveis, enquanto *Hypsibius dujardini*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, *Macrobotus lusitanicus*, *Paramacrobotus areolatus* e *Tenuibiotus* sp. serão mais tolerantes.

É interessante referir que, apesar de realizados em condições e localizações geográficas muito diferentes, os poucos estudos conhecidos em que se procurou associar a qualidade do ar aos tardígrados apresentam alguns resultados coincidentes. Meininger *et al.* (1985) e Meininger e Spatt (1988), respetivamente em estudos realizados no Ohio, E.U.A. (Cincinnati) sobre a influência na briofauna do enxofre presente na atmosfera, e na tundra do Alasca (E.U.A.) para análise da poluição causada pelo tráfico rodoviário, também verificaram que *Milnesium tardigradum*, *Macrobotus harmsworthi* e *Minibiotus intermedius* eram espécies mais sensíveis e *Hypsibius dujardini* mais tolerante. Hohl *et al.* (2001) estudaram o impacto de uma fábrica de produção de energia elétrica por queima de carvão, localizada no Missouri (E.U.A.), e concluíram que *Milnesium tardigradum* e as espécies dos géneros *Macrobotus* e *Minibiotus* seriam mais sensíveis do que as espécies do género *Echiniscus* e *Ramazzottius oberhaeuseri*.

No que diz respeito aos parâmetros estruturais da comunidade (tabela 4) verificou-se que apenas a estação 3 (Francisco Sá Carneiro) apresentou um número de espécies muito reduzido (n=4). Nas restantes encontraram-se sempre 8 a 12

espécies. A densidade de tardígrados apresentou diferenças consideráveis de estação para estação, tendo variado entre 14,4 na estação 5 (Pe Joaquim Neves, Baguim) e 73,6 ind/g, na estação 2 (Afonso Henriques).

No que diz respeito ao índice de diversidade (H'), variou entre um mínimo de 0,433 na estação 4 (D. Manuel II) e 2,018 na 5 (Pe Joaquim Neves, Baguim). Também foi nessas estações que se observaram os valores extremos da regularidade (E). Assim, verificou-se que a densidade dos indivíduos de cada espécie apresentou uma maior equidade em Baguim, logo seguida pelas estações 7 e 8, respetivamente Vila do Conde e Espinho. Note-se que, também nestas estações a diversidade foi mais elevada.

| Estação de amostragem | Nº de espécies S | Densidade (ind/g) | Regularidade E | Índice de diversidade Shannon-Weaver H' |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|--|
| 1 | 9 | 47,314 | 0,436 | 1,003 |
| 2 | 12 | 73,61 | 0,469 | 1,166 |
| 3 | 4 | 37,679 | 0,546 | 0,757 |
| 4 | 8 | 50,963 | 0,208 | 0,433 |
| 5 | 12 | 14,435 | 0,812 | 2,018 |
| 6 | 10 | 38,269 | 0,465 | 1,072 |
| 7 | 8 | 18,846 | 0,632 | 1,313 |
| 8 | 11 | 36,552 | 0,717 | 1,718 |

Tabela 4 – Parâmetros estruturais da comunidade de tardígrados nas diferentes estações de amostragem.

Os valores dos parâmetros estruturais da comunidade obtidos para a área estudada são mais elevados do que aquilo que seria de esperar. Com efeito, os únicos dados recentes que é possível utilizar como comparação, por terem sido obtidos na mesma área geográfica e nos mesmos tipos de substrato, devem-se a Gonçalves (2013) e foram da mesma magnitude. Aquela autora, obteve em meio suburbano/rural, em Viana do Castelo, valores de diversidade (H') compreendidos entre 0,837 e 1,488, para um número de espécies de 4 a 11. Em meio rural, em Amarante, Gonçalves (2013) encontrou 9 a 10 espécies para uma diversidade de 0,995 a 1,098. Num

ecossistema natural de montanha (Gerês) a riqueza específica manteve-se entre 10 e 11, mas a diversidade (H') foi superior, 1,592 a 1,892.

Em Portugal não se conhecem valores para zonas urbanas. Em trabalhos realizados noutras latitudes obtiveram-se valores de parâmetros estruturais de comunidades de tardígrados muito diversificados. Por exemplo, na cidade de Lake Charles (Louisiana, E.U.A.), Meyer *et al.* (2013) calculou uma diversidade de 1,3, mas na cidade de General Pico (La Pampa, Argentina) a diversidade não ultrapassou o valor de 0,457 (Peluffo *et al.* 2006).

Face ao exposto, as diferenças obtidas nos valores dos parâmetros estudados são de difícil interpretação. Elas parecem ser indicativas de alguma influência da poluição. Repare-se que, efetivamente, nas estações 6, 7 e 8, os valores de diversidade foram superiores aos obtidos em estações mais poluídas, como as estações 3 e 4.

A tendência para a possibilidade dos parâmetros estruturais traduzirem a qualidade do ar parece também poder ser observada, embora dificilmente, pelo cálculo do índice de correlação de Spearman entre a qualidade do ar e os parâmetros estruturais da comunidade (tabela 5). Apenas para o caso do zinco se encontraram valores de correlação significativos entre os parâmetros estruturais (excetuo para o número de espécies) e a concentração daquele metal.

| | IQ | Zn | Cu | Pb |
|-------|--------|---------|--------|--------|
| S | 0,113 | -0,089 | -0,107 | 0,256 |
| Ind/g | -0,571 | 0,833* | 0,286 | 0,476 |
| E | 0,381 | -0,667* | -0,048 | -0,167 |
| H' | 0,571 | -0,690* | -0,024 | -0,214 |

Tabela 5 – Valores do índice de correlação de Spearman (r_s) entre os parâmetros estruturais da comunidade. IQ - índice de qualidade do ar calculado com base na informação disponibilizada pela APA (ver tabela 2) concentração de zinco (Zn), concentração de cobre (Cu), concentração de chumbo (Pb). Correlações significativas ($p > 0,05$) são assinaladas com asterisco (*).

Contudo, os fracos valores de correlação obtidos e o facto de algumas estações apresentarem características diferentes sugerem a existência de outros fatores a condicionar a estrutura das comunidades de tardígrados. Note-se, por exemplo, que as estações com diversidade mais elevada (6, 7 e 8) são precisamente as que se localizam em áreas suburbanas. De notar que na estação urbana em que se

obteve uma maior diversidade e uma maior regularidade (estação 5), há grande abundância de zonas verdes.

Os resultados da análise em componentes principais (PCA), apesar de exprimirem apenas 54% da variabilidade total, permitiram compreender melhor as relações entre os teores de metais pesados, a estrutura das comunidades e as diferentes estações de amostragem.

A influência do tipo de substrato é claramente visível pela separação das amostras obtidas nos líquenes e nos musgos (figura 5B). De um modo geral, as amostras provenientes de líquenes apresentam, comparativamente aos musgos, valores positivos da componente 1 e, com exceção da estação 6, valores negativos da componente 2. Os líquenes parecem ser caracterizados pela presença e maior abundância das seguintes espécies: *Milnesium tardigradum*; *Macrobotus hufelandi*; *Minibiotus furcatus*; *Minibiotus orthofasciatus*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, e *Echiniscus quadrispinosus* (Figura 5A).

A influência da qualidade do ar é evidenciada pela distribuição das estações ao longo da componente 1, aquela que traduz a maior variabilidade (24%). Com valores elevados desta componente foram representadas as estações em que a qualidade do ar parecia ser melhor (6, 7 e 8), enquanto a estação 2 apresentou valores muito negativos desta componente (Figura 5B). Esta estação caracterizada pela presença de *Echiniscus canadensis*, *E. mediantus*, *E. trisetosus*, *Paramacrobotus areolatus* e altas concentrações de chumbo, cobre e zinco (Figura 5A). Assim, a análise em componentes principais parece confirmar a suposição de que, pelo menos, as espécies *Astatumen trinacriae*, *Minibiotus intermedius* e *Milnesium tardigradum* apresentaram maior sensibilidade, caracterizando as estações de melhor qualidade.

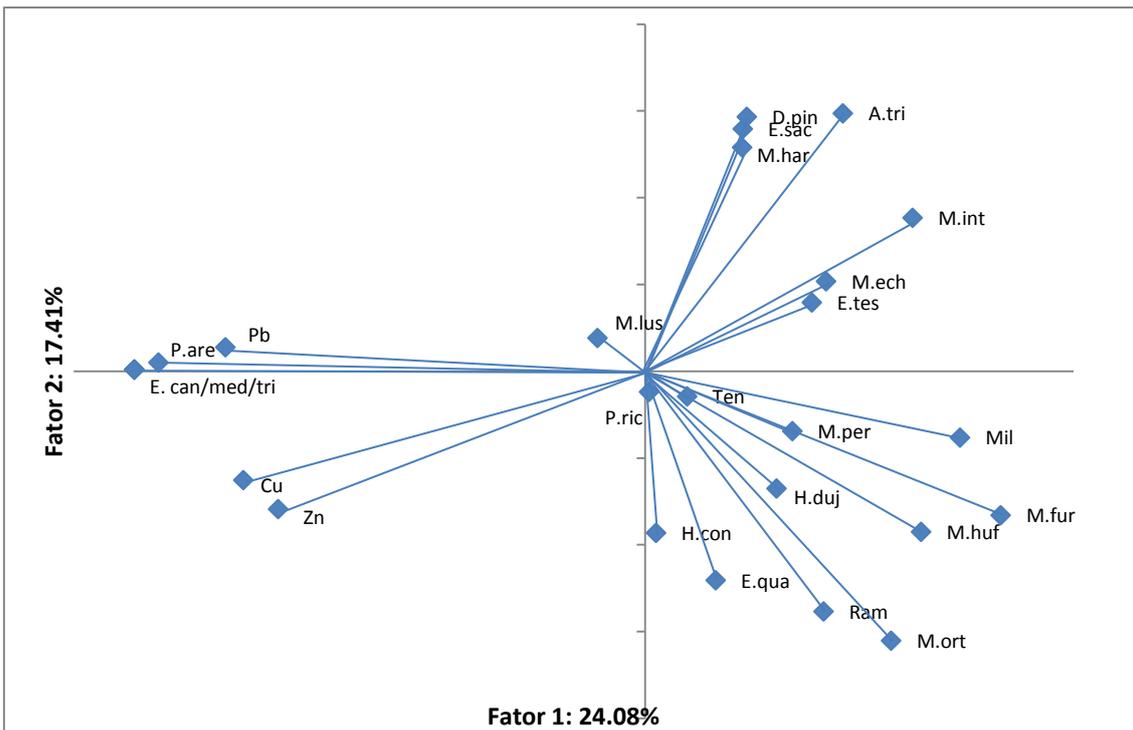


Figura 5 A. Representação das variáveis, espécies e concentração de metais no plano das duas primeiras componentes principais (fator 1 e 2): Zn - Zinco. Cu - Cobre. Pb - Chumbo. E. can/med/tri - *Echiniscus canadensis/ mediantus/ trisetosus*. E. qua - *Echiniscus quadrispinosus*. E. sac - *Echiniscus scabrospinosus*. E. tes - *Echiniscus testudo*. Mil - *Milnesium tardigradum*. D. pin - *Diphascon pingue*. H. con - *Hypsibius convergens*. H. duj - *Hypsibius dujardini*. A. tri - *Astatumen trinacriae*. Ram - *Ramazzottius oberhaeuseri*. M. ech - *Macrobiotus echinogenitus*. M. har - *Macrobiotus harmsworthi*. M. huf - *Macrobiotus hufelandi*. M. lus - *Macrobiotus lusitanicus*. M. per - *Macrobiotus persimilis*. M. fur - *Minibiotus furcatus*. M. int - *Minibiotus intermedius*. M. ort - *Minibiotus orthofasciatus*. P. are - *Paramacrobiotus areolatus*. P. ric - *Paramacrobiotus richtersi*. Ten - *Tenuibiotus sp.*

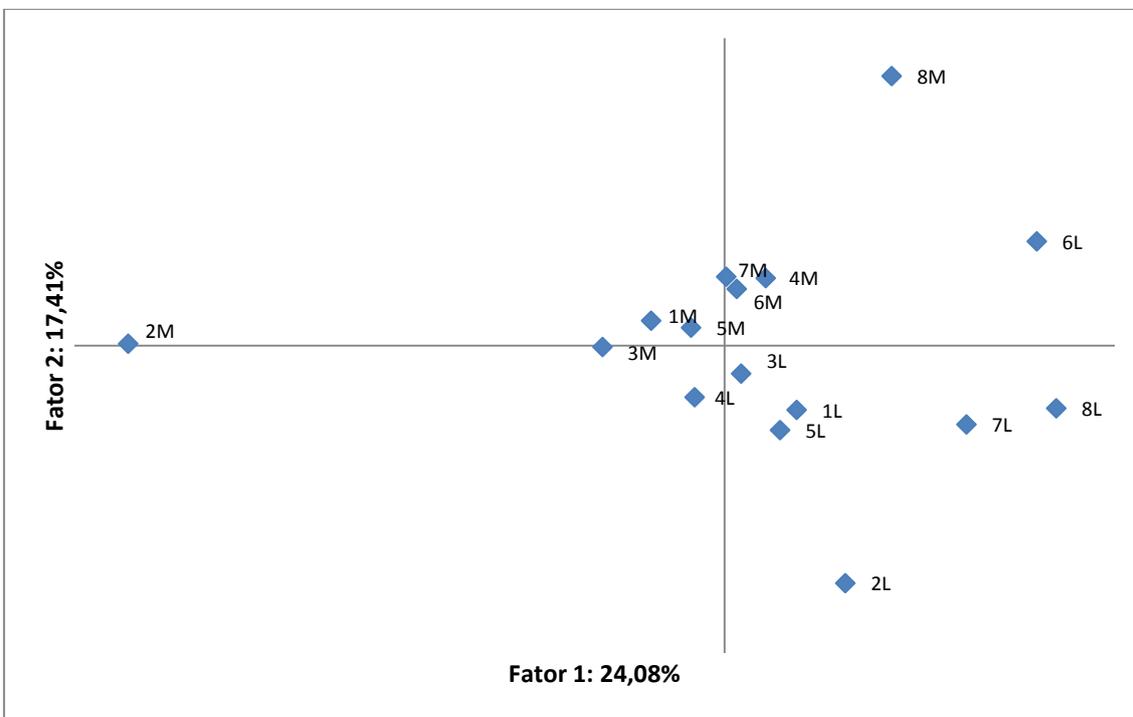


Figura 5 B. Ordenação das estações de amostragem no plano das duas primeiras componentes principais (fator 1 e 2). As estações estão identificadas pelo número e pelas letras L – líquenes e M – musgos.

A variabilidade expressa pela terceira componente (Figura 6A e 6B), apenas cerca de 13%, não traz grande informação adicional, permitindo, no entanto, reforçar as conclusões obtidas em relação à influência da qualidade do ar. Também é observável, em menor grau, separação de amostras por substrato com as amostras de musgos contendo predominantemente valores menores desta componente em relação às amostras de líquenes (figura 6A), sendo caracterizados pela presença das espécies *Hypsibius convergens*, *Diphascon pingue*, *Echiniscus scabrospinosus*, *Macrobiotus harmsworthi* e *Hypsibius dujardini* (figura 6B).

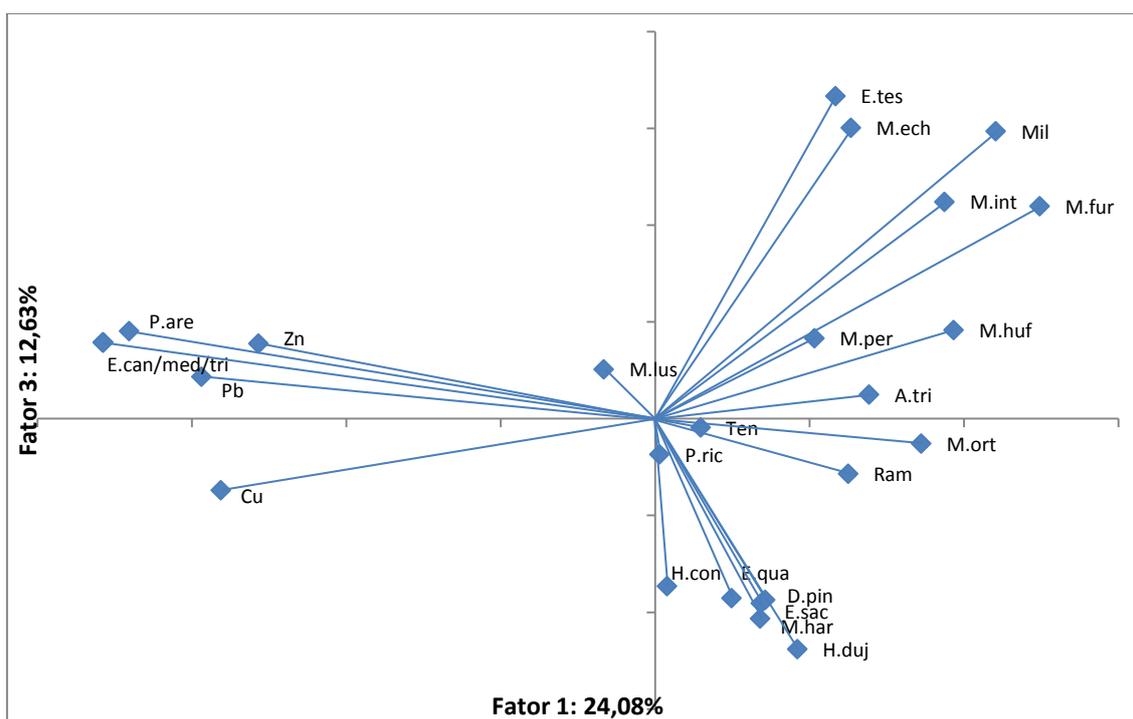


Figura 6 A. Representação das variáveis, espécies e concentração de metais no plano de duas componentes principais (fator 1 e 3): Zn - Zinco. Cu - Cobre. Pb - Chumbo. E. can/med/tri - *Echiniscus canadensis/ mediantus/ trisetosus*. E. qua - *Echiniscus quadrispinosus*. E. sac - *Echiniscus scabrospinosus*. E. tes - *Echiniscus testudo*. Mil - *Milnesium tardigradum*. D. pin - *Diphascon pingue*. H. con - *Hypsibius convergens*. H. duj - *Hypsibius dujardini*. A. tri - *Astatumen trinacriae*. Ram - *Ramazzottius oberhaeuseri*. M. ech - *Macrobiotus echinogenitus*. M. har - *Macrobiotus harmsworthi*. M. huf - *Macrobiotus hufelandi*. M. lus - *Macrobiotus lusitanicus*. M. per - *Macrobiotus persimilis*. M. fur - *Minibiotus furcatus*. M. int - *Minibiotus intermedius*. M. ort - *Minibiotus orthofasciatus*. P. are - *Paramacrobiotus areolatus*. P. ric - *Paramacrobiotus richtersi*. Ten - *Tenuibiotus sp.*

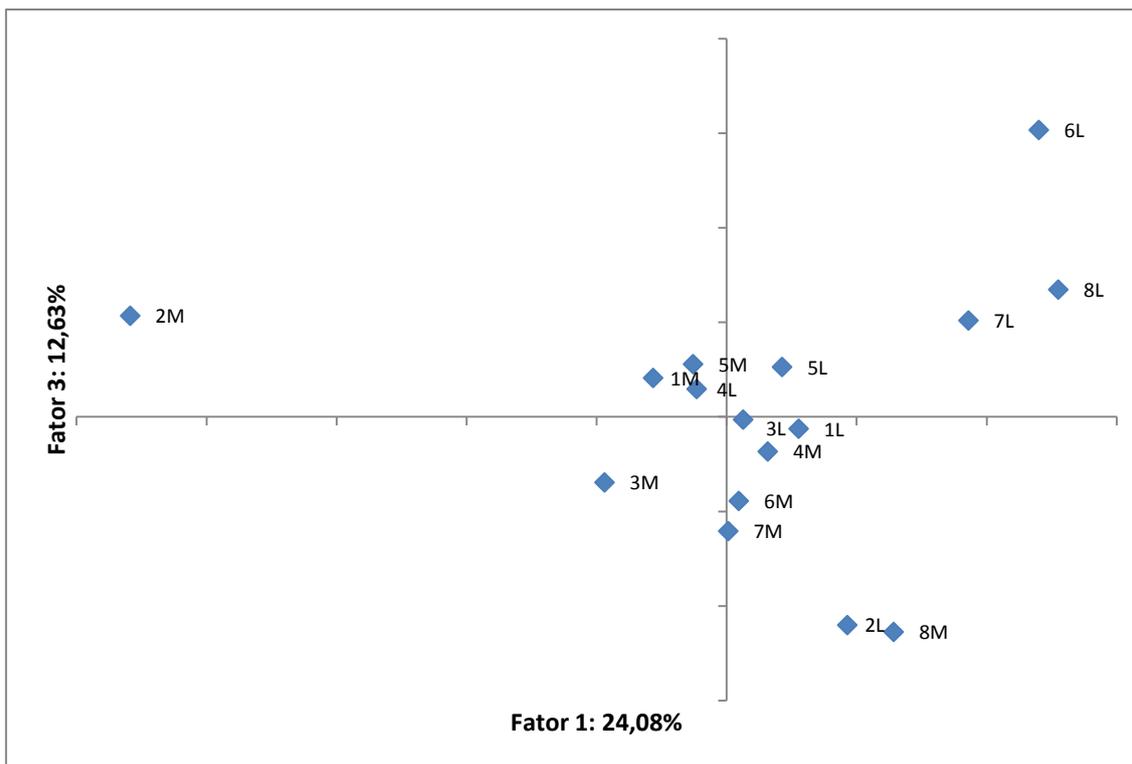


Figura 6 B. Ordenação das estações de amostragem no plano de duas componentes principais (fator 1 e 3). As estações estão identificadas pelo número e pelas letras L – líquenes e M – musgos.

A falta de correlação esperada pode dever-se ao facto de que as densidades populacionais, assim como a diversidade de espécies diferentes de tardígrados serem altamente variáveis de local para local, mesmo entre microhabitats semelhantes, variando de acordo com diversas condições ambientais como temperatura, altitude, substrato e humidade (Guil *et al*, 2009). Uma vez que a biologia e ecologia dos tardígrados ainda é muito mal conhecida, diversos fatores desconhecidos podem influenciar as distribuições dos mesmos. Foram efetuadas diversas amostragens por local (média de 7, entre 6 e 8), mas este número pode ter sido insuficiente.

Também não foi avaliada neste estudo a presença e impacto de predadores naturais, parasitas e competidores que podem afetar as populações observadas.

É de notar também que os dados fornecidos pela Agencia Portuguesa do Ambiente são incompletos, por exemplo, no local 5 não são indicadas a presença de SO_2 e PM_{10} , sugerindo a possibilidade de o nível de poluição neste local estar a ser sobrevalorizado.

Conclusão

A informação obtida neste trabalho foi relativamente reduzida, quer do ponto de vista das análises químicas quer das biológicas. Com efeito, essa informação foi fortemente condicionada pelo limitado número de locais de estudo e pelo facto de as amostragens não refletirem eventuais efeitos sazonais. Apesar disso, os resultados obtidos sugerem algumas conclusões sobre a resposta das comunidades de tardígrados face à poluição atmosférica:

- A poluição atmosférica na área metropolitana do Porto parece ser considerável. As concentrações dos metais pesados estudados foram relativamente elevadas e capazes de causar perturbações nas comunidades animais em toda a área metropolitana do Porto. Contudo, nas zonas suburbanas de Matosinhos (Perafita) e, sobretudo, Mindelo e Espinho a situação era menos gravosa.

- As comunidades de tardígrados estudadas eram relativamente ricas, tendo sido inventariadas 23 espécies pertencentes a 9 géneros. Aumentou-se consideravelmente o conhecimento sobre a distribuição geográfica dos tardígrados da fauna de Portugal. Com efeito, a presença das espécies *Echiniscus canadensis*, *E. mediantus*, *E. trisetosus*, *Hypsibius dujardini*, *Macrobiotus echinogenitus*, *Macrobiotus persimilis* e *Paramacrobiotus areolatus* foi, pela primeira vez, registada para o distrito do Porto. O género *Tenuibiotus* é, neste trabalho, citado pela primeira vez para Portugal.

- As espécies *Milnesium tardigradum*, *Macrobiotus harmsworthi*, *Macrobiotus persimilis* e *Minibiotus intermedius*, parecem poder ser englobadas num grupo de espécies mais sensíveis à poluição atmosférica, enquanto *Hypsibius dujardini*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, *Macrobiotus lusitanicus*, *Paramacrobiotus areolatus* e *Tenuibiotus* sp. serão espécies mais tolerantes. De um modo geral, as espécies do género *Echiniscus* e *Astatumen trinacriae* foram também encontradas em locais com menor concentração de metais pesados, contudo, a baixa densidade em que ocorreram não permitiu classificá-las claramente como espécies sensíveis.

- As diferenças obtidas entre estações de amostragem relativamente aos parâmetros estruturais das comunidades de tardígrados foram de difícil interpretação. Na verdade, não se obteve uma correlação clara entre o grau de poluição e os parâmetros estruturais da comunidade o que sugere que outros fatores ecológicos possam ter influenciado a variação daqueles parâmetros. Mesmo assim, os resultados parecem ter sido indicativos de alguma influência da poluição. Efetivamente, nas

estações suburbanas de melhor qualidade do ar os valores de diversidade foram superiores aos obtidos em estações mais poluídas.

- A influência do tipo de substrato na distribuição dos tardígrados foi claramente visível: As comunidades presentes em líquenes caracterizaram-se pela presença e maior abundância das seguintes espécies: *Milnesium tardigradum*; *Macrobiotus hufelandi*; *Minibiotus furcatus*; *Minibiotus orthofasciatus*, *Ramazzottius oberhaeuseri*, e *Echiniscus quadrispinosus*.

Apesar da biologia e ecologia dos tardígrados ser ainda muito mal conhecida, desconhecendo-se a influência de muitos fatores responsáveis pela sua distribuição, os promissores resultados obtidos permitem ainda concluir que, no futuro próximo, com a desejável continuidade de trabalhos semelhantes a este que agora termina, a utilização das comunidades tardígrados como descritores da qualidade do ar, nomeadamente em meios urbanos, será um facto.

Referências Bibliográficas

APA (2011). *QualAr – Base de dados On-line sobre Qualidade do Ar -*
<http://qualar.apambiente.pt/>

Bertolani, R., Altiero, T. e Nelson, D.R. (2009). Tardigrada (Water Bears).
Encyclopedia of Inland Waters. 2: 443-455

Brusca, R. e Brusca G. (2003). *Invertebrates*. Sinauer Associates. Sunderland.
pp. 936

Casarett e Doull (2008). *Toxicology, the basic science of poison*. McGraw-Hill.
Kansas City. pp. 1309

Conti, M.E. e Cecchetti, G. (2001). Biological Monitoring: Lichens as
Bioindicators of Air Pollution Assessment – A Review. *Environmental Pollution*. 114:
471-492

Corder, G.W. e Foreman, D.I. (2009). *Nonparametric Statistics for Non-
Statisticians: A Step-by-Step Approach*. John Wiley & Sons. New Jersey. pp. 247

Degma, P. (2010). *Moss Dwelling Tardigrada: From Sampling to their
Identification*. EDIT (European Distributed Institute of Taxonomy) Summer School.
Madeira. pp. 35

Degma, P., Bertolani R. e Quidetti R. (2009-2014). *Actual Checklist of
Tardigrada Species*. Ver. 26. 10-07-2014.
<http://www.tardigrada.modena.unimo.it/miscellanea/Actual%20checklist%20of%20Tardigrada.pdf>

Foissner, W. (1999). Soil Protozoa as Bioindicators: Pros and Cons, Methods,
Diversity, Representative Examples. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 95-
112

Fontoura P., Pilato G., Lisi O. e Morais P. (2009). Tardigrades from Portugal:
Four New Records and Description of Two New Species. *Zootaxa*. 2030: 21-38

Gonçalves, S. (2013). *Os Tardígrados como Descritores de Impacte de Fogos Forestais: Ensaio Preliminares*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Território e Ambiente apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em Biologia

Guidetti, R. e Bertolani, R. (2005). Tardigrade Taxonomy: An Updated Checklist of the Taxa and a List of Characters for their Identification. *Zootaxa*. 845: 1-46.

Guil, N., Hortal, J., Sánchez-Moreno, S. e Machordom, A. (2009). Effects of Macro and Micro-environmental Factors on the Species Richness of Terrestrial Tardigrade Assemblages in an Iberian Mountain Environment. *Landscape Ecol.* 24: 375-390

Helliwell, D.R. (1978). Survey and Evaluation of Wildlife on Farmland in Britain: An 'Indicator Species' Approach. *Biological Conservation*. 13(1): 63-73

Hengherr, S., Worland, M.R., Reuner, A., Brümmer, F. e Schill, R.O. (2009). High-Temperature Tolerance in Anhydrobiotic Tardigrades Is Limited by Glass Transition. *Physiological and Biochemical Zoology*. 82(6): 749-755.

Hiraldo, F. e Alonso, J.C. (1985). System of Faunistic Indicators (vertebrates) Applicable to Planning and Management of the Environment in the Iberian Peninsula. *Naturalia Hispanica*. 26: 32

Hohl, A. Miller, W.R. e Nelson D.R. (2001). The Distribution of Tardigrades Upwind and Downwind of a Missouri Coal-Burning Power Plant. *Zool. Anz*. 240: 395-401

Holt, E.A. e Miller, S.W. (2010). Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge*. 3(10): 8

Johansson, C, Calloway, S., Miller, W.R. e Linder, E.T. (2011). Are Urban and Rural Tardigrade (Tardigrada) Communities Distinct and Determined by pH: A Case Study from Fresno County, California. *The Pan-Pacific Entomologist* 87(2): 86-97

Keeler, A.G. e McLemore D. (1996). The Value of Incorporating Bioindicators in Economic Approaches to Water Pollution Control. *Ecological Economics*. 19: 237-245

Kinchin, I.M. (1994). *The Biology of Tardigrades*. Portland Press. London. pp. 143

McGeoch M.A. (1998). The selection, Testing and Application of Terrestrial Insects as Bioindicators. *Biol. Rev.* 73: 181-201

Meininger, C.A. e Spatt, P.D. (1988). *Arctic and Alpine Research.* 20(1): 24-30

Meininger, C.A., Uetz, G.W. e Snider, J.A. (1985). Variation in Epiphytic Microcommunities (Tardigrade-Lichen-Bryophyte Assemblages) of the Cincinnati, Ohio Area. *Urban Ecology.* 9(1): 45-61

Meyer, H.A., Hinton, J.G. e Samletzka, C.A. (2013). Water Bears in the Anthropocene: A Comparison of Urban and Woodland Tardigrade (Phylum Tardigrada) Communities in Southwestern Louisiana, USA. *J. Limnol.* 72(1): 123-127

Naigaga, I., Kaiser, H., Muller, W.J., Ojok, L., Mbabazi, D., Magezi, G. e Muhumuza, E. (2011). Fish as Bioindicators in Aquatic Environmental Pollution Assessment: A Case Study in Lake Victoria Wetlands, Uganda. *Physics and Chemistry of the Earth.* 36: 918-928

Nelson, D.R. (2002). Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology. *Integr. Comp. Biol.* 42 (3): 652-659

Nelson D.R. e Marley N.J. (2000). The Biology and Ecology of Lotic Tardigrada. *Freshwater Biology.* 44(1): 93-108

Noss, R.F. (1990). Indicators for Monitoring Biodiversity. *Conservation Biology.* 4(4): 355-364

Peluffo, J.R., Rocha A. e Peluffo, M (2007). Species Diversity and Morphometrics of Tardigrades in a Medium-sized City in the Neotropical Region: Santa Rosa (La Pampa, Argentina). *Animal Biodiversity and Conservation.* 30(1): 43-51

Peluffo, M., Peluffo, J.R., Rocha, A.M. e Doma, I.L. (2006). Tardigrade Distribution in a Medium-Sized City of Central Argentina. *Hydrobiologia.* 558: 141-150

Ramazzotti, G. e Maucci, W. (1983.) *Il Phylum Tardigrada: III Edizione Riveduta e Aggiornata.* Memorie Dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi. 41: 1012

Shannon, C.E. e Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication.* Univ of Illinois Press. Chicago. pp.35

Sneath, P. e Sokal, R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. pp. 573

Vargha, B., Ötvös, E. e Tuba, Z. (2002). Investigations on Ecological Effects of Heavy Metal Pollution in Hungary by Moss-Dwelling Water Bears (Tardigrada), as Bioindicators. *Ann Agric Environ Med*. 9: 141-146

Anexos

Anexo 1

Caracterização dos locais de amostragem por poluente atmosférico, através da informação disponível pela APA:

O₃

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|----------|----------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Muito má | N.D | N.D | 1,61% | 6,36% | 5,31% | 0,42% | 3,95% | N.D |
| Má | N.D | N.D | 7,63% | 9,75% | 10,61% | 1,26% | 9,88% | N.D |
| Razoável | N.D | N.D | 68,27% | 69,49% | 71,02% | 72,80% | 79,84% | N.D |
| Boa | N.D | N.D | 22,49% | 14,41% | 13,06% | 25,52% | 6,32% | N.D |

Percentagem de dias durante o período estudado em que as concentrações de O₃ correspondem às respetivas classes de qualidade do ar. ND – Dados não disponíveis.

NO₂

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|----------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Muito má | 0,40% | 9,06% | 2,78% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| Má | 30,52% | 40,16% | 42,86% | 7,91% | 6,35% | 5,70% | 0,78% | 0,50% |
| Razoável | 32,93% | 44,49% | 42,86% | 43,48% | 47,22% | 31,58% | 24,90% | 25,87% |
| Boa | 36,14% | 6,30% | 11,51% | 48,62% | 46,43% | 62,72% | 74,32% | 73,63% |

Percentagem de dias durante o período estudado em que as concentrações de NO₂ correspondem às respetivas classes de qualidade do ar.

CO

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|----------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Muito má | 8,61% | 11,46% | 11,98% | 10,22% | 8,20% | 2,11% | 1,98% | 1,01% |
| Má | 22,95% | 39,53% | 59,92% | 24,89% | 16,39% | 12,66% | 7,11% | 42,71% |
| Razoável | 68,03% | 49,01% | 28,10% | 64,00% | 49,59% | 84,39% | 67,98% | 53,27% |
| Boa | 0,41% | 0,00% | 0,00% | 0,89% | 25,82% | 0,84% | 22,92% | 3,02% |

Percentagem de dias durante o período estudado em que as concentrações de CO correspondem às respetivas classes de qualidade do ar.

SO₂

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|----------|----------------------|--------|-----|--------|-----|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Muito má | 1,29% | 0,39% | N.D | 0,40% | N.D | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| Má | 22,75% | 3,91% | N.D | 11,46% | N.D | 0,43% | 0,00% | 1,99% |
| Razoável | 48,07% | 44,14% | N.D | 67,19% | N.D | 29,13% | 9,69% | 42,29% |
| Boa | 27,90% | 51,56% | N.D | 20,95% | N.D | 70,43% | 90,31% | 55,72% |

Percentagem de dias durante o período estudado em que as concentrações de SO₂ correspondem às respetivas classes de qualidade do ar. ND – Dados não disponíveis.

PM₁₀

| | Locais de amostragem | | | | | | | |
|----------|----------------------|-----|--------|--------|-----|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Muito má | 10,98% | N.D | 18,52% | 7,85% | N.D | 11,79% | 4,88% | 3,09% |
| Má | 34,96% | N.D | 32,80% | 22,31% | N.D | 28,82% | 25,20% | 22,68% |
| Razoável | 44,72% | N.D | 35,98% | 35,12% | N.D | 41,48% | 41,46% | 38,14% |
| Boa | 9,35% | N.D | 12,70% | 34,71% | N.D | 17,90% | 28,46% | 36,08% |

Percentagem de dias durante o período estudado em que as concentrações de PM₁₀ correspondem às respetivas classes de qualidade do ar. ND – Dados não disponíveis.

Anexo 2

Concentrações de metais pesados presentes por substrato e local de amostragem:

Zn

| Locais de amostragem | Substrato | Concentração $\mu\text{g/g}$ |
|----------------------|-----------|------------------------------|
| 1 | Líquen | 76,23 |
| | Musgo | 65,09 |
| 2 | Líquen | 80,80 |
| | Musgo | 194,87 |
| 3 | Líquen | 71,49 |
| | Musgo | 81,75 |
| 4 | Líquen | 176,92 |
| | Musgo | 57,47 |
| 5 | Líquen | 55,85 |
| | Musgo | 60,80 |
| 6 | Líquen | 65,09 |
| | Musgo | 52,95 |
| 7 | Líquen | 52,30 |
| | Musgo | 54,35 |
| 8 | Líquen | 49,28 |
| | Musgo | 41,56 |

Concentrações de zinco presentes nas amostras de musgos e líquenes.

Cu

| Locais de amostragem | Substrato | Concentração $\mu\text{g/g}$ |
|----------------------|-----------|------------------------------|
| 1 | Líquen | 22,40 |
| | Musgo | 22,05 |
| 2 | Líquen | 26,93 |
| | Musgo | 69,98 |
| 3 | Líquen | 19,17 |
| | Musgo | 23,78 |
| 4 | Líquen | 19,28 |
| | Musgo | 15,57 |
| 5 | Líquen | 51,76 |
| | Musgo | 17,01 |
| 6 | Líquen | 11,62 |
| | Musgo | 14,22 |
| 7 | Líquen | 11,25 |
| | Musgo | 19,62 |
| 8 | Líquen | 8,21 |
| | Musgo | 15,34 |

Concentrações de cobre presentes nas amostras de musgos e líquenes.

Pb

| Locais de amostragem | Substrato | Concentração $\mu\text{g/g}$ |
|----------------------|-----------|------------------------------|
| 1 | Líquen | 16,59 |
| | Musgo | 34,21 |
| 2 | Líquen | 19,30 |
| | Musgo | 59,26 |
| 3 | Líquen | 18,79 |
| | Musgo | 35,38 |
| 4 | Líquen | 16,37 |
| | Musgo | 13,15 |
| 5 | Líquen | 20,47 |
| | Musgo | 17,86 |
| 6 | Líquen | 20,62 |
| | Musgo | 21,54 |
| 7 | Líquen | 12,65 |
| | Musgo | 13,73 |
| 8 | Líquen | 13,98 |
| | Musgo | 18,77 |

Concentrações de chumbo presentes nas amostras de musgos e líquenes.

Anexo 3

Distribuição das espécies de tardígrados por local de amostragem:

Local 1 – Senhora da Hora

| Espécies | Densidade (ind/g) |
|--|-------------------|
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 1,19 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 35,58 |
| <i>Macrobiotus harmsworthi</i> Murray, 1907 | 0,20 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 0,13 |
| <i>Macrobiotus lusitanicus</i> Maucci & D. Pasa, 1984 | 1,19 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 2,90 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,86 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 0,92 |
| <i>Tenuibiotus sp.</i> Pilato & Lisi, 2011 | 4,02 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 1

Local 2 – Afonso Henriques

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|-----------------|
| <i>Echiniscus canadensis</i> Murray, 1910 | 0,52 |
| <i>Echiniscus mediantus</i> Marcus, 1930 | 0,26 |
| <i>Echiniscus quadrispinosus</i> (Richters, 1902) | 0,09 |
| <i>Echiniscus trisetosus</i> Cuénot, 1932 | 0,26 |
| <i>Hypsibius convergens</i> (Urbanowicz, 1925) | 0,34 |
| <i>Hypsibius dujardini</i> (Doyère, 1840) | 2,92 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 50,65 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 1,89 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 7,91 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 2,92 |
| <i>Paramacrobiotus areolatus</i> (Murray, 1907) | 5,68 |
| <i>Paramacrobiotus richtersi</i> (Murray, 1911) | 0,17 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 2

Local 3 - Francisco Sá Carneiro (Campanhã)

| Espécies | Densidade Ind/g |
|---|--------------------|
| <i>Hypsibius convergens</i> (Urbanowicz, 1925) | 0,12 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 19,54 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 17,68 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,35 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 3

Local 4 – D.Manuel II

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|--------------------|
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 0,91 |
| <i>Diphascon pingue</i> (Marcus, 1936) | 0,15 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 46,04 |
| <i>Macrobiotus echinogenitus</i> Richters, 1904 | 0,08 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 0,23 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 3,10 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,23 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 0,23 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 4

Local 5 - Pe Joaquim Neves (Baguim)

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|--------------------|
| <i>Echiniscus testudo</i> (Doyère, 1840) | 0,09 |
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 0,73 |
| <i>Hypsibius dujardini</i> (Doyère, 1840) | 0,09 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 0,37 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 2,65 |
| <i>Macrobiotus lusitanicus</i> Maucci & D. Pasa, 1984 | 1,00 |
| <i>Macrobiotus persimilis</i> Binda & Pilato, 1972 | 0,55 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 4,93 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,73 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 1,46 |
| <i>Paramacrobiotus areolatus</i> (Murray, 1907) | 1,28 |
| <i>Paramacrobiotus richtersi</i> (Murray, 1911) | 0,55 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 5

Local 6 – Meco, Perafita

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|--------------------|
| <i>Echiniscus testudo</i> (Doyère, 1840) | 0,21 |
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 1,11 |
| <i>Astatumen trinacriae</i> (Arcidiacono, 1962) | 0,14 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 0,42 |
| <i>Macrobiotus echinogenitus</i> Richters, 1904 | 0,42 |
| <i>Macrobiotus harmsworthi</i> Murray, 1907 | 0,97 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 0,76 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 24,22 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 9,97 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 0,07 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 6

Local 7 – Mindelo, Vila do Conde

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|--------------------|
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 1,50 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 0,70 |
| <i>Macrobiotus harmsworthi</i> Murray, 1907 | 1,60 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 0,10 |
| <i>Macrobiotus persimilis</i> Binda & Pilato, 1972 | 11,53 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 2,00 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 0,10 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 1,30 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 7

Local 8 – Espinho

| Espécies | Densidade Ind/g |
|--|--------------------|
| <i>Echiniscus scabrospinosus</i> Fontoura, 1982 | 0,08 |
| <i>Milnesium tardigradum</i> Doyère, 1840 | 2,92 |
| <i>Diphascon pingue</i> (Marcus, 1936) | 1,00 |
| <i>Hypsibius dujardini</i> (Doyère, 1840) | 0,50 |
| <i>Astatumen trinacriae</i> (Arcidiacono, 1962) | 0,17 |
| <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i> (Doyère, 1840) | 14,02 |
| <i>Macrobiotus harmsworthi</i> Murray, 1907 | 1,50 |
| <i>Macrobiotus hufelandi</i> C.A.S. Schultze, 1834 | 2,67 |
| <i>Minibiotus furcatus</i> (Ehrenberg, 1859) | 10,18 |
| <i>Minibiotus intermedius</i> (Plate, 1889) | 2,75 |
| <i>Minibiotus orthofasciatus</i> Fontoura, Pilato, Lisi & Morais, 2009 | 0,75 |

Espécies de tardígrados e respetivas densidades populacionais encontradas no local 8