

**Impactos ambientais em ecossistemas
lóticos do Norte de Portugal. Estudo da
bio-ecologia e fisiologia de *Anodonta
anatina* (L.) (Bivalvia, Unionidae)**

MÓNICA SOFIA REIS NOGUEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do grau de Mestre em TECNOLOGIA AMBIENTAL

**BRAGANÇA
NOVEMBRO DE 2011**

Impactos ambientais em ecossistemas lóticos do Norte de Portugal. Estudo da bio-ecologia e fisiologia de *Anodonta anatina* (L.) (Bivalvia, Unionidae)

MÓNICA SOFIA REIS NOGUEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do grau de Mestre em TECNOLOGIA AMBIENTAL

Orientador: Professor Adjunto Amílcar António Teiga Teixeira (ESA-IPB)

Co-Orientador: Professor Associado Jorge Machado (ICBAS-UP)

**BRAGANÇA
NOVEMBRO 2011**

Editado por

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA – ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA

Campos de Santa Apolónia Apartado - 1172

5301-855 BRAGANÇA

Portugal

Telefone: (+351) 273 303 200 ou (+351) 273 331 570

✉ sacd@ipb.pt ou grei@ipb.pt

🌐 <http://www.esa.ipb.pt>

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição que seja mencionado o Autor e feita referência a *Mestrado de Tecnologia Ambiental – 2010/2011, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança*.

As opiniões e informações incluídas neste documento representam unicamente o ponto de vista do respectivo Autor, não podendo o Editor aceitar qualquer responsabilidade legal ou outra em relação a erros ou omissões que possam existir.

Este documento foi produzido a partir de versão electrónica cedida pelo respectivo Autor.

Aos meus pais,
(Por Mónica Nogueira)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Professor Doutor Amílcar António Teiga Teixeira, pela sua simpatia, disponibilidade, paciência, boa disposição, apoio incondicional prestado ao longo destes dois anos e em especial pelos cinco pontos na mão esquerda que ficarão de recordação das saídas de campo.

Ao meu co-orientador, o Professor Associado Jorge Machado, por me ter aberto as portas do seu laboratório de Fisiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto com tanto carinho e disponibilidade.

À Dra. Mariana Hinzman e ao Dr. Manuel Lopes-Lima, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto pela sua simpatia, sua incondicional paciência e por terem sido tão essenciais na minha evolução.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, em especial à dona Dores pela sua amizade, ao Senhor Andrade pelos sustos pregados nos corredores, à Anabela, à Sandra e ao Sr. Rocha pela sua disponibilidade e boa disposição.

À Professora Doutora Simone Varandas da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e ao Professor Doutor Ronaldo Sousa pela colaboração no trabalho de campo e laboratorial.

À Professora Coordenadora Letícia Estevinho da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança pelo apoio prestado ao longo deste trabalho através do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Ao Mestre Daniel Saraiva, pela sua disponibilidade, simpatia e companheirismo em todas as saídas de campo.

Aos meus colegas, Telmo, Patrícia, Tiago, Maria João e Catherine pelos tempos partilhados no laboratório e nas saídas de campo.

À Micaela, pela sua amizade.

À minha Família.

Às espécies de *Anodonta anatina*, peixes e invertebrados sacrificados neste trabalho.

Índice

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO GERAL	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
Objectivos e organização do trabalho	11
BIBLIOGRAFIA	13
CAPÍTULO 2.....	15
IMPACTOS AMBIENTAIS RESULTANTES DO COLAPSO DAS ESCOMBREIRAS DAS MINAS DO PORTELO: EFEITOS DE CURTO-TERMO NAS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS (NE DE PORTUGAL)	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
2.1. INTRODUÇÃO	17
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1. Área de estudo.....	19
2.2.2. Amostragem no Campo.....	23
2.3. RESULTADOS	37
2.3.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água	37
2.3.2. Parâmetros do habitat aquático e ribeirinho	39
2.3.3. Parâmetros ecológicos baseados nas comunidades de invertebrados	39
2.3.4. Análise Multivariada	46
2.4. DISCUSSÃO	51
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 3.....	59
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO CICLO DE VIDA DO BIVALVE DE ÁGUA DOCE <i>Anodonta anatina</i> (L.). AMEAÇAS PARA AS POPULAÇÕES AUTÓCTONES DO NORDESTE DE PORTUGAL	59
RESUMO	59
ABSTRACT	60
3.1. INTRODUÇÃO	61
3.1.1. Anatomia	63
3.1.2. Ciclo de vida.....	65
3.1.3. Conservação	67

3.2. MATERIAL E MÉTODOS	69
3.2.1. Área de Estudo.....	69
3.2.2. Metodologia	70
3.3. RESULTADOS	74
3.3.1. Processo de gametogênese.....	74
3.3.2. Processo de ovogênese	75
3.3.3. Gametogênese em indivíduos hermafroditas	76
3.3.4. Variação mensal.....	77
3.3.5. Observação dos gloquídeos nas brânquias	77
3.3.6. Determinação dos peixes hospedeiros	78
3.3.7. Cultivo de juvenis de <i>Anodonta anatina</i>	81
3.3.8. Bioensaios de toxicidade com gloquídeos de <i>A. anatina</i>	84
3.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	85
3.5. BIBLIOGRAFIA.....	88
CAPÍTULO 4.....	90
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
ANEXOS (CAPÍTULO 2).....	i
ANEXO II.....	vi
ANEXO III.....	vii
ANEXOS (CAPÍTULO 3).....	ix
Anexo I.....	x
Anexo II.....	xiv

RESUMO GERAL

São vários os impactos ambientais que ameaçam os ecossistemas dulçaquícolas, sendo responsáveis pela diminuição e extinção de muitas populações, muitas delas pertencentes a bivalves de água doce. Fenómenos como a regularização de caudais, poluição, eutroficação e degradação do habitat aquático e ribeirinho são os principais factores que originam a diminuição das populações de Unionoida. Neste estudo foi seleccionada a espécie-alvo *Anodonta anatina* (L.), um bivalve que habita os sectores médio e terminal dos rios Sabor, Tua e Tâmega, no Nordeste de Portugal. Avaliaram-se diferentes aspectos relacionados com a bio-ecologia e fisiologia da espécie, especialmente associada à reprodução. Foi detectada a ocorrência simultânea de exemplares dióicos e outros hermafroditas, provavelmente como resposta adaptativa a flutuações nas condições ambientais e na dinâmica populacional. Verificou-se ainda que para *A. anatina* todas as espécies piscícolas autóctones testadas (truta, escalo, bordalo, ruivaco, boga, barbo e verdemã) e apenas uma espécie exótica (truta arco-íris) funcionaram como hospedeiros desta espécie. Este facto tem elevada relevância em termos de conservação da espécie, uma vez que a dominância de espécies piscícolas em albufeiras de barragens inviabiliza, a médio prazo, a sobrevivência das náíades. Para além do impacto da regularização foi ainda testada a influência de fenómenos associados à contaminação química. Os resultados obtidos permitiram verificar que mesmo para baixíssimas concentrações de metais pesados, como o cobre e o cobalto, o efeito é extremamente letal para estes bivalves. Foram avaliados os efeitos de curto-termo decorrentes do input de sedimentos na ribeira do Portelo, em oito locais distribuídos ao longo de 20 Km da rede hídrica. Mensuraram-se vários parâmetros físico-químicos da água e determinaram-se as respostas bióticas, nomeadamente das comunidades de macroinvertebrados e microbiológica (amostragem pontual). Os resultados mostraram: *i*) um aumento significativo da acidez da água (pH <5 na proximidade das escombreiras) e da condutividade (EC25 > 250 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); *ii*) um aumento na concentração de alguns metais pesados, nomeadamente dos elementos alumínio (Al), cobre (Cu), e cobalto (Co); *iii*) uma grande dispersão e deposição de sedimentos grosseiros e finos no leito dos cursos de água; *iv*) a perda de habitat (e.g. elevada colmatação dos interstícios do substrato por sedimentos) e a *v*) elevada mortalidade na fauna macrobentónica. Não foram registados, em termos espaço-temporais, sinais de recuperação na comunidade de macroinvertebrados, particularmente na ribeira do Portelo (aproximadamente com 3 km de extensão).

Palavras-chave: *Anodonta anatina*, reprodução, hospedeiros, impactos ambientais qualidade da água, sedimentos, macroinvertebrados

ABSTRACT

Several environmental impacts are threatening freshwater ecosystems and are responsible for the diminishing and extinction of many populations, some of them belonging to freshwater bivalves. Regulation, pollution, eutrophication, aquatic and riparian habitat degradation are the main phenomena linked to the Unionoida populations reduction in the river ecosystems. In this study it was selected a key-species, *Anodonta anatina* (L.) that can be found in the middle and lower parts of Sabor, Tua e Tâmega rivers in northeastern Portugal. Different aspects of bio-ecology and physiology of *A. anatina* were evaluated, in particular the reproduction features. It was detected a simultaneous occurrence of dioicous and hermaphrodite individuals in the same population. This occurrence is probably related with an adaptation answer to the fluctuations of environmental condition and population dynamics. It was verified that, for *A. anatina*, all native fish species tested (*Salmo trutta*, *Squalius carolitertii*, *Squalius alburnoides*, *Achondrostoma oligolepis*, *Pseudochondrostoma duriense*, *Luciobarbus bocagei* and *Cobitis paludica*) and just one exotic species (*Onchorynchus mykiss*) functioned as host species. This fact has a relevant importance for the conservation of mussel populations, since exotic fish species dominate all modified environments like reservoirs, diminishing the survival of all bivalve populations. Furthermore, it was tested other type of disturbance, like chemical contamination. The results showed that the lower concentrations of heavy metals, like copper and cobalt, can have a lethal effect on these bivalve species. The short-term effects of sediment input in the Portelo stream was analysed during 7 successive months (January to July 2010). Physicochemical water and sediment parameters were measured and biotic responses of macroinvertebrate community evaluated in eight sampling sites distributed along the 20 km of river drainage. The results showed: *i*) a significant increase in water acidity (pH <5, near the mine) and conductivity (EC25 > 250 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); *ii*) an increase in some heavy metals concentrations, namely for aluminum (Al), copper (Cu) and cobalt (Co) elements; *iii*) a large spread of coarse sediments deposited in the river bed and *iv*) habitat loss (high embebedness in the sediments) and physical (death by asphyxia) and chemical (i.e. heavy metals and lowering pH) water pollution and *v*) high mortality of macroinvertebrate fauna. No signs of macroinvertebrate community recovery were detected, in both spatial and temporal analyses, particularly in the Portelo stream (approximately 3 km long).

Key-words: *Anodonta anatina*, reproduction, host fishes, environmental impacts, water quality, sediments, macroinvertebrates

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

A distribuição de bivalves em Portugal e especificamente de mexilhões de água doce (também conhecidos por náíades), caso das espécies *Margaritifera margaritifera*, *Unio delphinus*, *Potomida littoralis* e *Anodonta anatina*, tem sido seriamente posta em causa por sucessivas alterações no seu habitat, provocadas pela exploração excessiva dos recursos naturais, responsável pela introdução contínua de poluentes no ecossistema aquático. VARANDAS *et al.* (2010) referem que as populações de náíades são muito sensíveis a modificações súbitas e bruscas do habitat, provocadas, por exemplo, pelas secas, construções de barragens, descargas contínuas de tóxicos, sobre-exploração dos recursos hídricos e introdução de espécies exóticas e invasoras que levam ao desaparecimento dos peixes hospedeiros específicos e por conseguinte à extinção destas espécies em muitos rios. O almeijão-de-rio, *Anodonta anatina* (L.), é entre os Unionoidea, uma das espécies ainda relativamente abundante no nosso país, dado possuir uma capacidade de resistência superior, quando comparada com outras náíades como por exemplo a *Margaritifera margaritifera*. No entanto, apesar de não constar no Livro Vermelho da IUCN, como a *M. margaritifera*, é, na actualidade, uma espécie fortemente ameaçada em Portugal.

LOAYZA-MUROA & ELÍAS-LETTSA (2007) salienta a importância das cabeceiras de rios, que qualifica como sendo imprescindíveis como fonte de biodiversidade e na própria preservação da qualidade do rio ao longo de todo o seu curso. O problema da constante degradação dos cursos de água e perda de biodiversidade, comum a muitos países europeus, obrigou a União Europeia a tomar posição, dando origem à Directiva Quadro da Água (DQA) (DIRECTIVA 2000/60/CE), com o intuito de aumentar, numa primeira fase, o conhecimento do estado ecológico dos cursos de água superficiais europeus e, numa segunda fase, proceder à sua monitorização e reabilitação. Para cumprir os objectivos delineados pela DQA, até ao ano de 2015, é necessário restaurar muitos cursos de água, no sentido da sua renaturalização e proceder à integração funcional dos processos de recuperação e monitorização em escalas espaciais e temporais mais vastas do que aquelas que têm sido realizadas. Por fim, é fundamental proceder a uma monitorização conveniente que avalie, para essas escalas, os resultados obtidos tendo em conta os estados de referência de cada área geográfica (CORTES s.d.).

Os macroinvertebrados têm um papel ecológico essencial em muitos sistemas para além de serem um dos grupos mais ambíguos e com maior diversidade de organismos (NICOLA 2010). PEETERS (2004) refere que a abundância da comunidade bentónica

é função das condições de habitat sendo sensíveis tanto a perturbações físicas como químicas. Por esta razão, são utilizados como bioindicadores na aplicação da DQA. A implementação desta Directiva induz a obrigatoriedade de um estudo pormenorizado dos factores que influenciam as comunidades de macroinvertebrados, nomeadamente relacionados com impactos ambientais de origem antropogénica. A distribuição e abundância das comunidades de organismos estão influenciadas pelas condições hidrológicas, composição do substrato, temperatura e química da água. É sabido que a estrutura e funcionamento dos ecossistemas dependem das respostas a múltiplos factores de stress, de origem natural e antrópica, que influenciam a fisiologia e comportamento de organismos, interacções ecológicas dentro das comunidades e os próprios processos nos ecossistemas (BREITBURG *et al.* 1998). Um dos maiores efeitos negativos decorrentes destes impactos consiste no rápido declínio da biodiversidade, à escala local, regional e mundial, como resultado das alterações nas funções dos ecossistemas, caso da produtividade primária, reciclagem e conservação do carbono e de diversos nutrientes (e.g. azoto e fósforo), decomposição, cadeias alimentares e resiliência dos ecossistemas (PERRINGS *et al.* 1995; SCHWARTZ *et al.* 2000). Existe uma panóplia de factores químicos, físicos e biológicos potencialmente stressantes, que podem actuar isolada ou de forma sinérgica e originar os impactos citados (FOLT *et al.* 1999). Estes efeitos negativos podem manifestar-se a diferentes níveis de organização, desde o sub-organismo à população e comunidade presente num dado ecossistema (Figura 1.1).

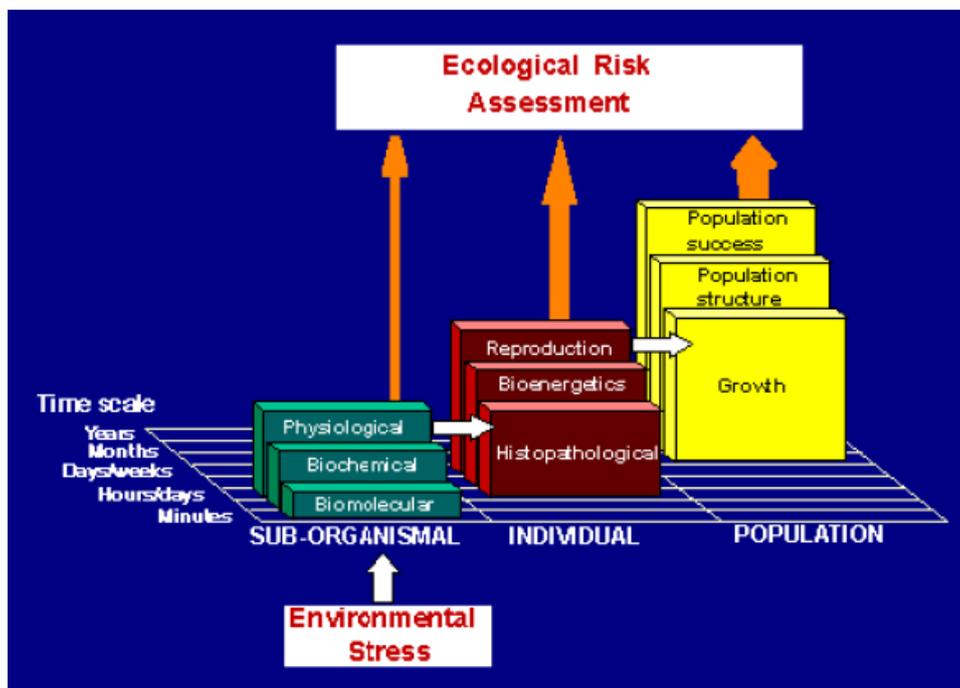


Figura 1.1- Resposta hierárquica dos organismos a factores de stress ambiental (ADAMS & GREELEY 2000)

Entre os invertebrados, os bivalves são vistos como espécies-sentinela, desempenhando um papel essencial na manutenção da integridade ecológica através da sua função filtradora, removendo dos cursos de água o fitoplâncton, as bactérias e os sólidos suspensos (VAUGHN & HAKENKAMP 2001; MCIVOR 2004). No entanto, são poucos os estudos na região transmontana envolvendo o conhecimento do ciclo de vida destas espécies, as suas exigências em termos de habitat, assim como o reconhecimento dos factores de perturbação ambiental que as afectam. A sobrevivência de *Anodonta anatina* e das demais náíades (*Margaritifera margaritifera*, *Potomida littoralis* e *Unio delphinus*) presentes no Nordeste de Portugal está seriamente ameaçada pelo Programa Nacional de Barragens com Elevado Potencial Hidroeléctrico (PNBEPH), assim como por múltiplas mini-hídricas distribuídas pelas diferentes bacias hidrográficas (e.g. Sabor, Tua e Tâmega). O Plano de Bacia Hidrográfica do rio Douro e a Lei-Quadro da Água (Lei nº58/2005 de 28 de Dezembro) estabelecem bases para a preservação e recuperação dos ecossistemas aquáticos. Assim, nesta preservação está incluída a necessidade de conservar as náíades, visto que as barragens irão modificar o seu habitat natural e, por certo, dizimar muitas populações (CORTES s.d.). A falta de interesse por parte do poder local e nacional, explica-se pelos interesses político-económicos numa região muitas das vezes ameaçada pela falta de água.

Objectivos e organização do trabalho

Fizeram parte dos objectivos mais específicos deste trabalho:

- 1) Proceder ao diagnóstico dos impactos ambientais da contaminação física e química sobre o ecossistema aquático e ribeirinho, na proximidade da mina do Portelo. Mais especificamente constituíram objecto de estudo os seguintes aspectos:
 - i. Avaliar os impactos sobre as características físico-químicas e microbiológicas da água;
 - ii. Mensurar potenciais alterações ao nível dos habitats aquáticos e ribeirinhos;
 - iii. Recorrer às comunidades de macroinvertebrados bentónicos para perceber as respostas bióticas à perturbação, tendo em conta a evolução espacial e temporal.
- 2) Proceder ao estudo do ciclo de vida da espécie *Anodonta anatina*, nomeadamente:
 - i. Perceber aspectos relacionados com a reprodução da espécie, incluindo o estudo da gametogénese;

- ii. Determinar, entre a íctiofauna dulçaquícola, quais os peixes que funcionam como hospedeiros;
- 3) Avaliar o comportamento da espécie relativamente a fenómenos de perturbação relacionados com a contaminação química;

A **dissertação está organizada em quatro capítulos**, correspondendo o primeiro, o **CAPÍTULO 1**, à presente **introdução** na qual é feita, para além da definição dos objectivos uma caracterização sucinta da espécie *Anodonta anatina* e principais ameaças destas populações. Os dois capítulos seguintes (capítulos 2 e 3) são apresentados sob a forma de artigos científicos e são os seguintes:

CAPÍTULO 2: Impactos Ambientais Resultantes do Colapso das Escombreyras das Minas do Portelo: Efeitos de Curto-Termo nas Comunidades de Macroinvertebrados Aquáticos (NE de Portugal).

CAPÍTULO 3: Contribuição para o Estudo do Ciclo de Vida do Bivalve de Água Doce *Anodonta anatina* (L.).

No **CAPÍTULO 4** são feitas as **conclusões gerais e considerações finais** do estudo, baseadas nos vários estudos parcelares realizados e apresentados separadamente nos capítulos 2 e 3.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS S.M. & GREELEY M.S. 2000. Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water Air and Soil Pollution* 123: 103-115.
- BREITBURG D.L., BAXTER J.W., HATFIELD C.A., HOWARTH R.W., JONES C.G., LOVETT G.M. & WIGAND C. 1998. Understanding effects of multiple stressors: ideas and challenges: In Pace M.L. & Groffman P.M. (eds): *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science*. Springer-Verlag, New York.
- CORTES R.M.V. s.d. Requalificação dos ecossistemas aquáticos: Único modo de caminhar para a inversão da degradação dos recursos hídricos e cumprir a Directiva Quadro da Água. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- DECRETO-LEI nº58/2005 de 29 de Dezembro. *Diário da República nº249 – I Série A*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- DIRECTIVA 2000/60/CE DO PARLAMENTO EUROPEU e do CONSELHO, 23 de Outubro de 2000.
- FOLT C.L., CHEN C.Y., MOORE M.V. & BURNAFORD J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnological Oceanography* 44: 864-877.
- LOAYZA-MUROA R. & ELÍAS-LETTSA R. 2007. Responses of the mussel *Anodontites (Unionidae)* to environmental stressors: effect of pH, temperature and metals filtration rate. *Environmental Pollution* 149: 209-215.
- MCIVOR A.L. (2004). *Freshwater Mussels as Biofilters*. Tese de Doutoramento. Universidade de Cambridge, Cambridge.
- NICOLA G., ALMODÓVAR A. & ELVIRA B. 2010. Effects of environmental factors and predation on benthic communities in headwater streams. *Aquatic Science* 72: 419-429.
- PEETERS E., GYLSTRA R. & VOS J. 2004. Benthic macroinvertebrate community structure in relation to food and environmental variables. *Hydrobiologia* 519: 103-115.
- PERRINGS C., MALER K., FOLKE C., HOLLING C.S. & JANSSON B. 1995. Biodiversity Loss. Economic and ecological issues. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

SCHWARTZ M.W., BRIGHAM C.A., HOEKSEMA J.D., LYONS K.G., MILLS M.H. & VAN MANTGEM P.J. 2000. Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia* 122: 297-305.

VARANDAS S., TEIXEIRA A., LOPES-LIMA M., SOBRAL C., COSTES R. & MACHADO J. 2010. Distribuição espacial dos bivalves de água doce nas bacias hidrográficas dos rios Tâmega, Tua e Sabor (Bacia do Rio Douro). Em: *XV Congresso da Associação Ibérica de Limnologia*. Açores 2010, Associação Ibérica de Limnologia, Ponta Delgada. 237pp

VAUGHN C.C. & HAKENKAMP C.C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, **46**, 1431 - 1446.

CAPÍTULO 2

IMPACTOS AMBIENTAIS RESULTANTES DO COLAPSO DAS ESCOMBREIRAS DAS MINAS DO PORTELO: EFEITOS DE CURTO-TERMO NAS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS (NE DE PORTUGAL)

RESUMO

Foram estudados os impactos ambientais decorrentes da entrada de uma grande quantidade de sedimentos na ribeira do Portelo, localizada no Parque Natural de Montesinho (Nordeste de Portugal), em Dezembro de 2009, depois de um período de precipitação intensa. Para avaliar os efeitos de curto-termo, realizaram-se, de Janeiro a Julho de 2010, amostragens mensais em oito locais distribuídos ao longo de 20 Km da rede hídrica. Foram mensurados vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos (amostragem pontual) da água e avaliadas as respostas bióticas, nomeadamente das comunidades de macroinvertebrados. Os resultados mostraram as seguintes condições abióticas: *i*) um aumento significativo da acidez da água (pH <5 na proximidade das escombreyras) e da condutividade (EC25 > 250 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); *ii*) um aumento na concentração de alguns metais pesados, nomeadamente dos elementos alumínio (Al), cobre (Cu) e cobalto (Co); *iii*) uma grande dispersão e deposição de sedimentos grosseiros e finos no leito dos cursos de água e *iv*) uma fracção substancial de materiais inorgânicos finos permanentemente suspensos na coluna de água. Esta mudança súbita das condições ambientais conduziu à catastrófica redução na abundância e diversidade das comunidades de invertebrados, atingindo a completa depleção na proximidade da zona de *input* dos sedimentos na ribeira, como resultado da ocorrência de efeitos sinérgicos como sejam: 1) a perda de habitat (*e.g.* elevada colmatagem dos interstícios do substrato por sedimentos) e a 2) poluição física (*e.g.* morte por asfixia) e química (*e.g.* metais pesados e diminuição do pH). Não foram registados, em termos espácio-temporais, sinais de recuperação na comunidade de macroinvertebrados, particularmente na ribeira do Portelo (aproximadamente com 3 km de extensão). Uma vez que não foram tomadas quaisquer medidas de reabilitação/recuperação e outras de protecção da entrada contínua de sedimentos na ribeira, especialmente em épocas chuvosas, serão de esperar condições inapropriadas à recolonização pelo *biota* típico da região.

Palavras-chave: *minas, habitat, qualidade da água, sedimentos, macroinvertebrados*

ABSTRACT

The environmental effects of a large amount of mining deposits collapsed and sudden incorporated into a small stream, located in the Montesinho Natural Park (northeastern Portugal), were studied monthly, from January to July 2010. Physicochemical and microbiological water parameters were measured and biotic responses of macroinvertebrate community evaluated in eight sampling sites distributed along the 20 km of river drainage, inside the protected area. The results showed the following abiotic conditions: *i*) a significant increase in water acidity (pH <5, near the mine) and conductivity (EC25 > 250 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); *ii*) an increase in some heavy metals concentrations, namely for aluminum (Al), copper (Cu) and cobalt (Co) elements; *iii*) a large spread of coarse sediments deposited in the river bed and *iv*) a substantial fraction of fine inorganic materials suspended in the water column. This sudden change of environmental conditions, lead to a catastrophic reduction in abundance and diversity of invertebrate communities, reaching the complete depletion near stream input zone, as a result of synergic events like habitat loss (high embebedness in the sediments) and physical (death by asphyxia) and chemical (i.e. heavy metals and lowering pH) water pollution. No signs of macroinvertebrate community recovery were detected, in both spatial and temporal analyses, particularly in the Portelo stream (approximately 3 km long). Furthermore, since no stream restoration or other protective measures were taken, a continuous input of water and sediments from mine runoff occurred, namely after rainy periods, contributing to maintain the harsh conditions to the biota.

Key-words: *mining, habitat, water quality, sediments, macroinvertebrates*

2.1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial é uma das principais razões para a exploração exaustiva a que, hoje em dia, estão submetidos os recursos naturais. A actividade mineira das jazidas existentes e a descoberta de novos filões implicam a destruição de muitos ecossistemas terrestres e aquáticos, alguns deles de elevado valor em termos de conservação de espécies e habitats. Os despojos das minas são responsáveis pela degradação de muitos rios em diferentes regiões do mundo. Entre os muitos impactos ambientais referenciados por diversos estudos (e.g. KELLY 1988) merecem destaque as alterações físico-químicas da água, nomeadamente relacionados com a biodisponibilidade de metais pesados. Outros efeitos adversos referem drásticas mudanças na estrutura do leito dos cursos de água como resultado da deposição de sedimentos grosseiros e especialmente de partículas de dimensão diminuta (e.g. areia e silte) que colmatam os interstícios e inviabilizam a capacidade de colonização na zona bentónica, de vital importância para o *biota*. No processo de dispersão das partículas originárias das escombrelas de minas, os metais sofrem diversas reacções de oxidação-redução ao percorrerem diferentes tipos de solo e água, podendo ficar imobilizados nos sedimentos ou estar sujeitos a fenómenos de resuspensão e/ou solubilização e perpetuar o efeito negativo no espaço e tempo (MARTÍNEZ-CONDE *et al.* 1999; MARQUÉS *et al.* 2001). Segundo KELLY (1988) os efeitos da actividade mineira nos ecossistemas aquáticos podem ser agrupados sumariamente em mudanças substanciais nas seguintes variáveis: (i) pH; (ii) concentração de iões; (iii) transparência da água e (iv) estrutura do leito dos cursos de água. Vários estudos realçam claramente os impactos negativos decorrentes da exploração de minério nos ecossistemas aquáticos, embora muitas vezes seja difícil discernir entre efeitos específicos (MARTÍNEZ-CONDE *et al.* 1999; MARQUÉS *et al.* 2001, BATTY *et al.* 2005). Paralelamente, muitas destas mudanças são muito instáveis, dada a elevada inter-relação com as condições meteorológicas que transformam estes impactos ainda mais imprevisíveis. Como refere FREEDMAN (1989), as comunidades aquáticas estão, *afortunadamente*, acostumadas a regimes hídricos variáveis, que contribuem para tolerar certas mudanças. No entanto, dependendo da intensidade e severidade do evento, estas mudanças na composição e estrutura do *biota* podem ser irreversíveis.

O uso da comunidade de macroinvertebrados bentónicos tem sido vulgarmente utilizado desde o início do século XX, no sentido de averiguar potenciais impactos em ecossistemas fluviais (KOLKWITZ & MARSSON 1908; CARPENTER 1928;

RICHARDSON 1928). A sua eficiência tem sido suficientemente demonstrada em muitos artigos de publicações científicas que são hoje clássicos (WOODIWISS 1960, 1964; CHANDLER 1970; HILSENHOFF 1977), tendo sido bastante utilizados como instrumento para a mensuração da recuperação de ecossistemas aquáticos sujeitos a diversas perturbações (HILSENHOFF 1988; PLAFKIN *et al.* 1989; CLEMENTS *et al.* 1992; RESH & JACKSON 1993; CLEMENTS 1994; KERANS & KARR 1994; KIFFNEY & CLEMENTS 1994; LENAT & BARBOUR 1994; LOEB & SPACIE 1994; WILSON 1994; FRANQUET *et al.* 1995; HANNAFORD & RESH 1995; RESH *et al.* 1995). Ainda hoje, continuam a ser muito utilizados e, inclusive, especificamente adaptados a rios da Península Ibérica (ALBA-TERCEDOR & SANCHEZ-ORTEGA 1988, ALBA-TERCEDOR 2000; OLIVEIRA & CORTES 2006; MUNNÉ & PRAT 2009; INAG 2009; VARANDAS & CORTES 2010). Parâmetros bióticos relacionados, por exemplo, com a densidade, a riqueza taxonómica e a dominância em zonas afectadas pela actividade mineira e sua comparação, mediante índices de similaridade, com locais de referência localizados na proximidade, são ferramentas privilegiadas por diversos estudos para avaliação da intensidade do impacto (PERKINS 1983). Comparativamente com outros índices, os índices de similaridade são muito sensíveis a perturbações relacionadas com metais. De forma complementar, várias espécies de invertebrados são vistas como ferramentas apropriadas para estudos de ecotoxicologia ambiental, como por exemplo na avaliação da toxicidade revelada por certos sedimentos (DUCROT *et al.* 2005).

No final do ano de 2009, após um período de precipitações intenso, ocorreu o colapso de escombrelas existentes na área mineira do Portelo, inserida no Parque Natural de Montesinho, próximo da fronteira com Espanha. Refira-se que estas minas foram desactivadas há mais de 20 anos, encontrando-se em fase de recuperação desde 6 de Março de 2007, quando foi estabelecido um protocolo entre a Câmara Municipal de Bragança e a Empresa de Desenvolvimento Mineiro S.A. Segundo o SIORMINP, Sistema de Informação de Ocorrências e Recursos Minerais Portugueses, o recurso mineral viável explorado nestas minas foi o Estanho (Sn). O volume de sedimentos que entrou na rede hídrica foi enorme, justificando o objectivo deste estudo que consistiu em avaliar alguns impactos ambientais ocorridos no sistema aquático e ribeirinho, na proximidade das minas do Portelo. Mais concretamente pretendeu-se:

- i) Avaliar os impactos sobre as características físico-químicas e microbiológicas da água decorrentes das alterações ambientais promovidas;
- ii) Mensurar potenciais alterações ao nível dos habitats aquáticos e ribeirinhos;
- iii) Recorrer às comunidades de macroinvertebrados bentónicos para perceber as respostas bióticas à perturbação e perceber a evolução espacial e temporal.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado de Janeiro a Julho de 2010, na ribeira do Portelo, afluente da ribeira da Aveleda que por sua vez desagua no rio Sabor (bacia hidrográfica do rio Douro) na proximidade do limite sul do Parque Natural de Montesinho, situado no Nordeste de Portugal (Figura 2.1).

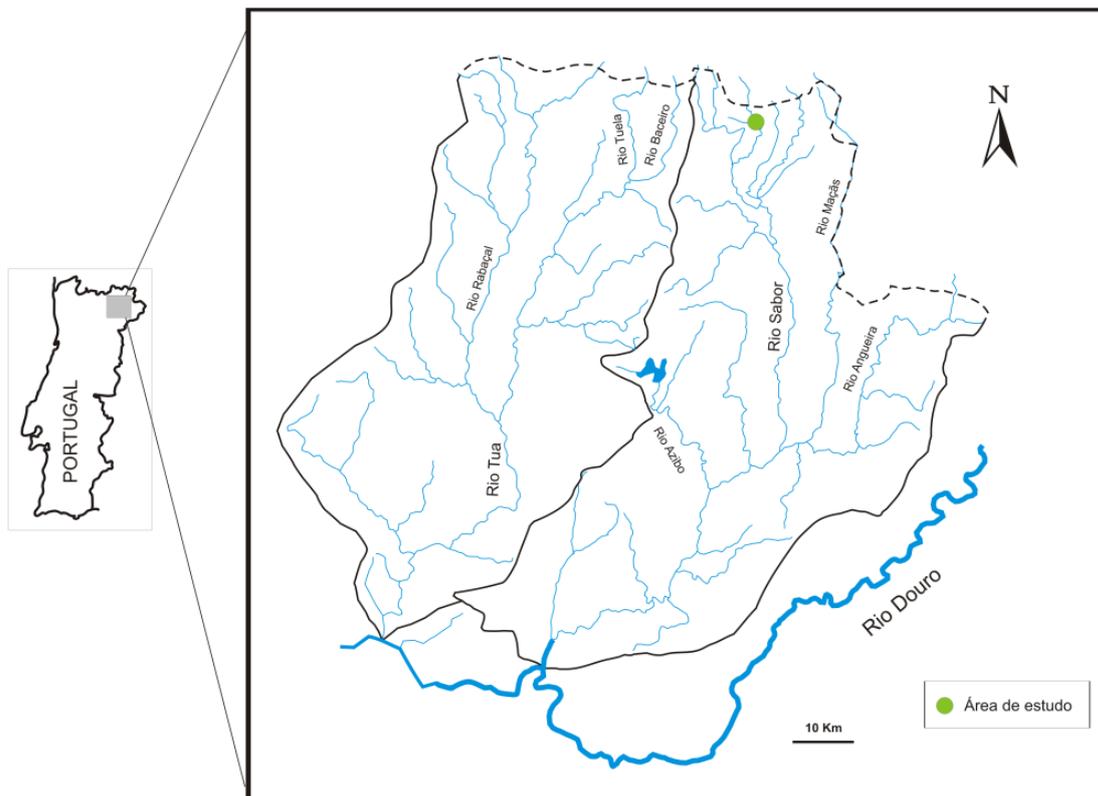


Figura 2.1. Localização das Ribeiras do Portelo e Aveleda e rio Sabor (Bacia do Douro).

A ribeira da Aveleda é um curso de água de baixa ordem (Ordem 3, segundo o critério de Strahler), com aproximadamente 20 km de extensão, sujeita a baixa pressão antropogénica. A paisagem está dominada por vegetação natural composta por quercíneas, caso do carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*) e da azinheira (*Quercus ilex*), embora se possam também encontrar outras folhosas, como o castanheiro (*Castanea sativa*), plantado para produção de fruto (soutos), e povoamentos de resinosas, nomeadamente diferentes espécies de pinheiros (*Pinus pinaster*, *P. nigra* e *P. silvestris*). Nos vales encaixados é frequente ocorrerem ainda lameiros e na proximidade de aglomerados rurais o uso do solo contempla ainda zonas de agricultura e pecuária.

Na região montanhosa da Serra de Montesinho, os cursos de água apresentam características peculiares. São comuns elevados gradientes e um regime de caudais

variável, capaz de transportar grandes quantidades de sedimentos ao longo da rede hídrica. Por tal motivo, predominam substratos grosseiros (e.g. grandes blocos, pedras) que proporcionam habitat diversificado para a fauna aquática. A litologia, composta por xistos e granitos, está na base duma baixa taxa de mineralização da água, cuja composição físico-química apresenta valores médios relativamente baixos de condutividade $EC_{25} < 50 \mu S \cdot cm^{-1}$, alcalinidade $< 30 mg HCO_3^- \cdot l^{-1}$, dureza total $< 25 mg CaCO_3 \cdot l^{-1}$, e de nutrientes, como nitratos $NO_3^- < 0,5 mg \cdot l^{-1}$ e fosfatos $PO_4^{3-} < 0,1 mg \cdot l^{-1}$. Paralelamente, a presença de galerias ripícolas, dominadas por amieiros (*Alnus glutinosa*), bem estruturadas e desenvolvidas, condiciona a produtividade primária e secundária destes sistemas lóticos, por norma altamente dependentes, sob o ponto de vista energético, do *input* de materiais alóctones (TEIXEIRA 1994 & TEIXEIRA *et al.* 2006). Ocorrem também desvios da condição natural resultantes, por exemplo, da regularização (e.g. barragem da Serra Serrada) ou da presença de escombrelas (e.g. minas do Portelo) (Figura 2.2).



Figura 2.2. Paisagem típica e alguns impactos detectados na área de estudo.

Normalmente, estes ecossistemas dulçaquícolas possuem um *status* oligotrófico, dada a baixa capacidade tamponizante e a fraca resistência a fenómenos de perturbação. Perante tais condições ambientais, predominam as comunidades de organismos

tipicamente estenobiontes. Por exemplo, ao nível da comunidade piscícola nos troços de cabeceira da região é comum encontrar-se a truta de rio (*Salmo trutta*), um salmonídeo, muitas vezes em populações exclusivas. Os requisitos ecológicos desta espécie são bastante exigentes, habitando em zonas com águas frias, bem oxigenadas e muito limpas. Para além desta espécie ocorrem, nos troços de jusante da área de estudo quatro espécies de ciprinídeos autóctones, caso do escalo-do-Norte (*Squalius carolitertii*), da boga-do-Norte (*Pseudochondostroma duriense*), do bordalo (*Squalius alburnoides*) e do barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*) (Figura 2.3).



Figura 2.3. Comunidade piscícola presente na área de estudo, composta por espécies pertencentes às famílias Salmonidae e Cyprinidae.

A integridade ecológica pode ainda ser corroborada pela ocorrência de predadores naturais como a lontra (*Lutra lutra*), cobras-d'água (*Natrix maura* e *Natrix natrix*), a garça cinzenta (*Ardea cinerea*) e o guarda-rios (*Alcedo atthis*) (Figura 2.4).

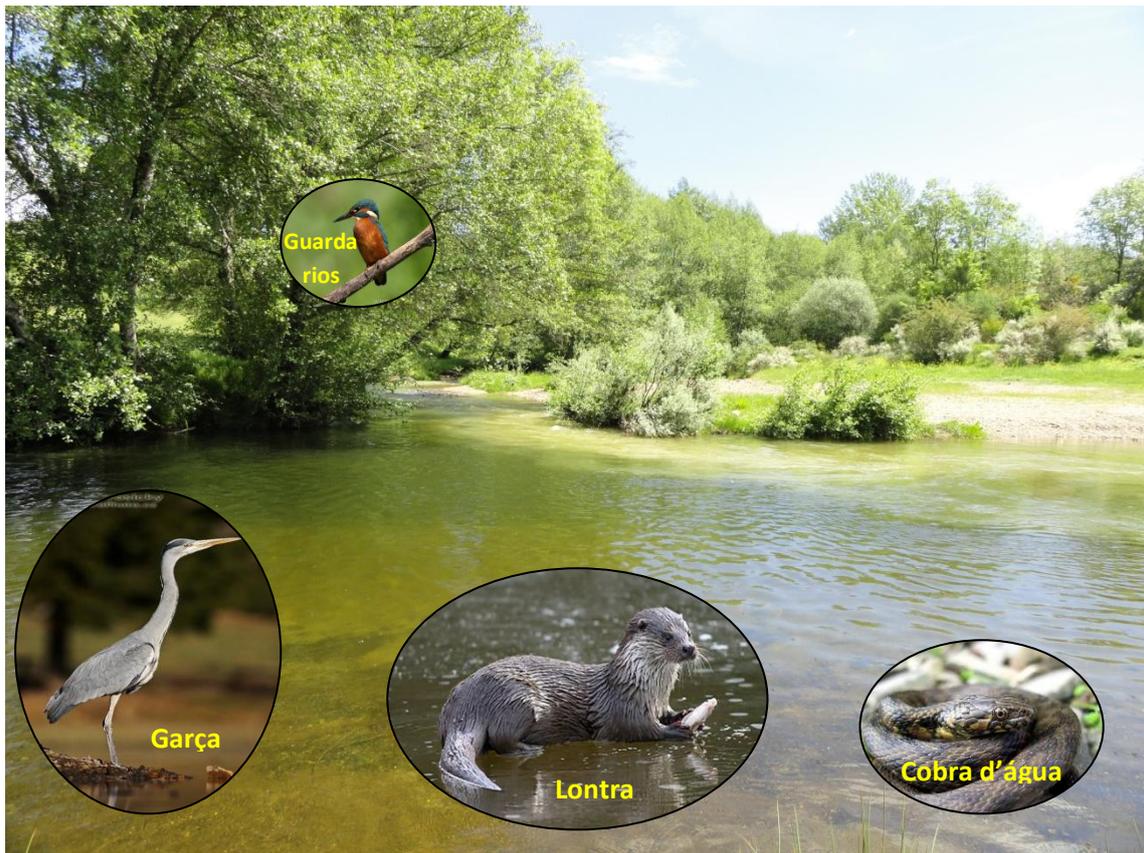


Figura 2.4. Principais predadores naturais encontrados no Alto Sabor.

A comunidade de invertebrados apresenta uma elevada diversidade de espécies, cuja variedade de modos de existência e regimes tróficos permitem explorar todos os recursos disponíveis. Contudo, para além da diversidade global, a presença de espécies muito sensíveis à perturbação, caso das ordens de insectos pertencentes aos **EPT- Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera** revela o “bom estado de saúde” da maioria dos ecossistemas de cabeceira da bacia hidrográfica do Sabor (Figura 2.5).



Figura 2.5. Famílias de macroinvertebrados (EPT) representadas no Alto Sabor.

Alterações substanciais das condições ambientais provocadas por perturbações diversas, como sejam a regularização, a poluição química e física, cortes de vegetação ribeirinha e degradação do habitat aquático (e.g. sedimentação) provocam, por norma, variações na estrutura e composição da comunidade de invertebrados com domínio de táxones euribiontes, pertencentes, por exemplo, aos grupos faunísticos dos vermes (Oligochaeta), moluscos (Gastropoda) e insectos (Diptera) (Figura 2.6).



Figura 2.6. Invertebrados presentes no Alto Sabor em condições ambientais adversas.

2.2.2. Amostragem no Campo

2.2.2.1. Localização e critérios de selecção dos troços de amostragem

Foram seleccionados 8 locais de amostragem distribuídos pela ribeira do Portelo (5), Ribeira de Calabor (1), Ribeira de Baçal (1) e no rio Sabor (1) (Figura 2.7). A escolha dos locais teve em conta uma avaliação pericial prévia, acontecida logo após a ocorrência do evento. Teve-se o cuidado de escolher dois locais de referência, situados na mesma bacia hidrográfica, com características similares ao curso de água afectado pela entrada de sedimentos, que pudessem funcionar como termo de comparação. Um deles (P2) corresponde a um afluente não perturbado que se encontra imediatamente a montante da confluência com a linha de água proveniente da zona das escombrelas das minas do Portelo. Outro (P6), pertence à ribeira de Calabor e tem uma dimensão superior, comparável à foz da Ribeira do Portelo. Por sua vez, os locais P1 (imediatamente a jusante das escombrelas), P3 (a jusante da confluência com P2), P4 (aldeia do Portelo) e P5 (próximo da foz com a ribeira de Calabor) estão distribuídos ao longo da ribeira do Portelo, enquanto P7 (Ribeira de Baçal) e P8 (após a confluência com o rio Sabor) pretendem avaliar o efeito de diluição e os impactos ao longo do sistema de drenagem, numa perspectiva não só espacial como temporal.

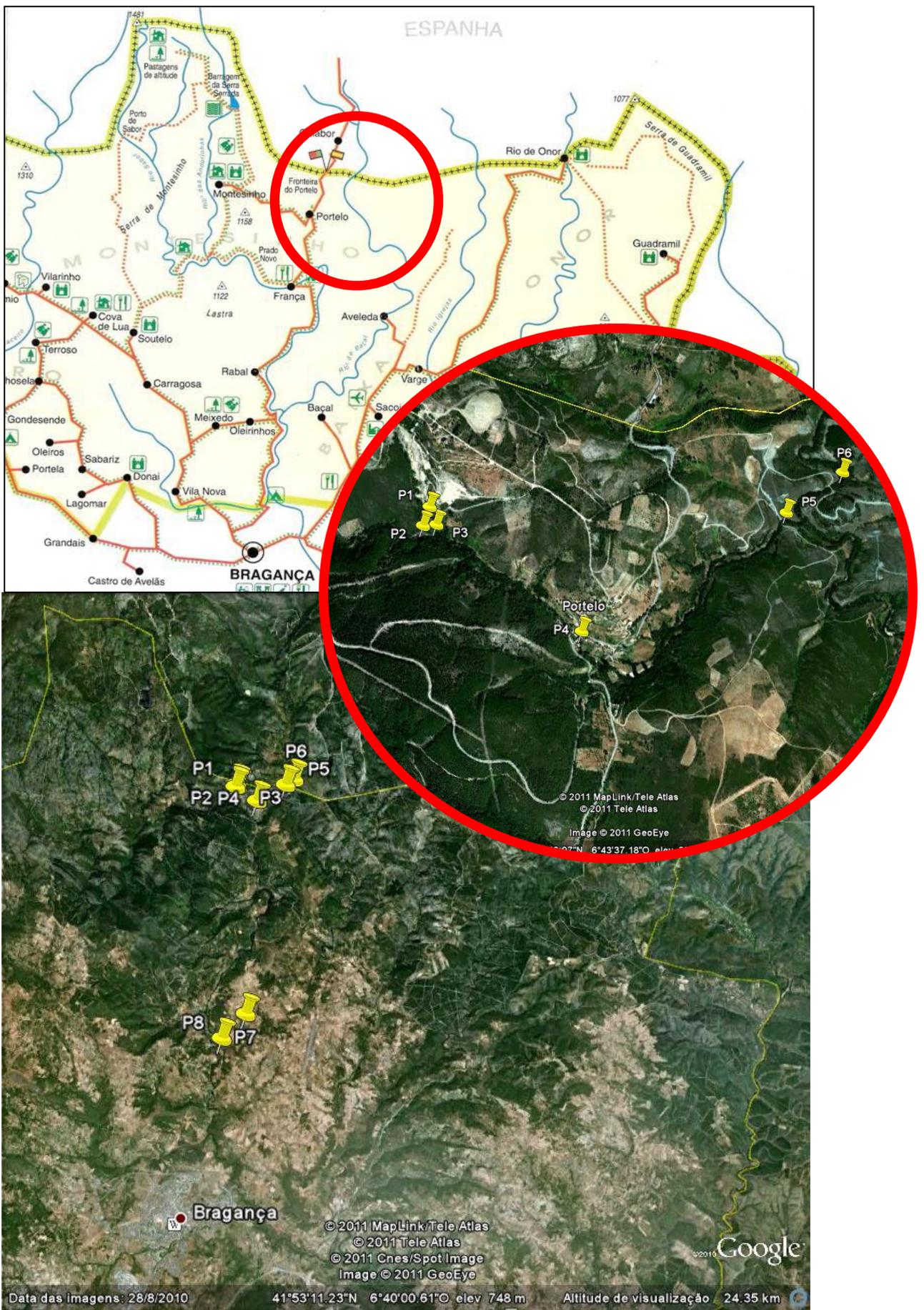


Figura 2.7. Locais de amostragem situados nas ribeiras do Portelo, Calabor, Baçal e Rio Sabor.

2.2.2.1.1. Caracterização dos locais de amostragem

Seguidamente é apresentada uma caracterização sumária dos locais de amostragem Figuras 2.8 a 2.15.

Local: P1	Coordenadas Geográficas
Estado: <i>Perturbado</i>	Latitude: 41°56'0.33"N
Sinais: forte erosão e aprofundamento do canal	Longitude: 6°44'14.93"W



Figura 2.8. Local P1, situado a jusante das escombrelas das Minas do Portelo.

Local: P2 (afluente)	Coordenadas Geográficas
Estado: <i>Não Perturbado</i>	Latitude: 41°55'57.58"N
Sinais: água limpa e habitats sem alterações	Longitude: 6°44'16.25"W



Figura 2.9. Local P2, situado num afluente a montante da confluência com a ribeira que atravessa as escombrelas das Minas do Portelo.

Local: P3

Estado: *Perturbado*

Sinais: forte colmatção do leito com sedimentos finos; margens sem erosão; galeria ripícola estável

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°55'57.74"N

Longitude: 6°44'13.73"W

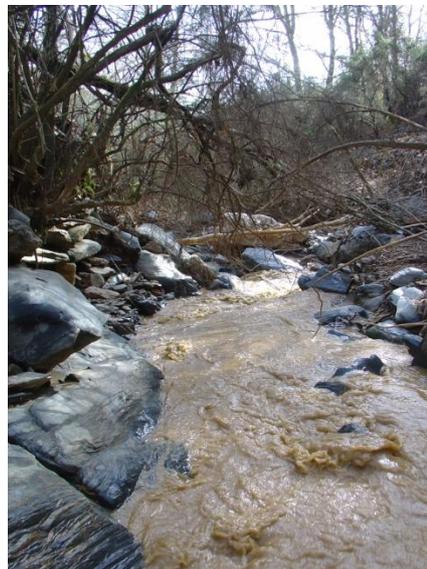


Figura 2.10. Local de amostragem P3: situado a jusante da confluência com a ribeira do local P2.

Local: P4 (aldeia do Portelo)

Estado: *Perturbado*

Sinais: aprofundamento e alargamento do canal e deposição elevada de sedimentos finos no leito de cheia; galeria ripícola instável

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°55'42.43"N

Longitude: 6°43'46.27"W



Figura 2.11. Local de amostragem P4: situado na aldeia do Portelo.

Local: P5 (Foz da Rib. do Portelo)

Estado: *Perturbado*

Sinais: substrato obliterado por sedimentos finos; menor declive fomenta a acumulação observada; galeria ripícola estável

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°55'59.29"N

Longitude: 6°43'3.34"W



Figura 2.12. Locais de amostragem P5: situados próximo da foz com a ribeira de Calabor.

Local: P6 (alfuente- Rib. Calabor)

Estado: *Não Perturbado*

Sinais: ecossistema aquático e ribeirinho em bom estado de integridade ecológica; mosaico heterogéneo de habitats

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°56'4.54"N

Longitude: 6°42'53.12"W

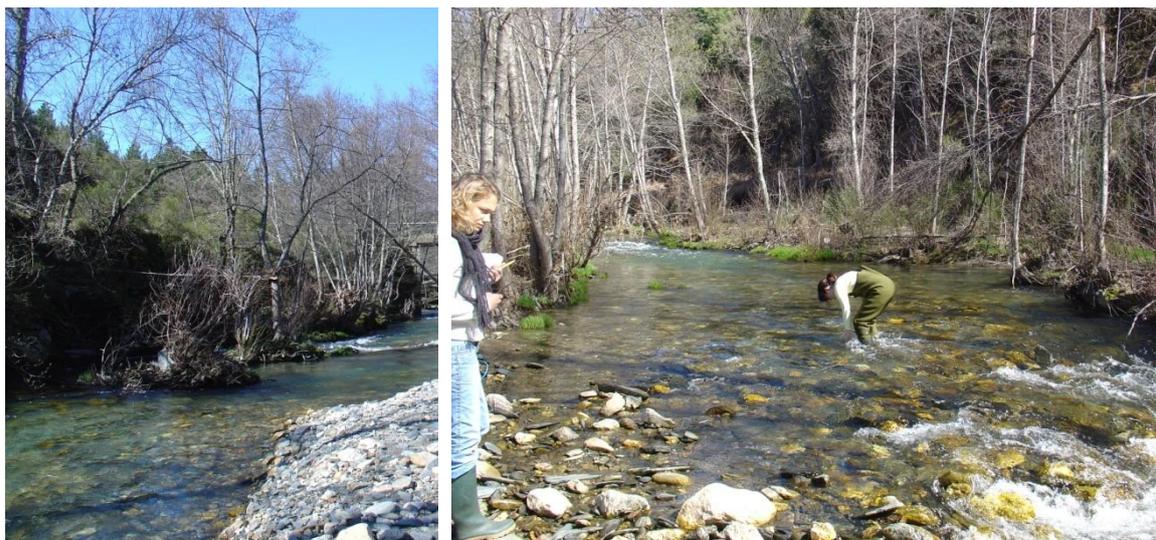


Figura 2.13. Local de amostragem P6: situado na ribeira de Calabor.

Local: P7 (Rib. de Baçal)

Estado: *Perturbado*

Sinais: maior distância (~20 km) à fonte, mas grande quantidade de sedimentos finos, depositados e circulando na coluna de água, sinais de erosão nas margens

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°51'48.47"N

Longitude: 6°44'4.80"W



Figura 2.14. Local de amostragem P7: situado na ribeira de Baçal, próximo de Rabal.

Local: P8 (Rio Sabor)

Estado: *Pouco Perturbado*

Sinais: continuação da deposição e circulação de sedimentos finos, forte diluição; sinais de erosão nas margens

Coordenadas Geográficas

Latitude: 41°51'22.17"N

Longitude: 6°44'39.96"W



Figura 2.15. Local de amostragem P8: situado a jusante da confluência da ribeira de Baçal com o Rio Sabor.

2.2.2.1.2. Análises físico-químicas e microbiológicas da água

Nas análises físico-químicas da água foram medidos diversos parâmetros no campo, por estimativa visual (escala qualitativa), como por exemplo a transparência/turvação e outros baseados em equipamentos potenciométricos portáteis, nomeadamente: 1) oxigénio dissolvido ($\text{mg O}_2/\text{L}$ e % saturação); 2) temperatura ($^{\circ}\text{C}$); 3) sólidos dissolvidos totais (TDS, mg/L) e 4) condutividade eléctrica ($\mu\text{S/cm}$) (Figura 2.16), e avaliados de acordo com o Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto. Foram ainda recolhidas amostras de água (1,5 L), em cada local, tendo sido devidamente refrigeradas (arcas térmicas com temperatura de 4°C) e transportadas para o laboratório para determinação dos metais pesados (análises realizadas pelo Laboratório *Actlabs, Activation Laboratories Ltd.*, Canadá), tendo sido avaliados através do D.L. 236/98 e INAG 2009. Foram ainda realizadas análises microbiológicas da água, nomeadamente dos parâmetros coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais, de acordo com as metodologias analíticas definidas em APHA (1989).



Figura 2.16. Mensuração, *in situ*, de parâmetros físico-químicos da água e recolha de água para análises laboratoriais.

2.2.2.1.3. Avaliação de habitats aquáticos e ribeirinhos

Na avaliação dos habitats aquáticos e ribeirinhos foram mensuradas diferentes variáveis relacionadas com o substrato orgânico e inorgânico e com a cobertura de plantas aquáticas e ribeirinhas, de acordo com a classificação apresentada no Quadro 2.1.

Quadro 2.1. Parâmetros do habitat avaliados em cada local de amostragem, de Janeiro a Julho de 2010.

Parâmetro	Classes consideradas
Morfologia	<ul style="list-style-type: none">• Largura média da área molhada (m)• Largura média do leito de cheia (m)• Profundidade média (m)• Profundidade máxima (m)• Velocidade da corrente (m/s)
Substrato inorgânico (%)	<ul style="list-style-type: none">• Rocha dura• Blocos: > 256 mm (> folha A4)• Pedras: 64-256 mm (ovo < pedras <A4)• Cascalho: 20-64 mm (< ovo)• Gravelha: 2-20 mm• Areia: 0,2-2 mm• Finos: < 0,2 mm
Substrato Orgânico (escala 1 a 5)	<ul style="list-style-type: none">• Macrófitos• Algas filamentosas e do perifiton• LWD: detritos lenhosos (ramos, troncos)• CPOM: matéria orgânica particulada grosseira (folhas)• FPOM: matéria orgânica particulada fina
Cobertura área molhada (escala 1 a 5)	<ul style="list-style-type: none">• Helófitos• Hidrófitos• Tipo de hidrófitos (algas, fanerogâmicas, musgos)• Ensombramento;• Pequenos detritos lenhosos• Grandes detritos lenhosos• Raízes e ramos submersos

Finalmente recorreu-se a dois índices, especificamente adaptados a rios da Península Ibérica (Anexo I), que permitem fazer a classificação da qualidade ao nível da hidromorfologia fluvial e da zona ripária envolvente. Foram utilizados os índices:

- 1) **Índice de Qualidade do Bosque Ribeirinho- QBR** (MUNNÉ *et al.* 1998); e
- 2) **Índice de Qualidade do Canal- GQC** (CORTES *et al.* 1999)

Nos Quadros 2.2 e 2.3 estão discriminadas as amplitudes de variação consideradas para cada índice e o seu significado ecológico.

Quadro 2.2. Amplitudes do índice QBR e significado (adaptado de MUNNÉ *et al.* 1998).

Amplitude	Classe	Significado em termos de qualidade
≥ 95	I	Cortina ripária sem alterações, estado natural
75 – 90	II	Cortina ripária ligeiramente perturbada, boa qualidade
55 – 70	III	Início de uma importante alteração, qualidade aceitável
30 – 50	IV	Forte alteração, má qualidade
0 – 25	V	Degradação extrema, péssima qualidade

O uso generalizado destes índices permite comparar diferentes ecossistemas aquáticos e permitir, por parte dos gestores, o estabelecimento de estratégias prioritárias que visem a mitigação e/ou a reabilitação de habitats degradados, maioritariamente perturbados pela acção do homem. Entre eles, são vulgares os cortes excessivos da vegetação ripária, a construção de açudes/represas, a extracção de areias, as captações de água para irrigação e os fenómenos de eutroficação e poluição localizada e difusa que afectam toda a bacia hidrográfica do rio Sabor.

Quadro 2.3. Amplitudes do índice GCQ e significado (adaptado de CORTES *et al.* 1999).

Amplitude	Classe	Significado em termos de qualidade
≥ 31	I	Canal sem alterações, estado natural
26 – 30	II	Canal ligeiramente perturbado
20 – 25	III	Início de uma importante alteração do canal
14 – 19	IV	Grande alteração do canal
8 – 13	V	Canal completamente alterado (canalizado, regularizado)

Foram ainda consideradas variáveis FAME (Quadro 2.4), avaliadas de acordo como o Anexo II, de modo a contribuir para aferir melhor todos os impactos humanos no ecossistema.

Quadro 2.4. Parâmetros usados para avaliação complementar dos impactos humanos.

Parâmetro	Classes consideradas
Impactos Humanos (escala 1 a 5)	<ul style="list-style-type: none"> • Uso do Solo • Urbanização • Zona Ripária • Carga de Sedimento • Outros impactos

2.2.2.1.4. Amostragem das comunidades de macroinvertebrados bentónicos

A **caracterização do biota** baseou-se na amostragem das comunidades de invertebrados com base nos protocolos estabelecidos em Portugal pelo Instituto da Água no âmbito da implementação da Directiva Quadro da Água (DQA) (INAG 2008).



Figura 2.17. Comunidade de macroinvertebrados bentónicos e método de amostragem usado (rede de mão) na sua captura. Verão 2010.

Os macroinvertebrados foram amostrados mensalmente, de Janeiro a Julho de 2010, nos 8 locais definidos. Seleccionaram-se troços de 50 m, que abrangessem todos os habitats presentes, escolhendo para centro uma unidade de erosão (fluxo turbulento) a partir da qual se amostraram as unidades de sedimentação adjacentes (fluxo laminar). Em cada local foi obtida uma amostra composta resultante da amostragem cumulativa de seis microhabitats (arrastos de 1 metro), seleccionados proporcionalmente à sua representatividade (e.g. desde materiais orgânicos e inorgânicos, finos e grosseiros presentes nas zonas de *riffle* e *pool* na área amostrada). Foi utilizada com uma rede de mão (500 μm de malha) (Figura 2.17). Teve-se em atenção a recolha de alguns invertebrados com grande capacidade de fixação ao substrato, mediante o uso de pinças e escovas apropriadas. Os invertebrados foram capturados e conservados vivos (em frascos de polietileno com água do rio, transportados em caixas térmicas a temperatura baixa), de modo a facilitar o processamento das amostras obtidas. Em laboratório, procedeu-se à triagem dos invertebrados e subsequente preservação em álcool a 70%. Posteriormente foram contados e identificados mediante o uso de uma lupa estereoscópica SMZ10 com *zoom* de ampliação de 10-132x. A identificação foi feita com base em chaves dicotómicas apropriadas (e.g. TACHET *et al.* 1981, 2010)

até ao nível taxonómico referenciado no Quadro 2.5, embora em casos particulares se tenham identificado alguns *taxa* até à espécie.

Quadro 2.5. Nível taxonómico de identificação seguido para cada grupo faunístico.

Grupo Faunístico	Nível Taxonómico	Grupo Faunístico	Nível Taxonómico
Diptera	Família	Mollusca	Género
Plecoptera	Género	Nematoda	Super-família
Trichoptera	Género	Isopoda	Género
Heteroptera	Género	Oligochaeta	Família
Odonata	Género	Hirudinea	Género
Ephemeroptera	Género	Tricladida	Género
Megaloptera	Género	Collembola	Família
Coleoptera	Género	Hydracarina	Ordem

2.2.2.1.5. Métricas seleccionadas para avaliação da qualidade ambiental

A resposta biótica baseada nas comunidades de macroinvertebrados foi avaliada considerando um conjunto de variáveis uni e multimétricas:

- 1) número de indivíduos (N);**
- 2) número de *taxa* (S);**
- 3) diversidade (e.g. índice H' de Shannon-Wiener);**
- 4) equitabilidade (e.g. índice J' de Pielou);**
- 5) abundância relativa de Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (% EPT) vs. % Diptera e Oligochaeta;**
- 6) Grupos funcionais, baseada em informação obtida em MERRITT & CUMMINS (1978, 1996) e OLIVEIRA (2006);**

Foram considerados cinco grupos funcionais, abaixo definidos, classificados de acordo com as adaptações alimentares dos macroinvertebrados bentónicos e das categorias de recursos nutricionais disponíveis (Quadro 2.6).

Quadro 2.6. Grupos funcionais relativos à comunidade de macroinvertebrados.

Grupo Funcional	Modo de alimentação preferencial
Detritívoros	alimentam-se de CPOM (matéria orgânica particulada grosseira), previamente condicionada por microorganismos (fungos hifomicetas e bactérias). Da sua actividade resulta FPOM devido à actividade trituradora do alimento e à própria produção de fezes;
Colectores filtradores	alimentam-se de matéria orgânica particulada fina (FPOM), embora estejam adaptados a capturá-la circulando suspensa na coluna de água.
Colectores de depósito	alimentam-se de FPOM, depositado no leito, resultante da actividade dos detritívoros e do mecanismo da abrasão física determinada pelos caudais verificados no sistema aquático;
Fitófagos ou raspadores	alimentam-se de matéria verde, especialmente de algas de <i>periphyton</i> e estão dependentes da produção autóctone do ecossistema.
Predadores e Parasitas	são macroinvertebrados que se alimentam de presas vivas ou então são seus parasitas, alimentando-se de fluidos ou tecidos vivos.

7) Modos de existência

Os macroinvertebrados aquáticos podem ainda ser analisados pelo seu modo de existência ou hábito de vida, considerando 8 categorias (Quadro 2.7). A classificação foi feita com base em MERRITT & CUMMINS (1978, 1996) e OLIVEIRA (2006);

Quadro 2.7. Modos de existência relativos à comunidade de macroinvertebrados.

Tipo	Modo vida preferencial
Patinadores (skaters)	“patinam” à superfície onde se alimentam
Planctónicos (planktonic)	habitam na zona limnética de águas paradas.
Mergulhadores (divers)	possuem mecanismos de natação que lhes permitem mergulhar para obter alimento ou refúgio.
Nadadores (swimmers)	efectuam certos movimentos natatórios
Coladores (clingers)	têm adaptações comportamentais e morfológicas que lhes permite colarem-se aos substratos grosseiros
Estendedores (sprawlers)	habitam entre folhas flutuantes e sedimentos finos
Trepadores (climbers)	possuem adaptações para se deslocarem verticalmente em hidrófitos vasculares, fragmentos orgânicos e vegetação ribeirinha
Mineiros (burrowers)	habitam zonas de sedimentos finos de rios e lagos

8) Índice biótico IBMWP (ALBA-TERCEDOR 2000)

O índice IBMWP consiste num método rápido e simples que permite avaliar a qualidade biológica de sistemas dulçaquícolas, dado necessitar apenas da identificação dos organismos até ao nível taxonómico de família. A cada família é atribuída uma pontuação, que varia entre 10 e 1, segundo um gradiente de menor a maior tolerância à poluição. Depois de efectuar o somatório das pontuações das famílias presentes em cada amostra, pode-se classificar a qualidade da água com base em 5 classes definidas (Anexo III).

9) Índice Português de Invertebrados do Norte- IPT_N (INAG 2009).

O índice multimétrico IPT_N, recentemente desenvolvido e aplicado de acordo com a Directiva-Quadro da Água, integra diferentes métricas, abaixo definidas, como o nº de taxa, EPT, equitabilidade de Pielou J' (*Evenness*), índice de diversidade de Shannon-Weaner H', IASPT e Sel. ETD que aparecem combinadas na seguinte fórmula:

$$\text{IPT}_N = \text{N}^\circ \text{ taxa} * 0,25 + \text{EPT} * 0,15 + \text{Evenness} * 0,1 + (\text{IASPT} - 2) * 0,3 + \text{Log} (\text{Sel. ETD} + 1) * 0,2$$

sendo:

- **EPT:** Nº de famílias pertencentes aos Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera;
- **Evenness:** Designado por índice de Pielou ou Equitabilidade, é calculado como:

$$E = H' / \text{Ln } S \quad \text{em que:}$$

H' - diversidade de Shannon-Wiener

S - número de taxa presentes

Ln - logaritmo natural ou neperiano

O índice Shannon-Wiener calcula-se pela expressão

$$H' = - \sum p_i \text{Ln } p_i \quad \text{em que:}$$

$$p_i = n_i / N$$

n_i- nº de indivíduos de cada taxa *i*

N- nº total de indivíduos presentes na amostra

- **IASPT**: ASPT Ibérico, que corresponde ao IBMWP (ALBA-TERCEDOR 2000) dividido pelo número de famílias presentes.
- **Log (Sel. ETD+1)** - Log10 de (1 + soma das abundâncias de indivíduos pertencentes às famílias Heptageniidae, Ephemeridae, Brachycentridae, Goeridae, Odontoceridae, Limnephilidae, Polycentropodidae, Athericidae, Dixidae, Dolichopodidae, Empididae, Stratiomyidae);

Registe-se que o valor de $IPtI_N$ depende do somatório das métricas ponderadas. No cálculo deste índice são efectuados dois passos de normalização, para ser expresso em termos de **Rácios de Qualidade Ecológica (RQE)**. As normalizações são determinadas através do quociente entre o valor observado e o valor de referência de cada tipo de rio (mediana dos locais de referência). No Anexo III, são apresentados os valores de referência para as diferentes tipologias de rios de Portugal Continental e os valores das fronteiras entre as classes de qualidade em RQE (INAG 2009).

2.2.2.1.6. Tratamento estatístico dos dados

A avaliação das diferenças entre os grupos de locais considerados, *i.e.* 1) Referência (P2 e P6), 2) Pouco perturbados (P7 e P8) e 3) Muito perturbados (P1, P3, P4 e P5), para os parâmetros físico-químicas e métricas usadas, foi feita através de testes de KRUSKAL-WALLIS (H) e de MANN-WHITNEY (U), uma vez que os dados não se ajustavam a uma distribuição normal (foi realizado o teste de BARTLET). Estas análises, assim como os gráficos BOX-WHISKERS foram realizadas com o *package* STATISTICA 7.0 (STATSOFT 2004).

Foi aplicada uma técnica de análise multivariada aos dados obtidos, nomeadamente a análise não-métrica multidimensional (NMDS), que consiste num método de ordenação baseado em *ranks* estabelecidos a partir da matriz de similaridades de BRAY-CURTIS e que foi aplicada à matriz de dados das abundâncias de macroinvertebrados. Para avaliar a ligação estabelecida entre as variáveis ambientais e a comunidade de macroinvertebrados foi feita uma análise de redundância baseada em distâncias (dbRDA). A dbRDA permite testar a significância dos termos através duma análise comparativa de duas matrizes de dados de natureza distinta, envolvendo as matrizes de dados ecológicos e ambientais (LEGENDRE & ANDERSON 1999). Realizou-se ainda uma análise multivariada de similaridades mediante a aplicação de um teste não-paramétrico (*one-way ANOSIM test*) à matriz de similaridade de BRAY-CURTIS para avaliar as diferenças significativas entre os locais de amostragem. Estas análises foram efectuadas com o *package* PRIMER 6 & PERMANOVA+β17 (CLARKE & GORLEY 2006). Os dados foram transformados [$\log(x+1)$] e as variáveis ambientais estandardizadas.

2.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos permitiram fazer uma análise das características físico-químicas e microbiológicas da água, assim como avaliar os impactos nos habitats aquáticos e ribeirinhos e nas comunidades de macroinvertebrados.

2.3.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água

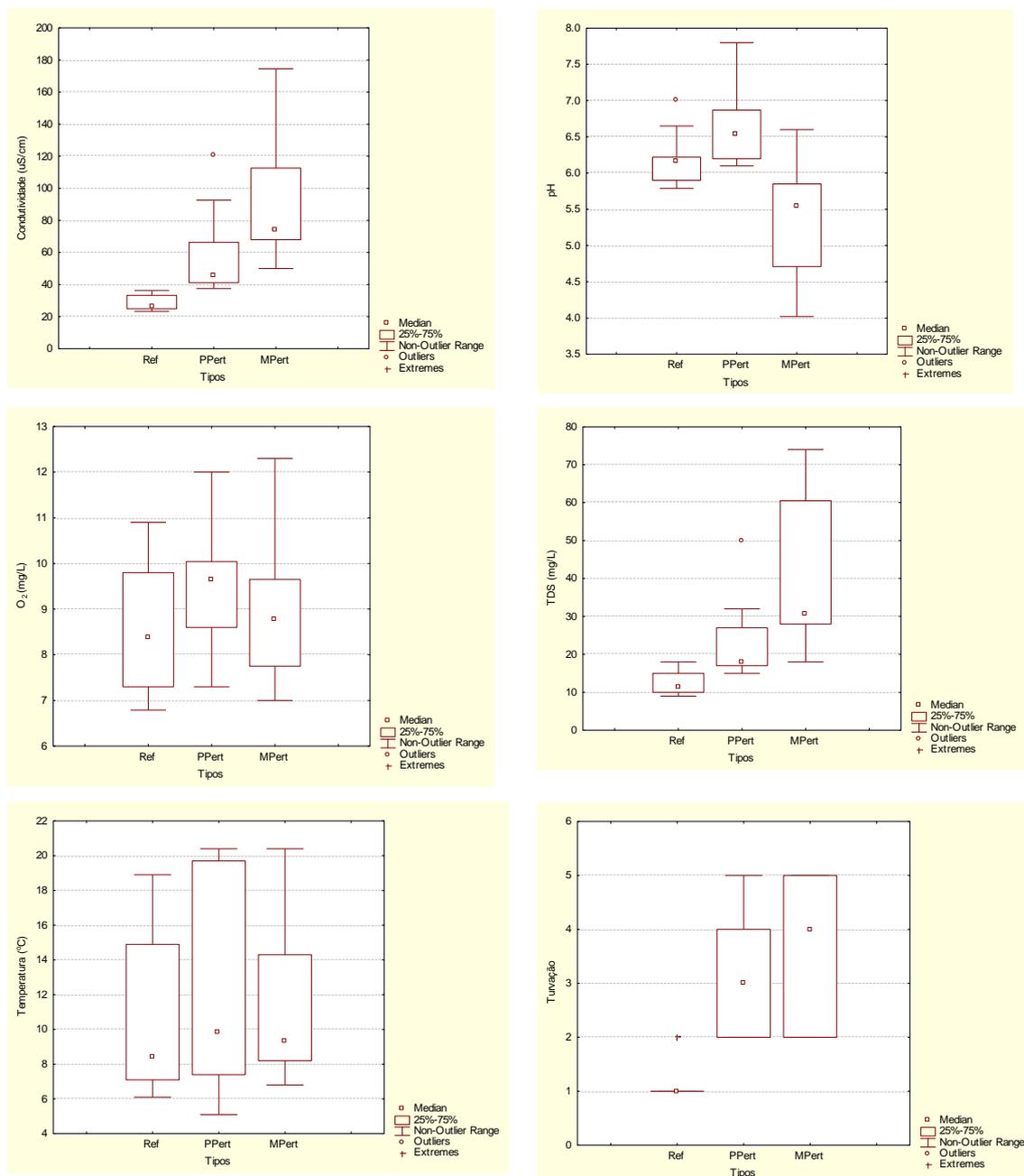


Figura 2.18. Dispersão dos parâmetros físico-químicos dos locais amostrados, agrupados de acordo com o grau de perturbação: Ref- Locais de referência P2 e P6; PPert- locais Pouco Perturbados P7 e P8; e MPert- locais muito perturbados P1, P3, P4 e P5. Parâmetros obtidos com periodicidade mensal de Janeiro a Julho de 2010.

A análise dos parâmetros físico-químicos da água determinados afastam-se do intervalo estipulado entre os Valores Máximos Recomendáveis e Admissíveis (VMR-VMA) definidos pela legislação (D.L. 236/98), nomeadamente para:

- 1) pH- as amostras dos locais perturbados sofreram um decréscimo assinalável, como no Local P1, que atingiu valores mínimos de 4,0;
- 2) condutividade EC25- cursos de água de cabeceira possuem normalmente valores muito baixos EC25 < 30 µS/cm (e.g. P2) tendo sido detectados valores sempre superiores a EC25 > 140 µS/cm (e.g. P1, P3, P4, P5);
- 3) Sólidos Dissolvidos Totais (TDS)- detecção de valores muito superiores, observável pela simples comparação dos valores obtidos para P1 (25 mg/L ± 2 SD) vs. P2 (9 mg/L ± 2 SD), como resultado da incorporação de sedimentos e da contínua diluição e arrastamento de partículas no período *post-evento* catastrófico (e.g. colapso das escombreyras);
- 4) Turvação- manutenção durante o período de estudo de uma clara turvação, mais acentuada em P1, P3, P4 e P5, da água apesar da diluição proveniente dos inputs dos afluentes e da existência de períodos prolongados sem precipitação, especialmente nos meses de Junho e Julho;

Os gráficos de dispersão (Figura 2.18), construídos com base nos agrupamentos dos locais de amostragens nas 3 classes definidas na metodologia (*i.e.* Ref- referência; PPert- pouco perturbado; MPert- muito perturbado), apresentaram para a maioria das variáveis um bom poder discriminante. De facto, foram detectadas diferenças altamente significativas ($P < 0,001$; Teste H de Kruskal-Wallis), especialmente entre os grupos de Referência vs. Muito perturbados, considerando as variáveis físico-químicas da condutividade, pH, TDS e turvação.

Das análises realizadas aos metais pesados (Anexo IV) realçam-se as concentrações elevadas registadas na ribeira do Portelo (P1, P4 e P5), nomeadamente de Alumínio (1490 µg/L), Cobalto (190 µg/L) e Cobre (> 200 µg/L) (Quadro 2.8).

Quadro 2.8: Concentração de metais pesados detectados (Janeiro 2010)

Elemento	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Al
Unidades	µg/L							
Limites de detecção	0.1	10	0.005	0.3	0.2	0.5	0.03	2
Método analítico	ICP - MS							
P1	905	<10	190	127	>200	246	2,35	1490
P2	3,7	<10	1,1	2,5	2,2	9	0,71	28
P4	341	<10	56,5	40,7	155	100	1,58	319
P5	35,7	<10	3,21	3,8	1,5	6,9	1,78	16
Branco do Método	0,4	<10	0,108	0,6	2,1	27	<0,03	8

Parâmetros avaliados: Au, Ag, Cu, Cd, Mo, Pb, Ni, Zn, S, Al, As, Ba, Be, Bi, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, Hg, Ir, K, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Ru, Pd, Sc, Ti, In, Sn, Sb, Te, I, La, Ce, Pr, Sm, Tb, Yb, Lu, Li, Mg, Si, Re, Os, V, Mn, Ga, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Ta, W, Pt, Tl, Th, U.

Relativamente à caracterização microbiológica da água não foi detectada qualquer tipo de contaminação microbiana, nomeadamente de origem antrópica. Provavelmente a acidificação do meio aquático e a toxicidade mineral podem estar na base da redução destes (Quadro 2.9) e doutros microorganismos presentes no ecossistema aquático.

Quadro 2.9: Avaliação microbiológica da qualidade da água

Parâmetro	Ref	PPert	MPert
Estreptococos fecais	n.d.	n.d.	n.d.
Coliformes totais	n.d.	n.d.	n.d.
Coliformes fecais	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.- nada determinado

2.3.2. Parâmetros do habitat aquático e ribeirinho

A análise feita para a avaliação da qualidade dos habitats ribeirinhos e aquáticos, baseada respectivamente nos índices QBR e GQC, foi sensível aos impactos sofridos pelos ecossistemas (Quadro 2.10). Efectivamente a maior perturbação corresponde à ribeira do Portelo, mais propriamente aos locais P1, P3, P4 e P5 que receberam o maior volume de sedimentos responsáveis pela alteração da morfologia do canal e pelas modificações no espaço envolvente, nomeadamente na galeria ripícola. Nos locais P7 e P8, outros impactos, como a agricultura desenvolvida nas margens estão cumulativamente na base da menor qualidade registada (Classe III).

Quadro 2.10. Avaliação dos habitats ribeirinhos (QBR) e aquáticos (GQC).

Local	QBR Pontuação	QBR Classe	GQC Pontuação	GQC Classe
P1 (MPert)	60	III	15	IV
P2 (Ref)	100	I	36	I
P3 (MPert)	60	III	22	III
P4 (MPert)	10	V	23	III
P5 (MPert)	70	III	22	III
P6 (Ref)	100	I	35	I
P7 (PPert)	65	III	25	III
P8 (PPert)	60	III	28	II

2.3.3. Parâmetros ecológicos baseados nas comunidades de invertebrados

Foram identificados 6 320 indivíduos distribuídos por 70 géneros e 17 famílias, considerando que nas ordens Diptera e Oligochaeta, o nível taxonómico de identificação não ultrapassou a família, tendo em conta a globalidade das comunidades de macroinvertebrados de 7 locais (P2 a P8) e dos 7 períodos de amostragem (Janeiro a Julho de 2010). Refira-se que em P1, local situado imediatamente a jusante do colapso das escombreyras das Minas do Portelo, não foi

capturado qualquer exemplar de invertebrado durante o período de estudo. Com efeito, é facilmente visível (Figura 2.19) que a perturbação ocorrida provocou uma diminuição drástica no número total de organismos (N) e de género/famílias (S) capturados nos locais de amostragem classificados de muito perturbados, nomeadamente aqueles situados ao longo de toda a ribeira do Portelo (P1 a P5), com extensão de 4 km. A análise comparativa com os locais de referência (P2 e P6) e mesmo com os locais classificados de menos perturbados (P7 e P8), situados a mais de 20 km da fonte de perturbação, revelou **apenas** diferenças altamente significativas (Teste U de Mann-Whitney; $P < 0,001$) entre o Grupo MPert- Muito Perturbado ($N=8,3 \pm 2,8$ SE; $S=4,4 \pm 1,2$ SE) e os restantes grupos considerados, Ref- Referência ($N=250,4 \pm 40,6$ SE; $S=20,4 \pm 1,6$ SE) e PPert- Pouco Perturbado ($N=192,7 \pm 44,4$ SE; $S=19,0 \pm 2,0$ SE).

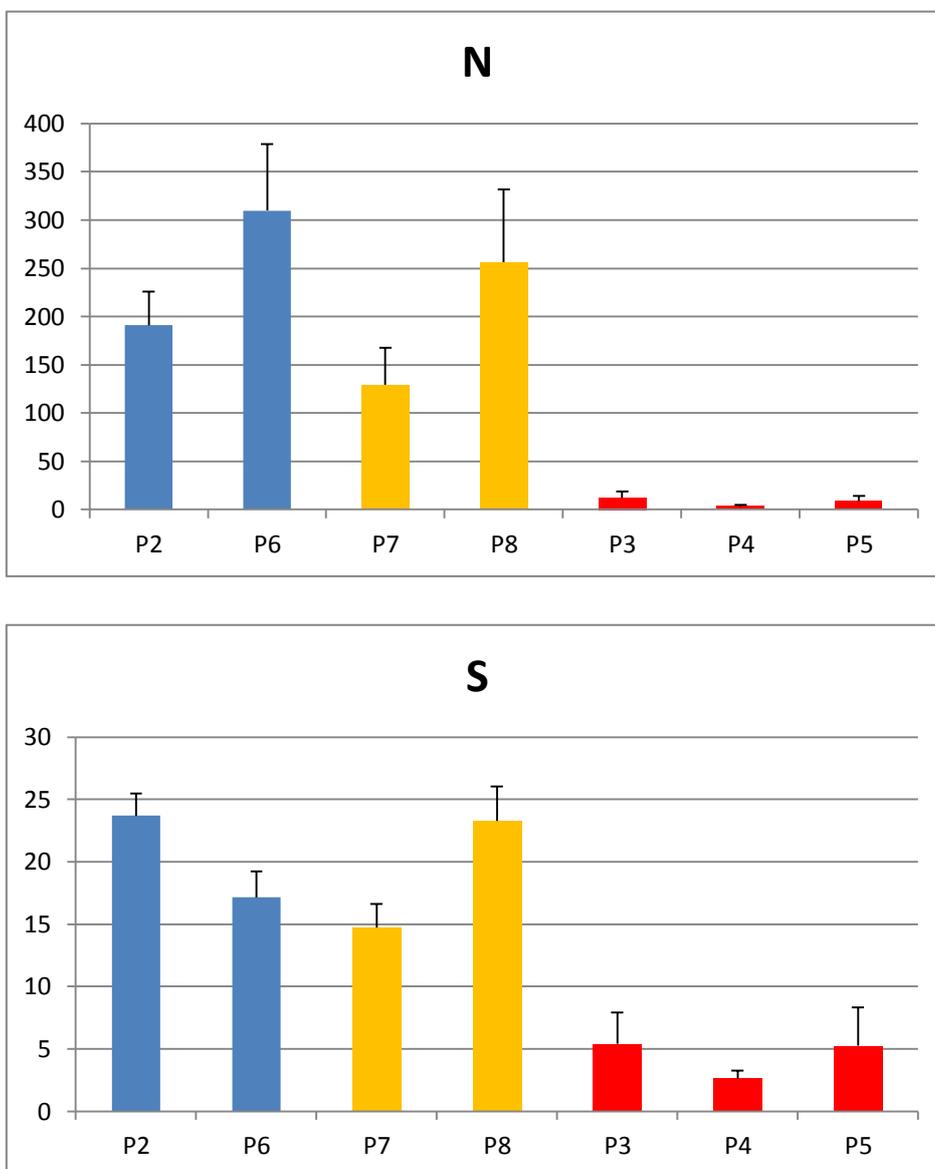


Figura 2.19. Número médio de indivíduos (N) e de taxa (S) capturados na amostragem da comunidade de macroinvertebrados, de Janeiro a Julho de 2010.

A composição faunística revela um predomínio típico das ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (*i.e.* %EPT > 50) que dominam usualmente nos troços de cabeceira de rios com boa integridade ecológica (Figura 2.20). A sua abundância relativa tende a diminuir com perturbações diversas mas também ao longo do eixo longitudinal dos cursos de água.

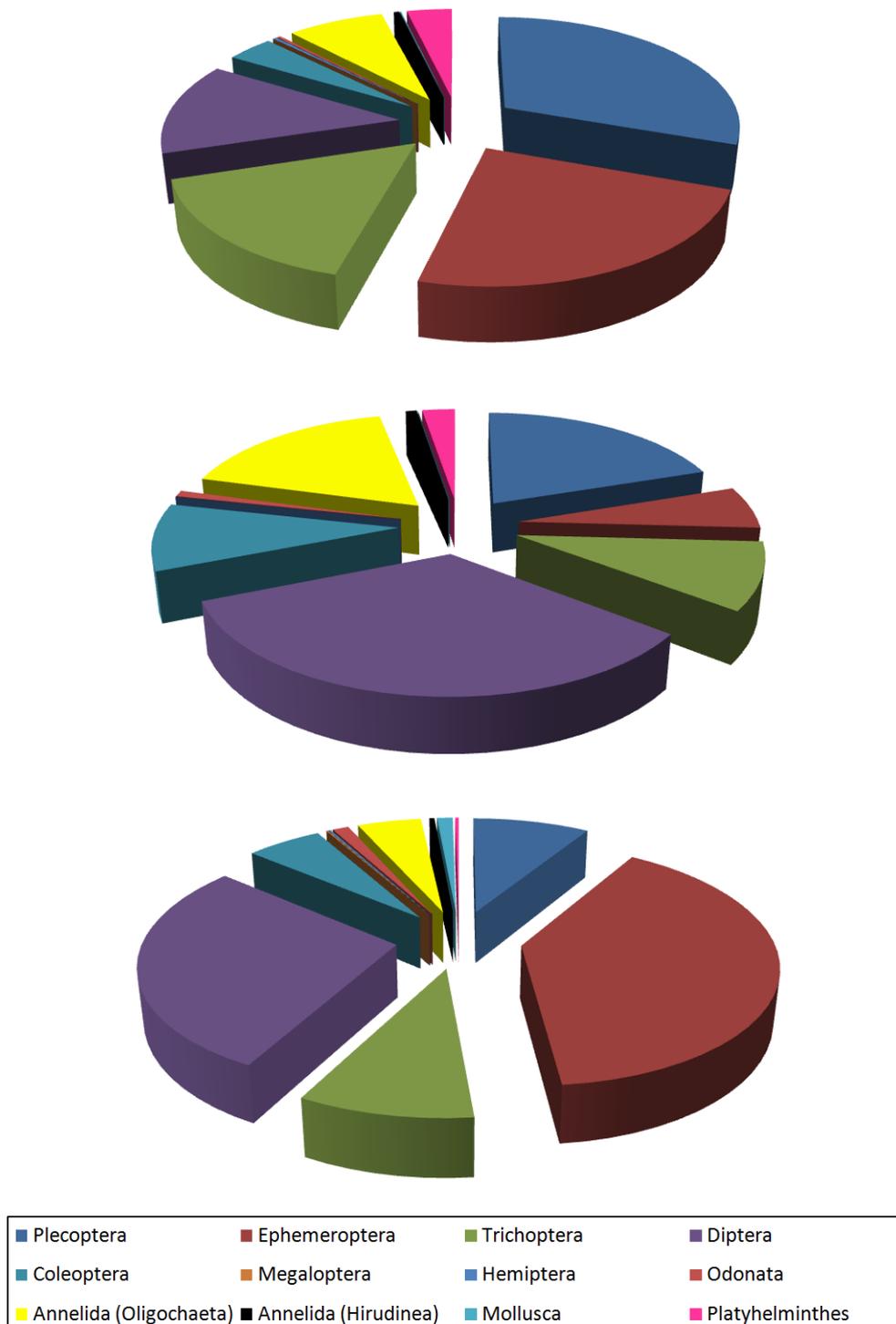


Figura 2.20. Composição faunística distribuída por 3 grupos: Referência (P2 e P6); Pouco Perturbado (P7 e P8) e Muito Perturbado (P3, P4, P5), considerando a globalidade dos períodos de amostragem (de Janeiro a Julho de 2010).

Comparativamente com o grupo de referência (*i.e.* P2 e P6), detectou-se uma diminuição na proporção de Plecoptera, composto por espécies tipicamente estenobiontes, muito pouco resistentes a qualquer distúrbio de origem antrópica no meio aquático, e um aumento substancial de Diptera, táxones precisamente adaptados a resistirem em ambientes de degradação ambiental acentuada. As diferenças são também evidentes, quando a análise é feita com base na diversidade de Shannon-Weaner (H') embora, estranhamente, se assista a um valor inferior em P6, aparentemente com boa classificação em termos de habitats aquáticos e ribeirinhos. Apesar da avaliação pericial não detectar sinais macroscópicos de perturbação, a elevada proporção nos Diptera e Oligochaeta (*i.e.* atingiu 78% nos meses de Junho e Julho) faz pressupor que a massa de água (Ribeira de Calabor) possa também estar sujeita a algum tipo de stress ambiental (Figura 2.21).

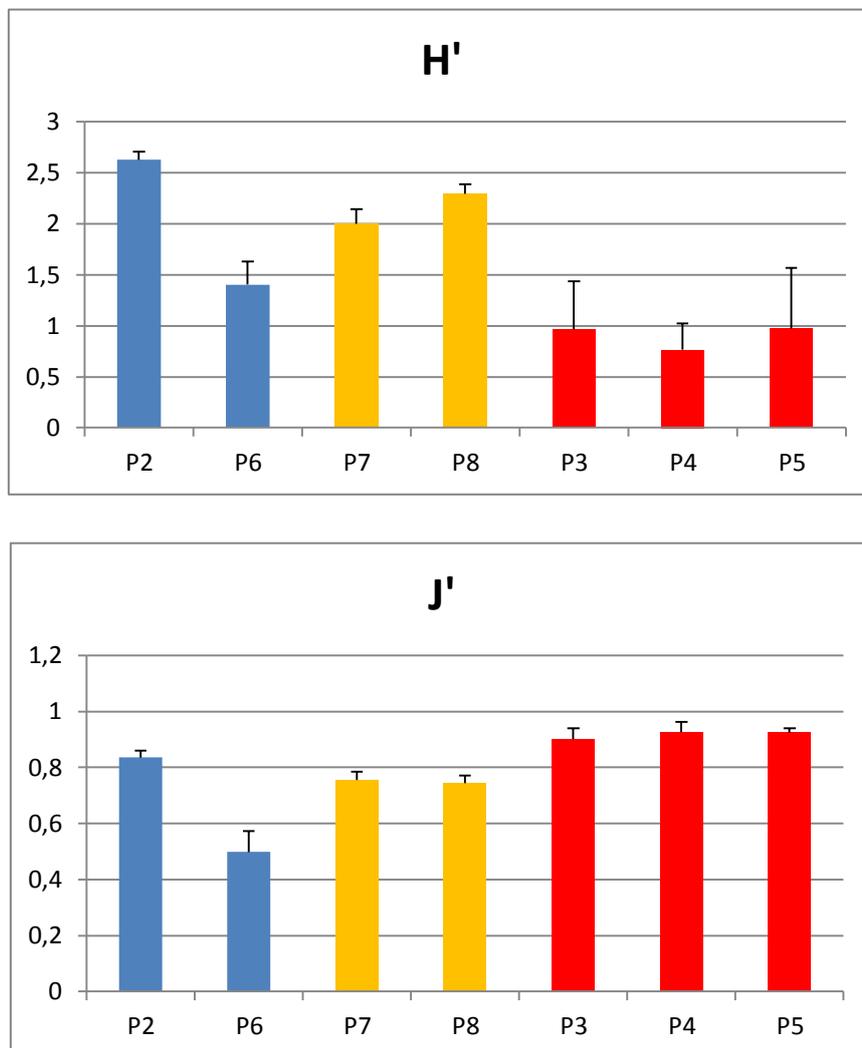


Figura 2.21. Diversidade H' de Shannon-Weaner e de Equitabilidade J' de Pielou (valores médios \pm erros-padrão) distribuídos pelos 3 grupos: Referência (P2 e P6); Pouco Perturbado (P7 e P8) e Muito Perturbado (P3, P4, P5).

A equitabilidade Pielou (J') ajuda a perceber o domínio que efectivamente ocorre em P2 por parte da família Lumbriculidae (Oligochaeta), estando as proporções dos restantes grupos faunísticos mais equilibrada nas restantes comunidades distribuídas pelos diferentes locais amostrados (Figura 2.21). De facto nos locais de referência e em alguns períodos nos locais pouco perturbados, a melhor qualidade biológica aparece expressa pelo domínio de táxones pertencentes aos Ephemeroptera (e.g. *Calliarctus humilis*, *Habrophlebia fusca*, *Ecdyonurus* gr. *venosus*, *Epeorus silvicola*, *Ephemerella ignita*), Plecoptera (e.g. *Leuctra* sp., *Capnioneura* sp., *Amphinemura sulccionis*, *Protonemura* sp., *Brachyptera* sp., *Perla madritensis*, *Isoperla* sp., *Siphonoperla torrentium*) e Trichoptera (*Allogamus ligonifer* and *Allogamus laureatus*, *Chaetopteryx lusitanica*, *Anomalopterygella chauviniana*, *Limnephilus* sp., *Halesus radiatus*, *Sericostoma* sp., *Philopotamus* sp., *Larcasia partita*). Por sua vez, nos locais degradados dá-se a substituição em termos de representatividade por macroinvertebrados pertencentes, por exemplo, aos Oligochaeta (e.g. Lumbriculidae e Lumbricidae), Hirudinea (e.g. *Erpobdella* sp.) Diptera (e.g. Chironomidae, Simuliidae). Relativamente aos modos de vida, observou-se uma diminuição da importância dos hábitos pelágicos, típicos dos organismos nadadores (e.g. Ephemeroptera- Baetidae, Leptophlebiidae) (Figura 2.22). De qualquer forma o baixo número de indivíduos capturados nos locais perturbados ($N=8,3 \pm 2,8$ SE; $S=4,4 \pm 1,2$ SE) e sua transformação em termos de abundância relativa pode conduzir a interpretações erróneas. Por outro lado, a grande severidade do evento pode, de facto, caso se mantenham as condições ambientais inviabilizar a recolonização e sobrevivência das espécies pioneiras.

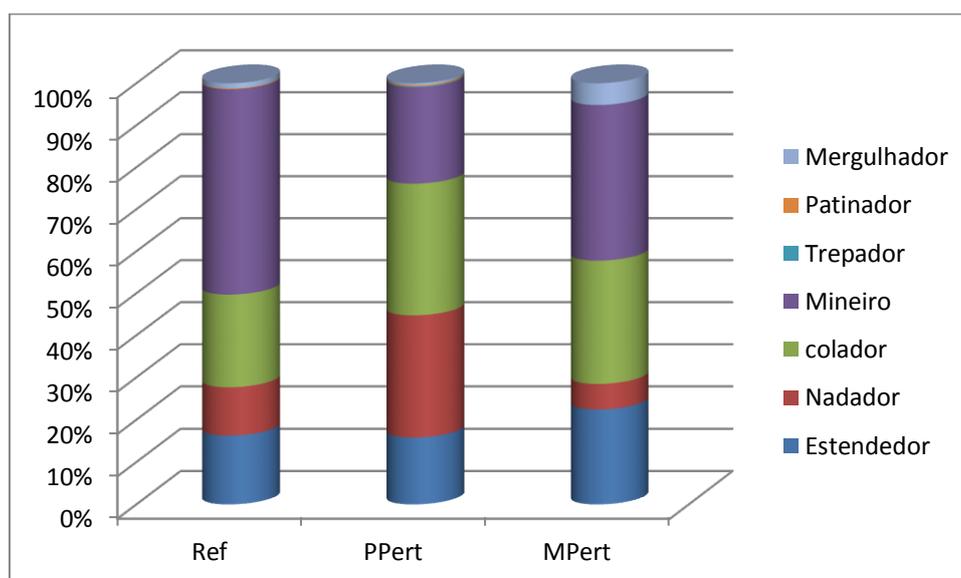


Figura 2.22. Modos de existência das comunidades de invertebrados para os 3 grupos: Referência (Ref); Pouco Perturbado (PPert) e Muito Perturbado (MPert).

Também a análise dos grupos funcionais em termos relativos pode estar mascarada pelos valores absolutos referentes aos táxones presentes, especialmente nos locais referenciados como muito perturbados. Contudo, percebe-se que para os locais de referência a importância dos detritívoros é superior, realçando a elevada dependência em termos energéticos dos inputs exógenos provenientes da galeria ripícola que margina os cursos de água. Este carácter heterotrófico está, contudo, patente em todos os grupos dada a baixíssima proporção de fitófagos e/ou raspadores, que se alimentam directamente dos produtores primários (e.g. algas do *perifiton*, macrófitos). Obviamente a grande turvação da água impede a entrada de luz no leito do sistema, acrescendo o domínio absoluto de materiais inorgânicos finos (e.g. areias, limos, gravilhas) altamente instáveis e incapazes de permitir a colonização/fixação das plantas e organismos que se alimentam directamente de tal recurso energético (Figura 2.23).

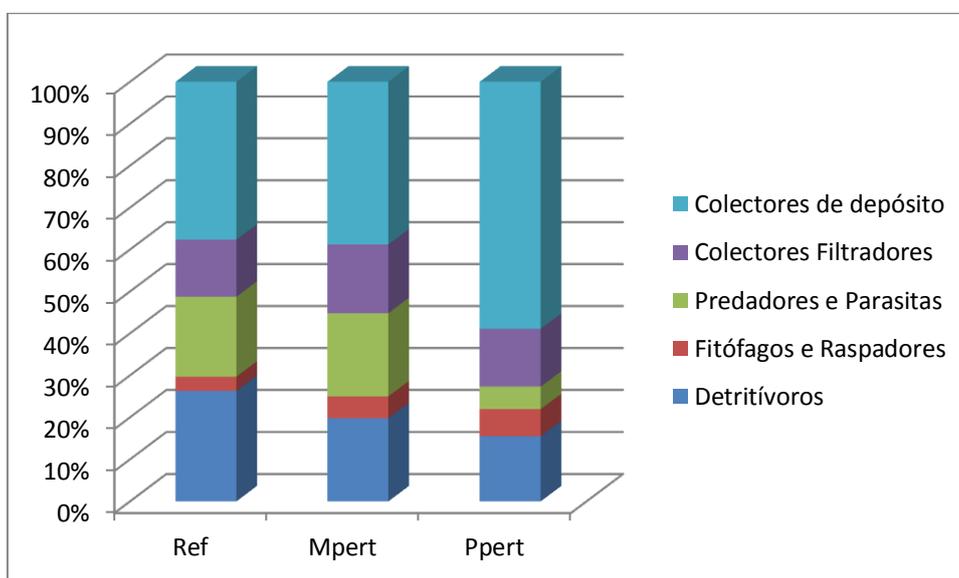


Figura 2.23. Grupos tróficos referentes às comunidades de invertebrados para os 3 grupos: Referência (Ref); Pouco Perturbado (PPert) e Muito Perturbado (MPert).

A avaliação e aferição de impactos ambientais baseada no cálculo do IBMWP, comumente empregue em anos transactos na Península Ibérica, e mais recentemente o IPT_N, permitiram diferenciar claramente a qualidade ecológica entre locais de amostragem/grupos, sendo bastante sensíveis para apurar o efeito da contaminação química e poluição física a que foi sujeita a rede hídrica situada a jusante das escombreiras. Destaca-se o excelente/bom status ecológico em P2 e P8 e a flutuabilidade entre o bom e o razoável detectado para P6, e P7. Obviamente o cenário para a Ribeira do Portelo (P3, P4, P5) é vincadamente contrastante com os demais grupos, pela confirmação do mau/mediocre estado biológico da massa de água (Quadro 2.11).

Quadro 2.11. Avaliação da evolução espacial e temporal ao nível da qualidade ecológica baseada nos índices bióticos IBMWP e IPtIN. Os blocos sem informação (*) referem-se a amostras onde não foram capturados macroinvertebrados.

Índices	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
IBMWP	161	151	155	105	138	134	127
Classificação	I	I	I	I	I	I	I
IPtIN	0,86	0,85	0,89	0,79	0,90	0,79	0,74
Classificação	Bom	Bom	Excelente	Bom	Excelente	Bom	Bom
Índices	P61	P62	P63	P64	P65	P66	P67
IBMWP	86	110	163	43	75	102	62
Classificação	II	I	I	III	II	I	II
IPtIN	0,73	0,70	0,84	0,46	0,72	0,63	0,47
Classificação	Bom	Bom	Bom	Razoável	Bom	Razoável	Razoável
Índices	P31	P32	P33	P34	P35	P36	P37
IBMWP	10	*	14	*	5	61	55
Classificação	V	*	V	*	V	II	III
IPtIN	0,54	*	0,50	*	0,21	0,45	0,50
Classificação	Razoável	*	Razoável	*	Mau	Razoável	Razoável
Índices	P41	P42	P43	P44	P45	P46	P47
IBMWP	*	15	1	4	19	4	*
Classificação	*	V	V	V	IV	V	*
IPtIN	*	0,52	0,06	0,13	0,30	0,11	*
Classificação	*	Razoável	Mau	Mau	Medíocre	Mau	*
Índices	P51	P52	P53	P54	P55	P56	P57
IBMWP	*	10	*	7	24	66	*
Classificação	*	V	*	V	IV	II	*
IPtIN	*	0,54	*	0,37	0,41	0,49	*
Classificação	*	Razoável	*	Medíocre	Medíocre	Razoável	*
Índices	P71	P72	P73	P74	P75	P76	P77
IBMWP	59	130	113	44	67	74	79
Classificação	III	I	I	III	II	II	II
IPtIN	0,56	0,83	0,81	0,59	0,51	0,50	0,48
Classificação	Razoável	Bom	Bom	Razoável	Razoável	Razoável	Razoável
Índices	P81	P82	P83	P84	P85	P86	P87
IBMWP	97	173	133	72	146	153	121
Classificação	II	I	I	II	I	I	I
IPtIN	0,67	1,09	1,02	0,85	0,86	0,90	0,89
Classificação	Bom	Excelente	Excelente	Bom	Bom	Excelente	Excelente

2.3.4. Análise Multivariada

A análise PERMANOVA permitiu verificar que ambos os factores são significativos, com os valores assumidos para 1) Factor Impacto (Imp.): Pseudo-F = 4,216; P = 0,001 e 2) Factor Período (Pe.): Pseudo-F = 1,738; P = 0,001. Obviamente o baixo número de graus de liberdade, nomeadamente para o tipo de impacto, condiciona as análises (Quadro 2.12).

Quadro 2.12. Resultados da análise PERMANOVA aos factores impacto (imp) e período (pe).

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Imp.	2	22335	11168	4,216	0,001	998
Pe.	6	27621	4603,6	1,738	0,001	992
Imp. x Pe.	12	31167	2597,2	0,981	0,565	996
Res.	21	55623	2648,7			
Total	41	1,3887*10 ⁵				

Relativamente às componentes de variação de cada termo de análise, verifica-se que a variabilidade dos termos aleatórios, *i.e.* **S (Res.)= 54,0%**, é algo superior ao somatório dos termos fixos, *i.e.* **S (Imp. E Pe)= 46%**, expressando que existe aproximadamente metade da variância que não é explicada pelos factores mencionados nesta análise (Quadro 2.13).

Quadro 2.13. Resultados da análise PERMANOVA aos factores impacto (imp) e período (pe).

Source	Estimate	Sq. Root	%
S (Imp.)	644,8	25,4	26,7
S (Pe.)	339,2	18,4	19,3
S (Res.)	2648,7	51,5	54,0

As análises *Pair-Wise* elaboradas para os diferentes níveis dentro de cada factor considerado, *i.e.* Período (n=7) e Impacto (n=3) mostram diferenças significativas entre (Quadro 2.14 e 2.15):

- 1) Todos os grupos definidos para o factor Impacto (P< 0,05);
- 2) Para os seguintes grupos dentro do factor Período:
 - a) mês de Julho e os restantes meses (com excepção de Maio e Junho);
 - b) mês de Junho e os meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril;

Quadro 2.14. Análise *Pair-Wise* do factor Período.

<i>Groups</i>	<i>t</i>	<i>P (perm)</i>	<i>Unique perms</i>
julho, junho	1,3838	0,055	998
julho, maio	1,2496	0,124	998
julho, abril	1,5839	0,021	992
julho, março	1,5919	0,037	995
julho, fevereiro	1,5530	0,027	997
julho, janeiro	1,8231	0,025	982
junho, maio	0,9713	0,533	997
junho, abril	1,6002	0,011	996
junho, março	1,5636	0,019	999
junho, fevereiro	1,5840	0,011	999
junho, janeiro	1,9211	0,006	998
maio, abril	1,0429	0,427	998
maio, março	0,9954	0,504	997
maio, fevereiro	1,0124	0,513	998
maio, janeiro	1,4210	0,064	998
abril, março	0,9043	0,655	992
abril, fevereiro	1,0336	0,457	992
abril, janeiro	1,2769	0,149	996
março, fevereiro	0,8658	0,677	997
março, janeiro	1,4183	0,082	993
fevereiro, janeiro	1,2807	0,147	993

Quadro 2.15. Análise *Pair-Wise* do factor Impacto.

<i>Groups</i>	<i>t</i>	<i>P (perm)</i>	<i>Unique perms</i>
ref, mpert	2,2448	0,001	999
ref, ppert	1,7712	0,005	999
mpert, ppert	2,061	0,001	999

Relativamente aos valores da *Média de Similaridades entre/intra grupos* a maior percentagem de similaridade pertenceu ao grupo dos locais de referência, aquele que menos modificações sofreu nas condições ambientais naturais (36,9%) (Quadro 2.14).

Quadro 2.16. Média de Similaridade entre/intra grupos para o Factor Impacto.

	ref	mpert	ppert
ref	36,867		
mpert	10,047	7,859	
ppert	29,868	9,360	31,024

No que respeita à *Média de Similaridades entre/intra grupos* (Quadro 2.16) verificou-se uma baixa similaridade entre os diferentes meses. Para além da própria sucessão das comunidades ao longo das épocas do ano, devidas à natureza do seu ciclo de vida, as condições adversas promovem aleatoriedade no padrão de colonização das espécies. Contudo as maiores percentagens de similaridade foram obtidas precisamente para os meses onde a variabilidade climática (menos precipitação e caudais fortes na rede hídrica) não foi tão acentuada.

Quadro 2.17. Média de Similaridade entre/intra grupos para o Factor Período.

	julho	junho	maio	abril	março	fevereiro	janeiro
julho	32,941						
junho	30,284	34,409					
maio	20,241	26,030	16,082				
abril	9,5103	15,580	14,100	11,562			
março	16,546	21,174	18,601	17,255	19,581		
fevereiro	15,953	19,501	17,417	14,582	22,284	17,542	
janeiro	18,913	21,897	16,322	14,746	18,784	20,657	27,488

A análise NMDS, baseada na comunidade de macroinvertebrados, revelou relativamente ao tipo de impacto uma separação evidente entre os grupos de Referência (Ref) e menos perturbados (PPert) e o grupo Mais Perturbado (MPert), que apesar de tudo apresenta uma dispersão acentuada fruto da heterogeneidade e carácter aleatório dos indivíduos desses locais (Figura 2.24).

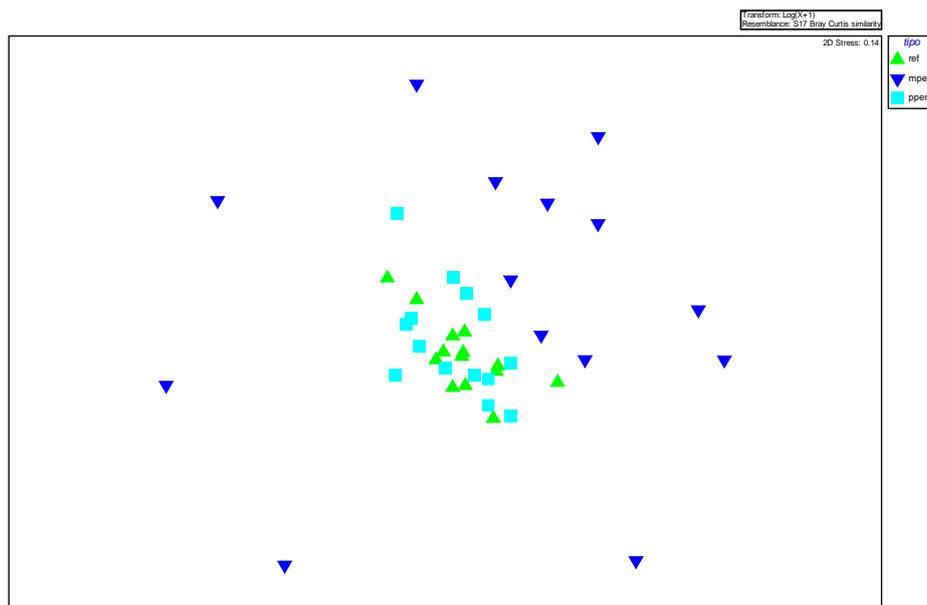


Figura 2.24. Ordenação NMDS dos locais de amostragem, baseada nas comunidades de invertebrados, considerando os 3 grupos definidos para o tipo de impacto: Referência (Ref); Pouco Perturbado (PPert) e Muito Perturbado (MPert).

No caso da NMDS relativo ao período de análise, *i.e.* de Janeiro a Julho de 2010, não se encontra um padrão específico para qualquer mês, apresentado uma grande dispersão que reflecte não só as diferenças conhecidas entre as comunidades de macroinvertebrados dos diferentes locais como a própria variabilidade ambiental, mesmo quando não ocorrem impactos graves no sistema aquático (Figuras 2.25 e 2.26). Destaque para o valor 2D-stress de 0,11, que confirma uma boa ordenação.

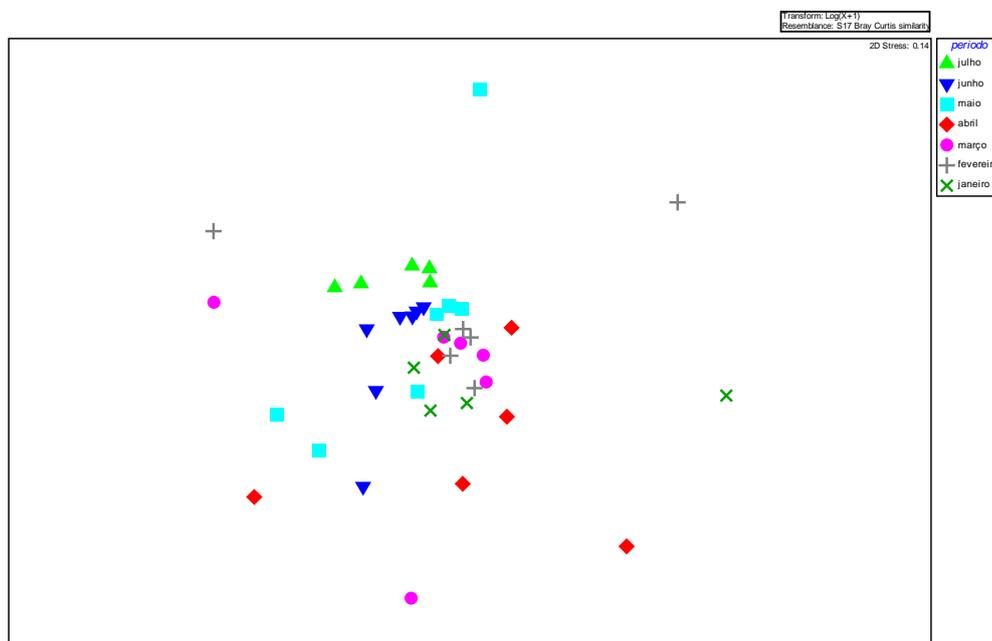


Figura 2.25. Ordenação NMDS dos locais de amostragem, baseada nas comunidades de invertebrados, considerando os 7 grupos referentes à amostragem mensal, realizada de Janeiro a Julho de 2010.

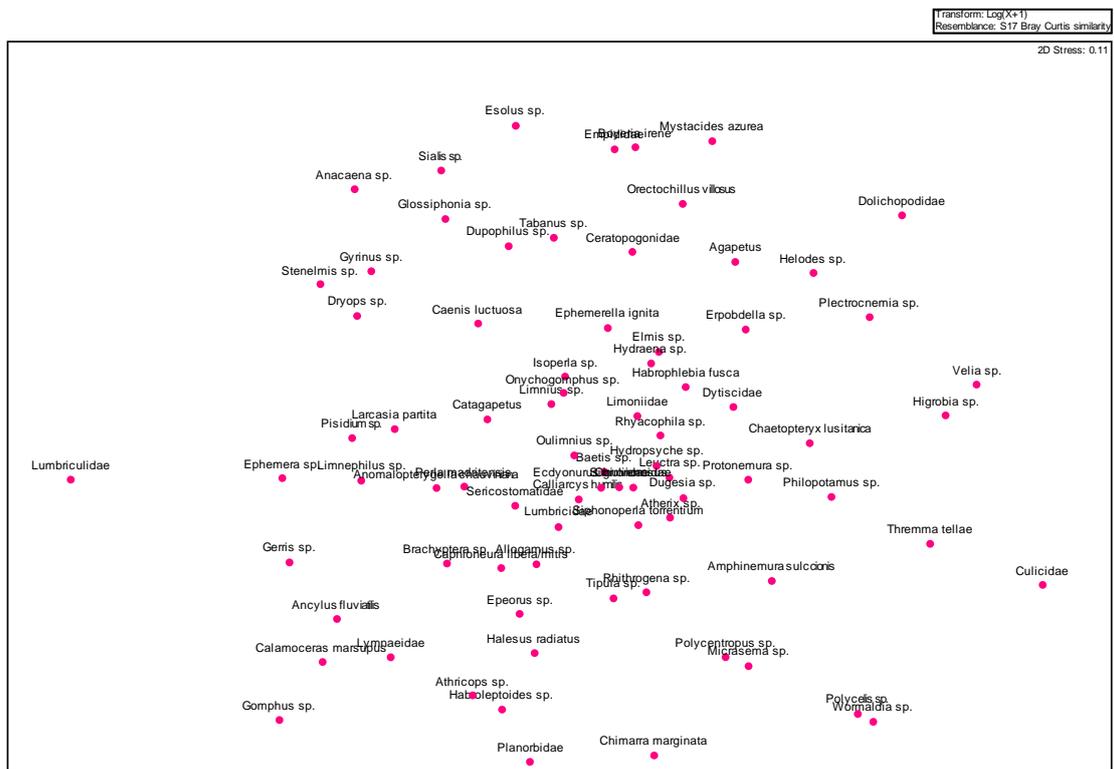


Figura 2.26. Ordenação NMDS das comunidades de macroinvertebrados capturadas no estudo, de Janeiro a Julho de 2010.

Por fim, da aplicação do método de ordenação dbRDA procedeu-se a uma correlação entre os parâmetros ambientais, *i.e.* variáveis físico-químicas da água e variáveis do habitat, e as comunidades de macroinvertebrados amostradas. Foram excluídos da análise os parâmetros ambientais com um **coeficiente de correlação de Pearson** inferior a 0,4 (Figura 2.27).

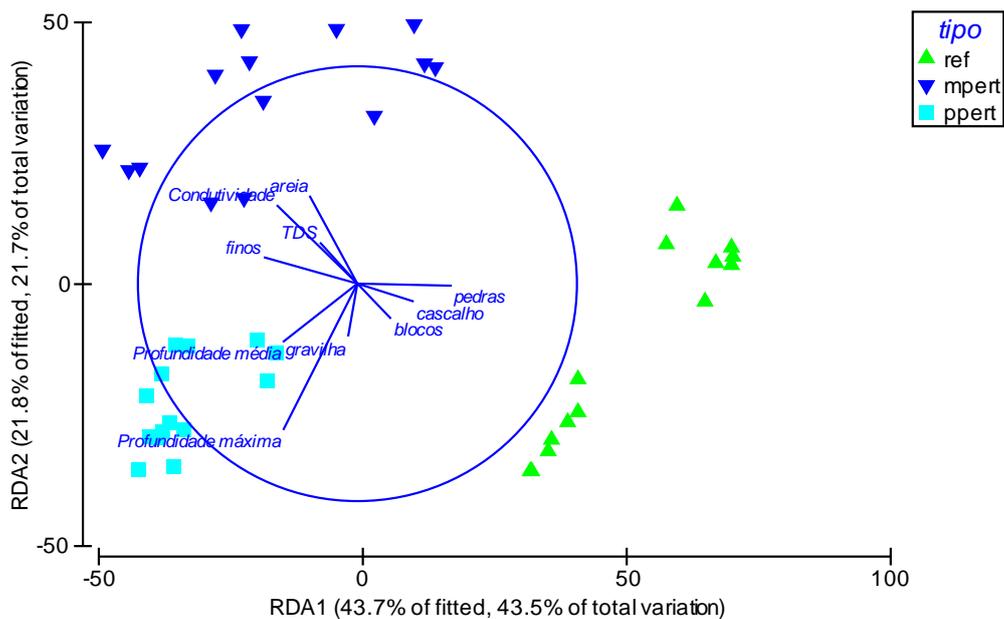


Figura 2.27. Análise dbRDA referente às variáveis ambientais e aos 3 grupos: Referência (Ref); Pouco Perturbado (PPert) e Muito Perturbado (MPert).

Registo para o facto dos dois primeiros eixos da análise dbRDA (*dbRDA1* e *dbRDA2*) explicarem 65,5% da relação entre as comunidades de invertebrados e os parâmetros ambientais. De facto as variáveis relativas ao substrato grosseiro (blocos, pedras e cascalhos), típico de rios montanhosas, aparecem associadas aos locais de referência. Por sua vez, os impactos mais pronunciados relacionados com o acréscimo substancial da condutividade e dos TDS assim como a sedimentação promovida pelas areias e finos (limos e argilas) definem claramente os locais mais perturbados. Também no que respeita aos locais menos perturbados, situados em troços médios da rede hídrica, aparece visível uma correlação entre a profundidade e o substrato de dimensões intermédias que normalmente caracterizam ambientalmente estes troços dos rios.

2.4. DISCUSSÃO

O estudo efectuado permitiu avaliar os impactos ambientais resultantes do colapso das escombreyras das minas do Portelo e identificar os efeitos de curto-termo (Janeiro a Julho de 2010) ocorridos sobre as comunidades de macroinvertebrados aquáticos das ribeiras do Portelo, Calabor, Baçal e rio Sabor, numa extensão de aproximadamente 20 km. Com efeito, a entrada súbita de grande quantidade de sedimentos na rede hídrica e posterior arrastamento para zonas de jusante veio a revelar-se como um evento catastrófico que modificou, por completo, as características da água, habitats e comunidades de macroinvertebrados presentes.

O impacto da acidificação da água está documentado noutros estudos como uma das causas da diminuição da diversidade de ecossistemas aquáticos, sendo um dos principais factores de perturbação em zonas industrializadas (WINNER *et al.* 1980; FELDMAN & CONNOR 1992; GRAY 1998; SOLÀ *et al.* 2004; BATTY *et al.* 2005). Um dos efeitos sinérgicos associados à diminuição do pH consiste no aumento da solubilidade de metais pesados na água (CAMPBELL & STOKES 1985). De facto, os resultados obtidos neste estudo mostraram uma elevada concentração de alguns metais pesados, nomeadamente de alumínio, cobre e cobalto, podendo fomentar fenómenos persistentes de toxicidade pela potencial bioacumulação ao nível dos organismos presentes no meio aquático. No entanto, os impactos poderão ser ainda mais nefastos se ocorrerem fenómenos de bioamplificação na cadeia trófica. De qualquer modo, o acréscimo substancial de sólidos dissolvidos e particulados, depositados e/ou circulando na coluna de água, produz por si só impactos notáveis pela colmatagem dos interstícios na zona bentónica dos cursos de água, precisamente

o local onde se concentra a maior fracção de organismos nos ecossistemas aquáticos. Esta mudança súbita das condições ambientais está na base da redução drástica na abundância e diversidade das comunidades de invertebrados, completamente eliminada na proximidade da zona de *input* dos sedimentos na ribeira do Portelo. Para além da perda de habitat (obliteração dos interstícios), a asfixia dos organismos (colmatagem das brânquias) e a qualidade da água (e.g. acidez e teores elevados de metais pesados nos sedimentos e coluna de água) foram os principais factores que explicam o desaparecimento de muitos táxones. À semelhança doutros trabalhos (WINNER *et al.* 1980; MASON 1996) passaram a dominar os grupos faunísticos tolerantes à poluição, como sejam os Diptera (e.g. Chironomidae); Hirudinea (e.g. *Erpobdella* sp.) e Oligochaeta (e.g. Lumbriculidae e Lumbricidae). Táxones muito sensíveis e anteriormente dominantes, pertencentes às ordens Ephemeroptera (e.g. *Calliarctus humilis*, *Habrophlebia fusca*, *Ecdyonurus* gr. *venosus*, *Epeorus silvicola*), Trichoptera (e.g. *Allogamus lignonifer*, *Chaetopteryx lusitanica*, *Anomalopterygella chauviniana*, *Halesus radiatus*, *Sericostoma* sp.) e Plecoptera (e.g. *Leuctra* sp., *Capnioneura* sp., *Amphinemura sulccionis*, *Brachyptera* sp., *Perla madritensis*, *Siphonoperla torrentium*) não conseguiram resistir face à severidade do evento. Outras métricas usadas no estudo, *i.e.* o número de indivíduos e de famílias/géneros presentes, a diversidade de Shannon-Weaner, H', a equitabilidade de Pielou, J', a %EPT, demonstraram ser suficientemente sensíveis para diferenciar os 3 grupos considerados no estudo (e.g. Não perturbado; Pouco perturbado; Muito perturbado). Também a análise efectuada ao nível do modo de vida preferencial dos organismos (e.g. pelágico vs. bentónico) e o regime trófico dominante (e.g. detritívoro vs. colector filtrador) tem sido utilizada noutros estudos, como *traits* em testes de avaliação da toxicidade da água e sedimentos (GERHARDT *et al.* 2004; BATTY *et al.* 2005; DUCROT *et al.* 2005). A heterogeneidade de métricas foi ainda ampliada mediante o uso de índices bióticos unimétricos (IBMWP) e multimétricos (IPtI_N) que, associados às ferramentas de análise multivariada, permitiu encontrar um elenco de métodos e métricas que deverão continuar a ser utilizados em estudos futuros de monitorização, a médio-longo prazo, nestes cursos de água que pertencem a uma área protegida, o Parque Natural de Montesinho, onde os valores da conservação de espécies e habitats assumem carácter prioritário. Refira-se que a selecção de métricas responsivas à degradação ambiental é fundamental para a definição mais adequada da monitorização de impactos ambientais e estudo das melhores alternativas para a reabilitação de sistemas perturbados. Vários trabalhos comprovam a importância do uso de *Standard Rapid Bioassessment Methods* e análise multivariada como métodos apropriados de integração dos efeitos da presença de tóxicos, contaminação orgânica e perturbações de habitat sobre a fauna (GERHARDT 1999; SOLÀ *et al.* 2004).

Não foram registados, em termos temporais, sinais evidentes de recuperação na comunidade de macroinvertebrados, particularmente na ribeira do Portelo (aproximadamente com 3 km de extensão). Foi encontrada uma baixa resistência e resiliência do sistema afectado, especialmente da ribeira do Portelo, embora esta análise corresponda a um período de tempo relativamente limitado. Contudo, tudo leva a crer que o retorno às características oligotróficas presentes na cabeceira do rio Sabor e afluentes e as funções e processos anteriormente presentes nos ecossistemas aquáticos possam necessitar de períodos de tempo mais alargados. Uma vez que não foram tomadas quaisquer medidas de reabilitação/recuperação e outras de protecção da entrada contínua de sedimentos na ribeira, especialmente em épocas chuvosas, serão de esperar condições menos favoráveis à recolonização pelo *biota* típico da região. Nesta medida afigura-se essencial o estabelecido de um Plano de Reabilitação/Recuperação, complementado por um Programa de Monitorização na zona afectada.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA-TERCEDOR J. & SANCHEZ-ORTEGA A. 1988. Un método rápido y simples para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hellawell (1978). *Limnetica* 4: 51-56.
- ALBA-TERCEDOR J. 2000. BMWP', un adattamento spagnolo del British Biological Monitoring Working Party (BMWP) Score System. *Biologia Ambientale* 14: 65 - 67.
- APHA. 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association. Washington.
- BATTY L.C., ATKIN L. & MANNING D.A.C. 2005. Assessment of the ecological potential of mine-water treatment wetlands using a baseline survey of macroinvertebrate communities. *Environmental Pollution* 138: 412-419.
- CAMPBELL P.G.C. & STOKES P.M. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 2034-2049.
- CARPENTER K.E. 1928. *Life in Inland Waters*, Sidgwick-Jackson, London.
- CHANDLER J.R. 1970. A biological approach to water quality management. *Wat. Poll. Cont.* 69: 415-421.
- CLARKE K.R. & GORLEY R.N. 2006. "PRIMER v6: User Manual/Tutorial". PRIMER-E: Plymouth.
- CLEMENTS W.H. 1994. Benthic invertebrate community responses to heavy metals in the upper Arkansas River basin, Colorado. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 13: 30-44.
- CLEMENTS W.H., CHERRY D.S. & VAN HASSEL J.H. 1992. Assessment of the impact of heavy metals on benthic communities at the Clinch River (Virginia): Evaluation of an index of community sensitivity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1686-1694.
- CORTES R.M.V., TEIXEIRA A., CRESPI A., OLIVEIRA S., VAREJÃO E. & PEREIRA A. 1999. Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Lima. 1ª Fase. Análise e Diagnóstico da Situação de Referência (Componente Ambiental). Anexo 9. Min. do Ambiente. 257 pp.
- DUCROT V., USSEGLIO-POLATERA P., PÉRY A., MOUTHON J., LAFONT M., ROGER M., GARRIC J. & FERARD J. 2005. Using aquatic macroinvertebrate traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: accounting for the diversity of

- potential biological responses to toxicants. *Environmental toxicology and Chemistry* 24: 2306-2315.
- FELDMAN R.S. & CONNOR E.D. 1992. The relationship between pH and community structure of invertebrates in streams of the Shenandoah National Park, Virginia, USA *Freshwater Biology* 27: 261-276.
- FRANQUET E., CELLOT B., PONT D. & BOURNAUD M. 1995. Environmental and macroinvertebrate dynamics in the Lower Rhône River and a lateral dike field: A study matching two functioning descriptors. *Hydrobiol* 308: 207–217.
- FREEDMAN B. 1989. *Environmental Ecology. The Impacts of Pollution and other Stresses on Ecosystem Structure and Function*, Academic Press, San Diego.
- GERHARDT A. 1999. Biomonitoring for the 21th Century. In: GERHARDT A. (ed), *Biomonitoring the Polluted Water. Reviews on Actual Topics*. TTP, Zurich, Switzerland.
- GERHARDT A., BISTHOVEN L.J. & SOARES A. 2004. Macroinvertebrate response to acid mine drainage: community metrics and on-line behavioural toxicity bioassay. *Environmental Pollution* 130: 263-274.
- GRAY N.F. 1998. Acid mine drainage composition and the implications for its impact on lotic systems. *Water Res.* 32: 2122-2134.
- HANNAFORD M.J. & RESH V.H. 1995. Variability in macroinvertebrate rapid-bioassessment surveys and habitat assessments in a northern California stream. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 14: 430–439.
- HILSENHOFF W.L. 1977. Use of Arthropods to Evaluate Water Quality of Streams. *Technical Bulletin No. 100*, U.S. Department of Nature Research.
- HILSENHOFF W.L. 1988. Rapid field assessment of organic pollution with a family-level biotic index. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 7: 65–68.
- INAG I.P. 2008. Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segunda a Directiva Quadro da Água Protocolo de amostragem e análise para os macroinvertebrados bentónicos. Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.
- INAG I.P. 2009. Critérios para a classificação do estado das massas de água superficiais- Rios e Albufeiras Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.

- KELLY M. 1988. *Mining and the Freshwater Environment*, Elsevier, New York.
- KERANS B.L. & KARR J.R. 1994. A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecol. Applic.* 4: 768–785.
- KIFFNEY P.M. & CLEMENTS W.H. 1994. Effects of heavy metals on a macroinvertebrate assemblage from a Rocky Mountain stream in experimental microcosms. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 134: 511–523.
- KOLKWITZ R. & MARSSON M. 1908. Ökologie der tierische Saprobien. *Ver. Dt. Bot. Ges.* 26: 505–519.
- LEGENDRE P. & ANDERSON M. 1999. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69: 1-24.
- LENAT D.R. & BARBOUR M.T. 1994. Using Benthic Macroinvertebrate Community Structure for Rapid, Cost-Effective, Water Quality Monitoring: Rapid Bioassessment. In S.L. Loeb & A. Spacie (eds), *Monitoring Aquatic Systems*, Lewis, Boca Raton, pp. 187–215.
- LOEB S.L. & SPACIE A. 1994. *Monitoring Aquatic Systems*, Lewis, Boca Raton.
- MARQUÉS M.J., MARTÍNEZ-CONDE E., ROVIRA, J.V. & ORDÓÑEZ S. 2001. Heavy metals pollution of aquatic ecosystems in the vicinity of a recently closed underground lead-zinc mine (Basque Country, Spain). *Environ. Geol.* 40: 1125–1137. DOI. 10.1007/s002540100314.
- MARTÍNEZ-CONDE E., ROVIRA J.V. & MARQUÉS M.J. 1999. Problemática ambiental que generan las explotaciones mineras. La mina Troya como ejemplo. *Observatorio Medioambiental* 2: 177–189.
- MASON C.F. 1996. *Biology of freshwater pollution*. Third ed. Longman Scientific and Technical Publishers. New York.
- MERRITT R.W. & CUMMINS K.W. 1978. *An introduction to the aquatic insects of North America*. Kendall-Hunt, Dubuque. Iowa. USA.
- MERRITT R.W. & CUMMINS K.W. 1996. Trophic relations of macroinvertebrates. In: *Stream Ecology* editado por Hauer & Lamberti. Academic Press. San Diego. USA. 453-474 pp..

- MUNNÉ A. & PRAT N. 2009. Use of macroinvertebrate-based multimetric indices for water quality evaluation in Spanish Mediterranean rivers: an intercalibration approach with the IBMWP index. *Hydrobiologia* 628: 203-225.
- MUNNE A., SOLA C. & PRAT N. 1998. QBR: Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera. *Tecnología del Agua* 175: 20-37.
- OLIVEIRA S. & CORTES R.M.V. 2006. Combining logistic with multivariate methods for the rapid biological assessment of rivers using macroinvertebrates. *Environmental Monitoring Assessment* 112: 93-113.
- OLIVEIRA S. 2006. Avaliação da Integridade Ecológica em Ecossistemas Aquáticos. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- PERKINS J.L. 1983. Bioassay evaluation of diversity and community comparison indexes. *J. WPCF* 55: 522–530.
- PLAFKIN J.L., BARBOUR M.T., PORTER K.D., GROSS S.K. & HUGHES R.M. 1989. *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Stream and Rivers: Benthic Macroinvertebrates and Fish*, EPA/440/4-89-001. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, Washington, D.C.
- RESH V.H. & JACKSON J.K. 1993. Rapid Assessment Approaches to Biomonitoring using Benthic Macroinvertebrates. In: D.M. Rosenberg and V.H. Resh (eds), *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*, Chapman and Hall, New York, pp. 195–233.
- RESH V.H., NORRIS R.H. & BARBOUR M.T. 1995. Design and implementation of rapid assessment approaches for water resource monitoring using benthic macroinvertebrates. *Austral. J. Ecol.* 20: 108–121.
- RICHARDSON R. E. 1928. The bottom fauna of the middle Illinois River, 1913–1925. Its distribution, abundance, valuation, and index value in the study of stream pollution. *Bull. Ill. St. Nat. Hist. Surv.* 17: 387–475.
- SOLÀ C., BURGOS M., PLAZUELO A., TOJA J., PLANS M. & PRAT N. 2004. Heavy metal bioaccumulation and macroinvertebrate community changes in a Mediterranean stream affected by acid mine drainage and an accidental spill (Guadiamar River, SW Spain). *Science of the Total Environment* 333: 109-126.
- STATSOFT Inc. 2004. STATISTICA (Data Analysis Software System). Version 7. www.statsoft.com. Tulsa, USA.

- TACHET H., RICHOUX P.H., BOURNARD M. & USSEGLIO-POLATERA, P. 2010. Invertébrés d'eaux douces. Systématique, biologie, écologie. CNRS Éditions, Paris.
- TACHET H., BOURNAUD M. & RICHOUX PH. 1981. *Introduction à l'étude des macroinvertébrés d'eaux douces*. Univ. Claude Bernard et Assoc. de Limnol., Lyon.
- TEIXEIRA A., CORTES R.M.V. & OLIVEIRA D. 2006. Habitat Use by Native and Stocked Trout (*Salmo trutta* L.) In Two Northeast Streams, Portugal. *Bulletin Française de la Pêche et la Pisciculture* 382: 1-18.
- TEIXEIRA A. 1994. *Variações naturais e antropogénicas na sucessão longitudinal de ecossistemas lóticos*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- VARANDAS S. & CORTES R.M.V. 2010. Evaluating macroinvertebrate biological metrics for ecological assessment of streams in northern Portugal. *Environmental Monitoring Assessment* 166: 201-221.
- WILSON R.S. 1994. Monitoring the effect of sewage effluent on the Oxford Canal using chironomid pupal exuviae. *J. IWEM* 8, 171–183.
- WINNER R.W., BOSSEL M.W. & FARRELL M.P. 1980. Insect community structure as an index of heavy-metal pollution in lotic ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 647-655.
- WOODIWISS F. S. 1964. The biological system of stream classification used by the Trent River. *Board. Chem. Indust.* 11: 443–447.
- WOODIWISS F.S. 1960. Trent Biotic Index Pollution. In *2nd. Quinquennial Abstracts of Statistics Relating to the Trent Watershed*, Trent River Authority.

CAPÍTULO 3

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO CICLO DE VIDA DO BIVALVE DE ÁGUA DOCE *Anodonta anatina* (L.).

RESUMO

Os bivalves de água doce do Nordeste de Portugal estão ameaçados pelas alterações ambientais promovidas nos sistemas aquáticos. Fenómenos como a regularização de caudais, poluição e eutroficação, degradação do habitat aquático e ribeirinho são alguns dos factores que estão na base da redução das populações de náíades dos rios transmontanos. No presente trabalho foi dedicada especial atenção ao ciclo de vida da náíade *Anodonta anatina*, um bivalve presente nos sectores médio e terminal dos rios Sabor, Tua e Tâmega. Procedeu-se à avaliação de aspectos relacionados com a bio-ecologia e fisiologia da espécie, nomeadamente com o ciclo reprodutivo. Os estudos efectuados permitiram verificar, com base na observação das gónadas, que a espécie é essencialmente dióica, embora tenham sido detectados casos de hermafroditismo. Foram também realizadas experiências que determinaram quais os peixes hospedeiros desta espécie de náíade. Ao contrário doutras espécies como a *Margaritifera margaritifera* que apresenta um leque de hospedeiros muito específico (e.g. salmão e truta), verificou-se que para *A. anatina* todas as espécies piscícolas autóctones funcionam como hospedeiros, embora as maiores taxas de transformações de gloquídeos para juvenis tenham sido alcançadas para *Salmo trutta* (16,5 juvenis por peixe) e *Squalius carolitertii* (16,4). No entanto o processo de metamorfose foi mais rápido nas espécies *Pseudochondrostoma duriense* (196 ± 40 dias grau) e *Luciobarbus bocagei* (231 ± 19 dias grau). A zona preferencial de infestação correspondeu às barbatanas ventrais (i.e. peitorais e pélvicas), estando intimamente relacionada com o modo expulsão dos gloquídeos (fios mucilaginosos). Das espécies exóticas apenas *Onchorynchus mykiss* funcionou como hospedeiro. Tal facto tem elevada relevância em termos de conservação da espécie, uma vez que em ambientes modificados predominam peixes exóticos que inviabilizam, pela via dos mecanismos de reprodução, a preservação deste bivalve. No entanto, foram ainda testadas outras ameaças como a poluição química. Os resultados obtidos permitiram verificar que mesmo para baixíssimas concentrações de metais pesados, como o cobre e o cobalto, o efeito pode ser letal para estes bivalves.

Palavras-chave: *Anodonta anatina*, reprodução, hospedeiros, impactos ambientais

ABSTRACT

Freshwater mussels of northeastern Portugal are threatened by the environmental changes promoted in the aquatic systems. Regulation, pollution and eutrophication, aquatic and riparian habitat degradation are the main factors linked to the naiads population reduction in the river ecosystems of the region. In the present study, special focus was dedicated to the life-cycle of a naiad, *Anodonta anatina*, which is present in the middle and lower parts of Sabor, Tua and Tâmega rivers. The bio-ecology and physiology of *A. anatina* was evaluated, namely related with reproductive cycle. The experiments showed, based on the gonad observations, that this species is mainly dioicous, although some hermaphroditism had been detected. Furthermore, it was also realized several experiments in order to find the host fishes for this naiad. In opposition to *Margaritifera margaritifera*, which have specific host species belonged to salmonids (e.g. salmon and brown trout) the results showed that all native fish species tested in this study are natural hosts of *A. anatina*. The best transformation rates of gloquidia into juveniles were obtained for *Salmo trutta* (16.5 juveniles/fish) and *Squalius carolitertii* (16.4). On the other hand, the faster metamorphosis process occurred for *Pseudochondrostoma duriense* (196 ± 40 degree days) and *Luciobarbus bocagei* (231 ± 19 degree days). The preference zones for the infestation process corresponded to the ventral fins (i.e. pectoral and pelvic fins) and are related with the dispersion way of gloquidia for this naiad species (mucilaginous filaments with gloquidia, located near the benthic zone). From the exotic fish species tested, only *Onchorynchus mykiss* functioned as host fish species for *A. anatina*. This fact has a relevant conservation meaning, since modified environments are dominated by exotic species conditioning the preservation of *A. anatina* populations. The diminishing of host native species and chemical pollution are environmental impacts studied and related with the presence of mussel populations in the rivers of the region. It was also confirmed that lower concentrations of heavy metals, like copper and cobalt, can have a lethal effect for these bivalve species.

Key-words: *Anodonta anatina*, reproduction, host fishes, environmental impacts

3.1. INTRODUÇÃO

Os bivalves de água doce (Bivalvia, Unionoida) pertencem ao grupo de animais mais ameaçados no mundo (NEVES *et al.* 1997; STRAYER *et al.* 2004). Inserem-se no *Phyllum* Mollusca, um dos grupos com maior número de espécies. Apareceram aproximadamente há 200 milhões de anos e, hoje, estão presentes nos 5 continentes povoando essencialmente o meio marinho e, apesar de em menor quantidade, o meio dulçaquícola. São caracterizados por possuírem uma concha composta de duas valvas calcárias unidas por um músculo adutor que lhe confere a capacidade de abertura. Movimentam-se através da contracção do pé num só sentido e em função da quantidade de alimento disponível no seu habitat. Não obstante, estes movimentos são reduzidos e por esta razão são considerados letárgicos (REIS 2010).

Nos Estados Unidos as populações de bivalves de água doce sofreram um decréscimo de 70% e em certos casos, ocorreu mesmo a extinção de algumas espécies. NAIMO (1995) associa o desaparecimento dos bivalves na América à exposição a metais pesados dissolvidos na água e, salienta que o sedimento mais contaminado encontra-se nos primeiros trinta centímetros, correspondendo ao habitat dos bivalves. Na Europa não é conhecida tanta diversidade de bivalves de água doce e poucos estudos foram realizados até agora. No entanto, sabe-se que desde 1900, as populações de *Margaritifera margaritifera* e *Unio crassus* diminuíram cerca de 90% devido às alterações substanciais no seu habitat, essencialmente devido aos impactos ambientais, originados essencialmente pelo Homem (BAUER 1988; BOGAN 1993). A Revolução Industrial trouxe com ela o progresso mas também a fonte de degradação dos cursos de água, nomeadamente através da introdução de elementos extremamente tóxicos, como são, por exemplo, os metais pesados. PANDOLFO *et al.* (2009) identificam o cobre como um dos tóxicos mais comuns encontrados nos sistemas aquáticos e salientam que os bivalves de água doce, nomeadamente as espécies pertencentes à família *Unionidae*, são dos mais sensíveis a este composto. No entanto, outros elementos, caso do cobalto, alumínio, níquel ou zinco também se manifestam extremamente perigosos para a fauna aquática e para a integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos. HAVLIK & MARKING (1987) designa o cobre como um dos metais pesados mais tóxico, seguido do zinco. PANDOLFO *et al.* (2009) refere também os efeitos sinérgicos decorrentes da interacção dos diversos factores resultantes da poluição química, exemplificando com o caso do aumento da temperatura que potencia a toxicidade do cobre, quando associados. Alguns parâmetros essenciais no bom funcionamento do sistema aquático, quando alterados podem revelar um elevado potencial tóxico, como é o caso do pH cuja acidez fomenta a solubilidade de muitos metais pesados. BEREZINA (1999), baseado em estudos

efectuados com várias espécies, indica ainda uma maior diversidade quando os valores do pH estão compreendidos entre 4,09 e 8,65.

As espécies da ordem *Unionoida* são muito utilizadas na monitorização da qualidade da água por serem excelentes bioindicadores. Segundo REIS (2006), a náide *Margaritifera margaritifera* filtra por dia 50 litros de água e consegue sobreviver em locais com mais de 700 indivíduos por metro quadrado. MCIVOR (2004) salienta que os bivalves conseguem filtrar até meio litro de água por hora e num troço de água com 10 km removem 7 a 30% da matéria suspensa no ecossistema aquático. Os bivalves diminuem a quantidade de clorofila *a* e de matéria sólida suspensa, contribuindo de forma natural para a depuração dos ecossistemas aquáticos (VAUGHN & HAKENKAMP 2001).

Os bivalves de água doce são um grupo heterogéneo constituído pelas ordens Veneroida (esferídeos) e Unionoida (náides), sem relação evolutiva directa entre elas e com um papel fundamental muito das vezes ignorado ou esquecido (REIS 2006). Em Portugal, a ordem Unionoida é representada pelas famílias *Unionidae* e *Margaritiferidae*. A ordem Unionoida é exclusiva do meio dulçaquícola ocorrendo em rios, lagos ou lagoas e prefere habitats de fundos moles com águas calmas, podendo também ser encontradas em fundos de gravilha e zonas de corrente. São geralmente de grande dimensão e de considerável longevidade. Possuem características únicas por parasitarem a íctiofauna, através de uma larva denominada de gloquídeo, de modo a garantirem a sua sobrevivência. As espécies pertencentes a esta ordem apresentam polimorfismo pois adquirem formas distintas consoante o meio em que se inserem. Este polimorfismo pode representar a principal origem de uma sucinta descrição de novas espécies que não são mais do que variedades morfológicas de uma só. Segundo REIS (2006), a diversidade das espécies pertencentes ao género *Anodonta* na Península Ibérica está relacionada com a sua colonização pelo facto destas serem mais semelhantes às espécies da Europa Central e de África do Norte do que entre si. REIS (2010) acrescenta que nos Pirenéus, as várias bacias formadas durante o período Terciário e o isolamento do maciço Bético-rifenho levaram à diferenciação destas espécies, provocada pelo seu isolamento. O conhecimento de um antigo registo fóssil aumenta significativamente o interesse biológico depositado nesta espécie. Alguns autores consideram a sua origem no Paleozóico, há mais de 350 milhões de anos. O primeiro trabalho dedicado às náides data de 1845, realizado por Morelet que identificou 13 espécies em Portugal das quais 8 foram consideradas novas para a ciência. Considerou-se também durante muito tempo que os sinónimos correspondiam à espécie *Anodonta cygnea*. No entanto, diferenças consideráveis existentes entre *Anodonta anatina* e *Anodonta cygnea* levaram à conclusão que a

maioria são na realidade variações de *A. anatina*. Esta pode ser dióica ou hermafrodita dependendo de processos determinados por níveis de hormonas que variam com factores internos e influências exteriores (REIS 2006).

3.1.1. Anatomia

A espécie *A. anatina* é polimórfica, dotada de uma concha frágil de cor negra ou parda, por vezes verde (Figura 3.1). REIS (2006) descreve-a como um bivalve que pode adquirir grandes dimensões (até 15 cm) consoante o habitat em que se encontra. Apresenta uma forma sólida e de silhueta extremamente variável, desde quase circular ou rombóide até alongada, sendo mais frequentemente oval. O bordo dorsal é geralmente recto, com um ângulo obtuso muito pronunciado na parte posterior, dando à concha uma forma de cunha. Possui um umbo geralmente bem pronunciado, visível quando se observa a superfície interna da concha. O seu ligamento é mais marcado e predominante do que o da *A. cygnea*. O seu bordo ventral é geralmente curvo ou recto desenhando, neste 2º caso, os lados de um triângulo: um anterior que ascende até ao vértice da ala e um posterior que descende bruscamente. É caracterizada por um umbo plano e largo, mais saliente do que a *A. cygnea*. A escultura do umbo quando presente é sempre mais ondulada, concêntrica e pequena não alcançando os bordos da concha. As papilas do sifão inalante são de forma cónica e distribuídas em várias filas. Os juvenis são geralmente mais achatados e apresentam franjas radiais mais claras. Tal como o seu nome indica, a *Anodonta anatina* não possui dentes na charneira. A idade dos bivalves é determinada pelas linhas de crescimento, considerando a formação de um anel num Inverno (ALDRIDGE 1998). O ciclo de vida reprodutivo dos bivalves poderá ser afectado pela maturidade e as taxas de crescimento. No caso das *Anodonta anatina* são caracterizadas por um crescimento irregular, de aproximadamente vinte milímetros no primeiro ano, até um máximo de cinco centímetros nos dez primeiros anos, trata-se de um crescimento exponencial (ALDRIDGE 1998).



Figura 3.1- Aspecto do Almeijão-de-rio, *Anodonta anatina*

Este bivalve possui gónadas responsáveis pela espermatogénese – produção de gâmetas masculinos e pela ovogénese – produção de gâmetas femininos e uma região intestinal na qual encontramos o cristalino (impulsiona os alimentos até ao estômago), o estômago e o intestino, que não é mais que um canal onde circulam as pseudofezes (alimento não catalisado pelo bivalve libertado posteriormente no curso de água) (Figuras 3.2 e 3.3).

Apresentam ainda uma região mais escura designada por hepatopâncreas e todos estes órgãos estão envolvidos por um tecido rijo e musculado que formam o pé do organismo (WILBUR 1983; REIS 2010).

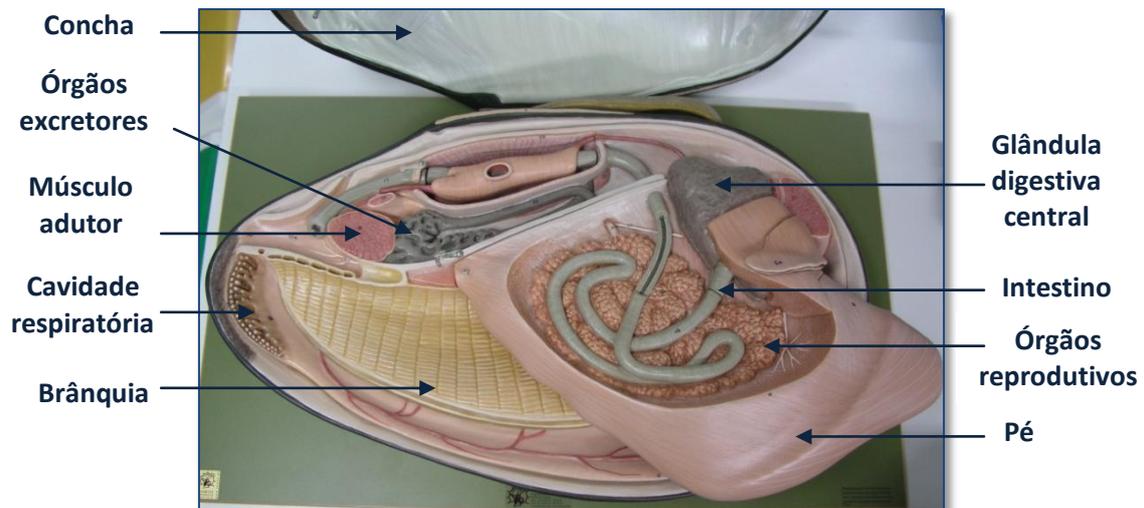


Figura 3.2- Modelo anatómico de *Anodonta anatina*

São compostos por duas brânquias largas ligadas à concha, uma de cada lado do pé, muito similares na maioria dos bivalves e cada uma delas formada por duas lamelas.

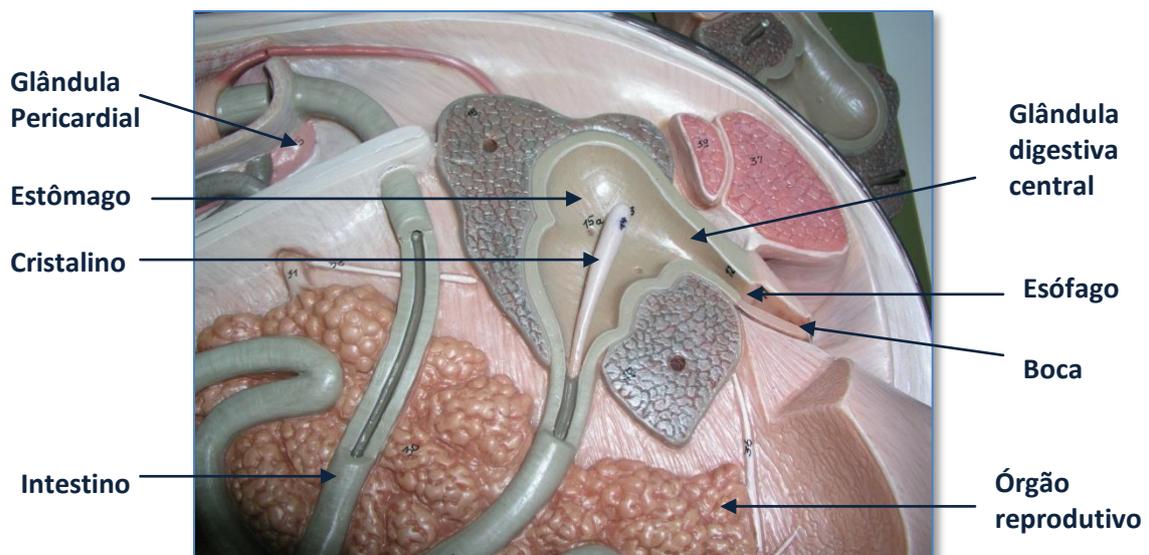


Figura 3.3- Modelo anatómico de *Anodonta anatina*, sem a parte do pé.

As brânquias estão divididas em septos e num sistema de tubos de água, nas lamelas exteriores, designadas também por marsupiais, onde se acumulam e desenvolvem os gloquídeos (WILBUR 1983; REIS 2010). Têm um papel importante na extracção do oxigénio da água, na alimentação e na reprodução do bivalve. A água atravessa a brânquia e sai do bivalve por um sifão exalante. No que diz respeito à alimentação, o facto de serem filtradores permite-lhes retirar do curso de água o fitoplâncton necessário à sua alimentação, envolvendo-o num muco e transportando-o até à sua boca. Para além destas funções, as brânquias acumulam micropérolas (carbonato de cálcio) que estão na origem da formação da concha dos gloquídeos (MACHADO 1989; LOPES-LIMA 2007).

3.1.2. Ciclo de vida

Os bivalves não possuem verdadeiros órgãos reprodutores, modificam parte de um órgão para se reproduzirem. Um dos casos mais curiosos ocorre nas famílias *Unionidae* e *Margaritiferidae*, em que o pé e as brânquias desempenham essa função. A fecundação e o crescimento dos gloquídeos dá-se nos ductos das brânquias, onde ficam até atingirem o estado de maturação e serem lançados para o meio aquático (REIS 2010). Os gloquídeos possuem a mesma forma que os adultos mas com um tamanho bem mais reduzido (200 a 350 μm), possuindo uma cor vermelha a amarelada. Para além do tamanho, as rugosidades presentes na parte dorso-ventral das conchas formando um retículo são a única forma de os diferenciar.

No ciclo de vida da espécie *Anodonta anatina* os gloquídeos mantêm-se na brânquia durante todo o inverno. Factores como o pH, a salinidade, a disponibilidade de alimento e a temperatura condicionam o ciclo reprodutor desta espécie (BEREZINA 1999; REIS 2010). As brânquias possuem uma grande elasticidade para conseguirem reter uma quantidade enorme de gloquídeos. Os gloquídeos são revestidos por um material viscoso e elástico que lhes confere protecção e alimento (WILBUR 1983; REIS 2010). A quantidade de ovos produzidos é função do comprimento do bivalve (ALDRIDGE 1998). Na família dos *Unionidae*, podem-se encontrar gloquídeos nas duas lamelas de cada brânquia (indivíduos tetragénicos) ou, como é o caso da *Anodonta anatina*, apenas numa das lamelas (indivíduos endogénicos), assinalando uma das estratégias de sobrevivência utilizada pela espécie. No caso de indivíduos dióicos, as fêmeas inalam os espermatozóides libertados no curso de água pelos machos permitindo fertilizar os ovos situados nos tubos de água das brânquias. Nas espécies hermafroditas, a ovogénese e a espermatogénese podem ocorrer nas gónadas do mesmo bivalve apresentando folículos femininos e masculinos.

Apesar de não existirem estudos precisos sobre a fase parasitária do gloquídeo no peixe hospedeiro (Figura 3.4), sabemos que este se fixa na sua barbatana e/ou brânquia através de um gancho forte presente na extremidade da concha, enquistando-se após 48 horas, em média. Este período é essencial para garantir a viabilidade dos gloquídeos, caso contrário, estes são desintegrados na corrente sanguínea do peixe que, de seguida, cria imunidade (REIS 2010). Os peixes reagem à presença deste corpo estranho produzindo e envolvendo-os com epitélio conferindo-lhes protecção, nutrição (através da sua corrente sanguínea) e locomoção (aumenta a dispersão de uma espécie com muito pouca capacidade de locomoção). A sua sobrevivência, após chegarem ao estado juvenil e libertarem-se do seu peixe hospedeiro, depende de inúmeros factores, tal como o substrato onde se encontram, as condições do curso de água, a possível existência de predadores e a quantidade de alimento disponível (VAUGHN & HAKENKAMP 2001; REIS 2006).

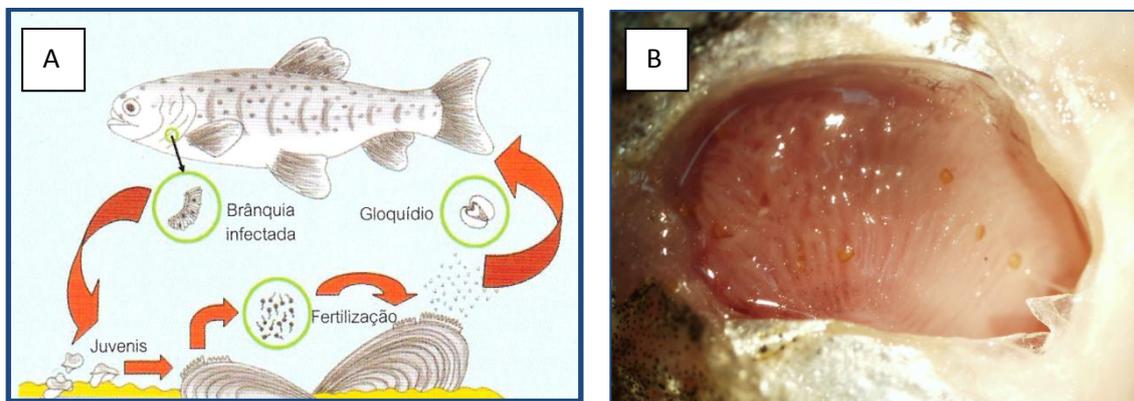


Figura 3.4- A) Ciclo de vida das náíades (adaptado de Reis, 2006); B) brânquia com gloquídeos após infestação.

Os bivalves não possuem todos a mesma espécie de peixe hospedeiro, alguns são específicos, aumentando por tal motivo o risco de extinção da espécie. Segundo a bibliografia existente, são conhecidos os seguintes peixes hospedeiros de *Anodonta anatina*: *Barbus graellsii* Steindachner, *Chondrostoma miegii* Steindachner, *Salaria fluviatilis* (Asso), *Gobio gobio* (L.), *Squalius pyrenaicus* (Günther), *S. cephalus* (L.), *Perca fluviatilis* L., *Gymncephalus cernuus* L., *Puntius tetrazona* e uma larva de salamandra *Ambystoma tigrinum* Green (REIS 2010).

A idade dos bivalves é determinada a partir das suas linhas de crescimento (ALDRIDGE 1998; REIS 2006). É geralmente aceite que um anel se forme num inverno (ALDRIDGE 1998). A longevidade e o tamanho máximo de um bivalve poderá afectar o tempo de reprodução, por sua vez, o ciclo de vida reprodutivo poderá ser afectado pela maturidade e as taxas de crescimento (ALDRIDGE 1998).

3.1.3. Conservação

A perda de biodiversidade induz perdas incalculáveis, sendo do interesse humano preservá-la através de estratégias de conservação que implicam conhecimentos aprofundados da bio-ecologia das espécies ameaçadas. Relativamente ao grupo faunístico dos bivalves, um dos mais ameaçados no planeta, são vários os factores que estão na origem da sua diminuição e mesmo extinção, estando muitas vezes directamente ligados ao ciclo de vida das espécies (BOGAN 1993). Por exemplo, para as espécies da família *Unionidae*, a sobrevivência e longevidade depende grandemente da fase crítica associada ao seu ciclo reprodutor. De facto, estas espécies dependem directamente dos peixes hospedeiros que viabilizam o processo de infestação dos gloquídeos, dado que estas larvas têm vida parasitária obrigatória.

As alterações climáticas (e.g. secas prolongadas, cheias), são seguramente um dos factores que tem contribuído para a redução das populações de náíades. Contudo, a acção antropogénica, com a exploração abusiva dos cursos de água conduziu à degradação da qualidade química e orgânica (excesso de sedimentação e diminuição do teor de oxigénio) da água, reduzindo drasticamente a quantidade de peixes hospedeiros e, conseqüentemente, as espécies de bivalves. As indústrias foram durante muitos anos as principais causas de degradação da qualidade dos cursos de água. A esta lista de ameaças, podem-se acrescentar as espécies exóticas que competem directamente com as espécies nativas, geralmente menos resistentes. Muitas das vezes, são também potenciados pela regularização, com a criação de ambientes modificados resultante da brusca passagem do regime lótico para lêntico (VAUGHN & TAYLOR 1999).

No caso dos *Unionidae*, as estratégias de conservação deverão contemplar a minimização dos impactos e a recuperação do seu habitat, pelo reforço dos efectivos de peixes hospedeiros. Por outro lado, poder-se-á, em casos pontuais, desenvolver uma conservação “ex-situ” com a criação de juvenis em cativeiro e o conseqüente repovoamento dos cursos de água entretanto reabilitados. As estratégias de conservação deverão no futuro ser aliadas a um conhecimento da bio-ecologia das espécies a nível local de modo a poder definir as medidas mais adequadas à protecção das espécies e, inclusive, requerer um estatuto de conservação em termos de legislação abrangendo não só espécies como também populações ameaçadas (REIS 2010).

Objectivos

Com este trabalho pretendeu-se aprofundar o conhecimento de diferentes aspectos do ciclo de vida de uma espécie de bivalve de água doce, o almeijão-de-rio (*Anodonta anatina* L.), com o intuito de, no futuro, avaliar e prever estratégias adequadas de conservação. Especial ênfase foi dada ao:

- 1) Ciclo reprodutor da espécie, nomeadamente na identificação dos peixes hospedeiros das populações do Norte de Portugal. Para tal, o processo de infestação e acompanhamento até à libertação dos primeiros juvenis foi reproduzido em laboratório;
- 2) Impacto das alterações das condições ambientais na sobrevivência das larvas de *A. anatina*, decorrente da entrada de metais pesados no meio aquático.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Caracterização da área de estudo

As populações de *Anodonta anatina* estão distribuídas pelos sectores médios e finais dos principais afluentes do rio Douro em território português, nomeadamente pelos rios Sabor, Tua e Tâmega (Figura 3.5).

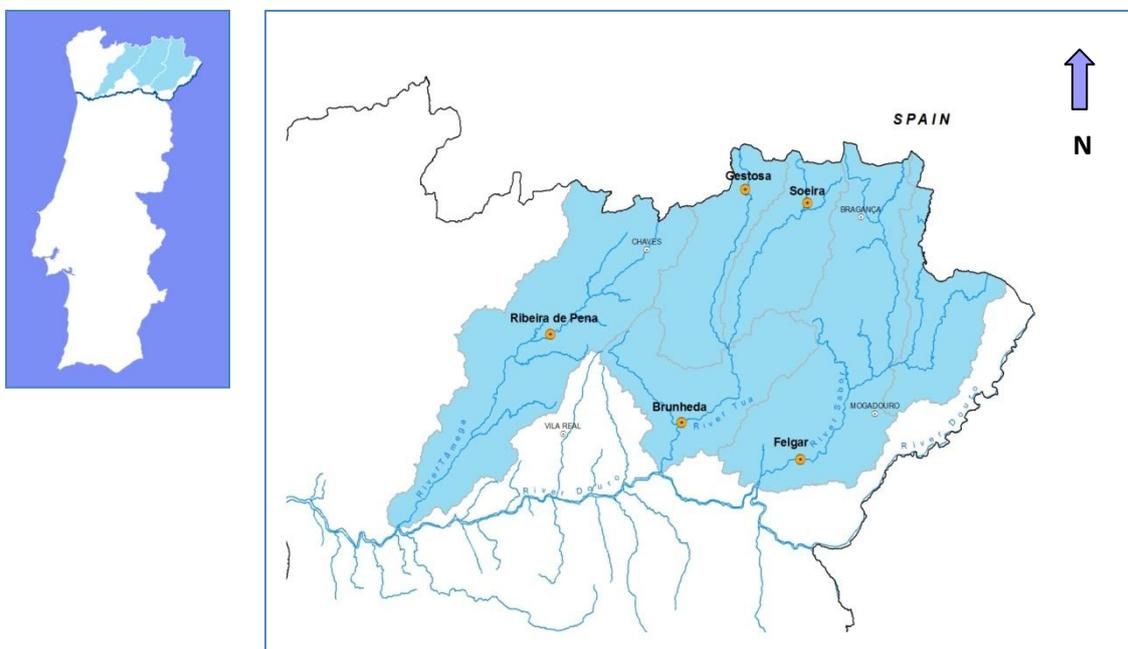


Figura 3.5- Bacias hidrográficas dos rios Tâmega, Tua e Sabor, afluentes do rio Douro.

No início do século XX, os rios Sabor, Tua e Tâmega apresentavam boas condições ecológicas, sem sinais de perturbações acentuadas e povoados por uma fauna diversificada. Ao longo do rio, os salmonídeos como a truta (*Salmo trutta*) podiam ser encontrados na cabeceira, enquanto nos troços situados mais a jusante ocorriam ciprinídeos, como o escalo (*Squalius carolitertii*), o bordalo (*Squalius alburnoides*), a boga-do-norte (*Pseudochondrostoma duriense*), o ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*) e o barbo (*Luciobarbus bocagei*). Destaque ainda para o registo doutras espécies, caso do esturção (*Acipenser sturio*) e de migradores diádromos como o salmão (*Salmo salar*) e a enguia (*Anguilla anguilla*), actualmente extintos na bacia do Douro. As pressões de origem antropogénicas deste último século exercidas sobre estes rios (e.g. construção de barragens e aumento contínuo da poluição) levaram a uma perda e fragmentação do habitat. Inclusive, em muitos troços o rio perdeu o carácter oligotrófico para assumir um status eutrófico, com consequências inevitáveis sobre as espécies de peixes e, por conseguinte, sobre as espécies de bivalves de água doce. As populações de *Anodonta anatina* (das mais abundantes em Portugal) têm vindo a demonstrar uma maior resistência a condições de eutrofização, embora estejam cada vez mais ameaçadas, face ao agravamento das condições ambientais.

3.2.2. Metodologia

Em cada experiência, foram seleccionados seis exemplares de *Anodonta anatina*, que foram transportados para o laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar num recipiente térmico com água e armazenadas em tanques de 40 L. Todos os tanques foram equipados com arejamento e os bivalves alimentados com microalgas até ao seu processamento. Na selecção dos indivíduos, entreabriu-se delicadamente a concha tendo sido escolhidos apenas os indivíduos que apresentassem brânquias inchadas, indício da presença de gloquídeos.

As espécies de peixes, autóctones e exóticos, presentes nos rios do Norte de Portugal, foram capturadas através de pesca eléctrica (aparelho portátil Hans Grassl ELT, com *output* de corrente contínua, 300-600V). Foi usada a metodologia definida no Manual para a Avaliação Biológica da Qualidade da Água em Sistemas Fluviais segundo a Directiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola (INAG 2008). Houve ainda o cuidado de capturar os exemplares piscícolas em locais de amostragem onde não ocorresse a espécie em estudo, *Anodonta anatina*, prevenindo qualquer situação de imunidade prévia. As espécies usadas no estudo foram a truta-de-rio (*Salmo trutta*), a truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*), o góbio (*Gobio lozanoi*), o verdemã-do-sul (*Cobitis paludica*), a boga (*Pseudochondrostoma duriense*), o escalo (*Squalius carolitertii*), o bordalo (*Squalis alburnoides*), o ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*), o barbo (*Luciobarbus bocagei*), a enguia (*Anguilla anguilla*) e o achigã (*Micropterus salmoides*).

Para perceber o ciclo reprodutor de *Anodonta anatina*, foram sacrificados mensalmente, de Fevereiro de 2010 a Novembro de 2010, vários exemplares de modo a:

- 1) analisar o processo de gametogénese, através de cortes histológicos tratados e observados ao microscópio ;
- 2) observar a formação de gloquídeos nas brânquias, através de microscopia electrónica de transmissão.

As observações destes cortes permitiu determinar a altura mais propícia para a realização do processo de infestação.

3.2.2.1. Observação da gametogénese e formação de gloquídeos nas brânquias

O material recolhido foi fixado em *Bouin* para garantir a preservação dos tecidos até ao seu processamento. As amostras foram desidratadas com diferentes álcoois através do processador Citadel 2000 e incluídas em parafina em suporte de cassetes na mesa de inclusão SHADON HISTOCENTRE 2. Por fim, os cortes foram realizados num micrótomo e a montagem em lâmina foi feita com DPX (Figuras 3.6 a 3.8).



Figura 3.6- Equipamento Citadel 2000



Figura 3.7- Mesa de inclusão em parafina SHADON HISTOCENTRE 2



Figura 3.8- Amostras de brânquia ou gónada e moldes usados para a inclusão em parafina.

3.2.2.2. Processo de infestação

Foram recolhidos gloquídeos das brânquias de *A. anatina*, verificando previamente a sua viabilidade com uma solução saturada de *NaCl*. Os animais sacrificados foram também usados para a observação da gametogénese. No processo de infestação, colocaram-se conjuntamente num recipiente com água e oxigenação artificial, os gloquídeos e todos os peixes envolvidos no estudo, durante um período aproximado

de 30 min. Posteriormente, as espécies foram separadas e mantidas em aquários até finalizar o período de formação dos juvenis de *A. anatina* (Figuras 3.9 e 3.10).

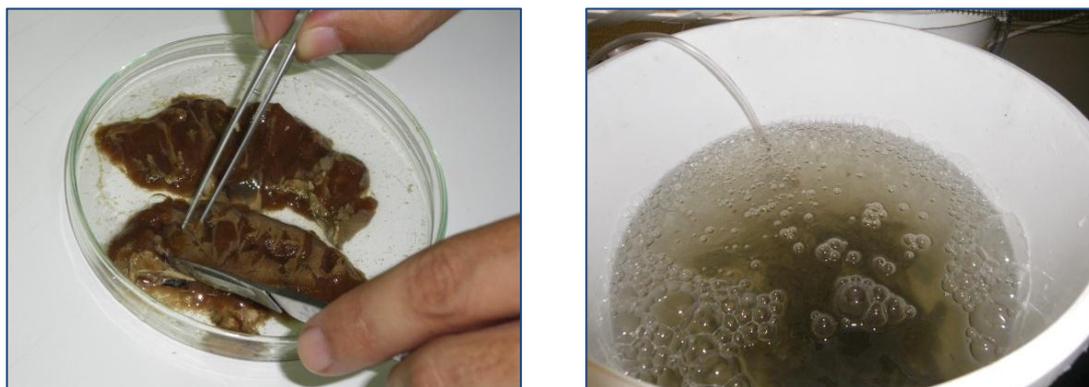


Figura 3.9- A) Brânquia seccionada para recolha dos gloquídeos para a infestação; B) Processo de infestação (peixes em contacto com os gloquídeos)



Figura 3.10- Tanques utilizados no processo de infestação.

No estudo da metamorfose dos gloquídeos para juvenis, realizados quer nas brânquias quer nas barbatanas, foi utilizado o barbo, um peixe hospedeiro já conhecido da espécie. O procedimento da infestação foi repetido mantendo-os num tanque de 300 L. Foi sacrificado um peixe de forma sequencial de acordo com a seguinte periodicidade: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 24; 48 horas. Removeu-se uma amostra de brânquia e de barbatana para realização de SEM (scanning electron microscopy) e observação ao microscópio óptico. Para a observação em SEM, as amostras de brânquia e barbatanas foram preservadas numa solução de 2% de gluteraldeído e num tampão de cacodilato, com pH de 7,4 por 24 horas a 4°C. Após lavagem com o tampão e uma pós-fixação com ósmio a 2% numa solução tampão, as amostras foram

desidratadas em séries de etanol graduadas de 5% a 100%. Para a observação no microscópio óptico, as amostras foram fixadas com uma solução de **Bouin** e desidratados com séries de etanol desde 5% a 100%, seguido da colocação em xilol e parafina. Os blocos de parafina foram de seguida seccionados em cortes com uma espessura de 5-8 μm e corados com **Hemalumen** (ácido, cora os núcleos de roxo) e **Eosina** (básico, cora o citoplasma de rosa claro). Os cortes foram observados e fotografados com um microscópio *Olympus BX71* equipado com câmara digital DP70 (Anexos I e II).

3.2.2.3. Teste de toxicidade com cobre (**CuCl**) e cobalto (**CoCl**)

Com o objectivo de estudar a toxicidade de metais pesados como o cobre e o cobalto, usaram-se gloquídeos bem activos, tendo sido repartidos, em média, 20 indivíduos por poço em duas caixas de seis poços contendo um fundo de água destilada. As caixas foram colocadas numa câmara de incubação, para garantia de condições assépticas. Foram testados diferentes níveis de toxicidade (0,2 g/L; 0,02 g/l e 0,002 g/L) em função do tempo de exposição (0; 6; 24; 48 e 72 horas) registando a mortalidade nos gloquídeos, salvaguardando sempre um controlo para fins comparativos (Quadro 3.1).

Quadro 3.1- Disposição das caixas consoante diluição do tóxico

Caixa 1		1	2	3
g/L	A	0,2	0,2	0,2
	B	0,02	0,02	0,02

Caixa 2		1	2	3
g/L	A	0,002	0,002	0,002
	B	Controlo	Controlo	Controlo

Após cada intervalo de tempo, a mortalidade dos gloquídeos foi determinada acrescentando uma gota de solução saturada de NaCl, sendo observado (microscópio estereoscópico *Olympus*) e registado os gloquídeos vivos através do movimento das valvas.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Processo de gametogênese

Nas figuras 3.11 a 3.13 é possível visualizar diferentes fases da gametogênese em *A. anatina*, mediante a observação ao microscópio óptico de cortes da gônada.

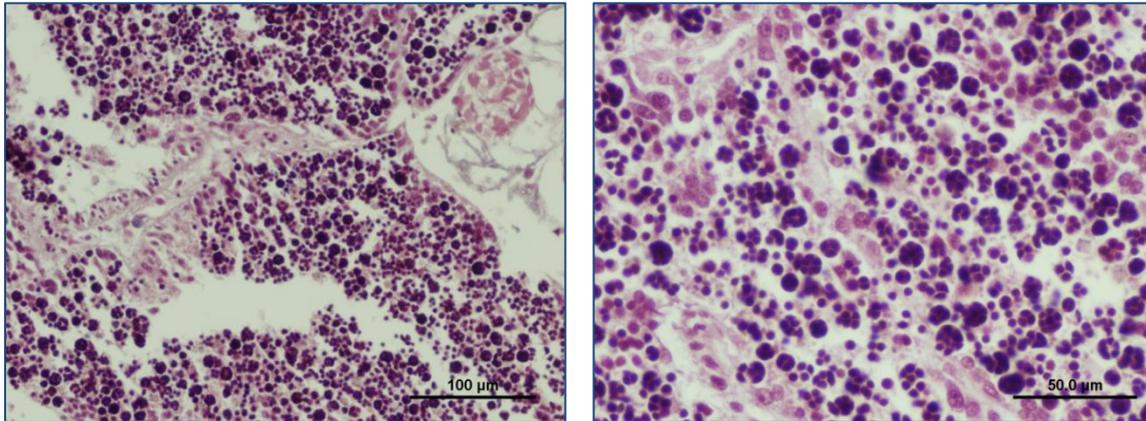


Figura 3.11- Mórulas espermáticas em desenvolvimento (Fevereiro 2010).

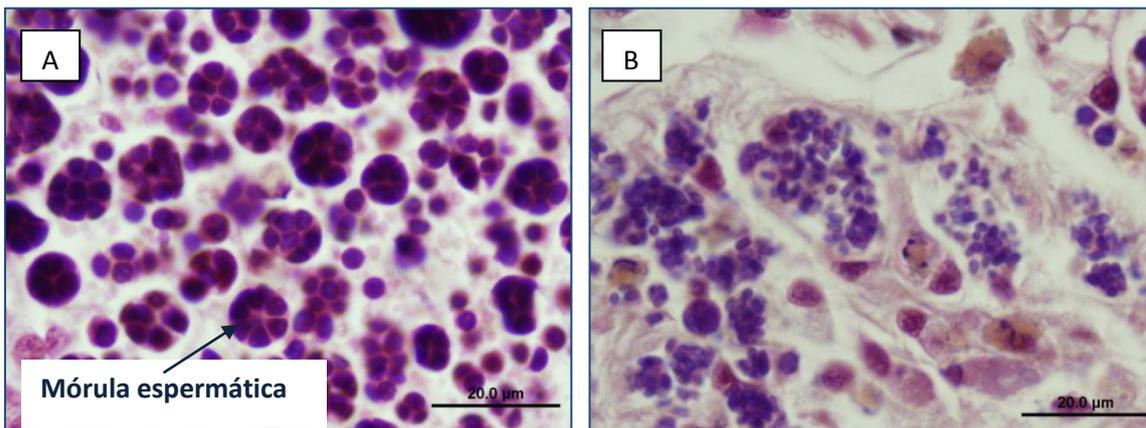


Figura 3.12- A) Corte masculino com mórulas espermáticas bem desenvolvidas em que algumas já libertaram os espermatídios; B) Corte masculino com espermatídios livres.

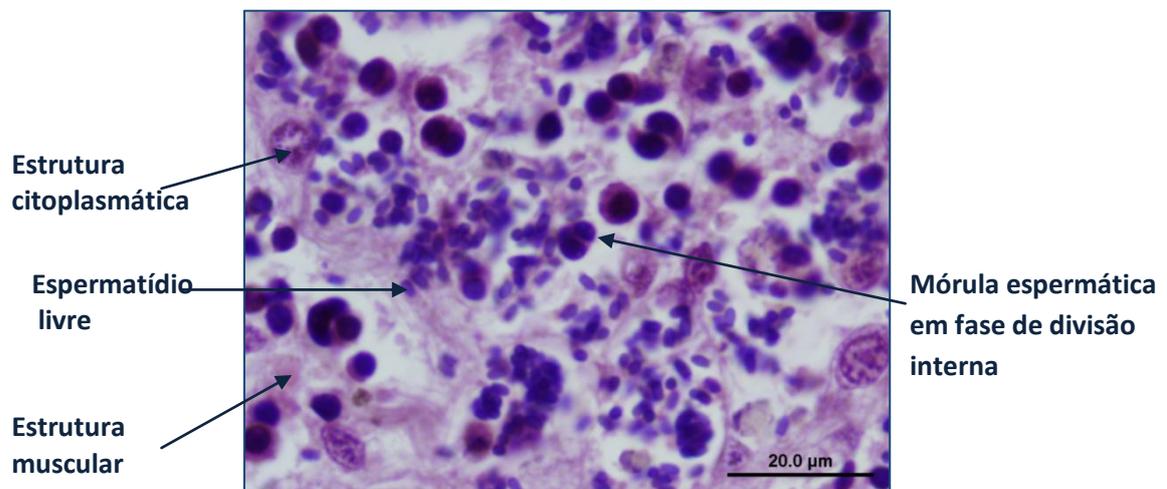


Figura 3.13- Corte masculino com espermatídeos livres e mórulas maduras em fase de libertação (Março 2010).

3.3.2. Processo de ovogénese

Por sua vez, nas figuras 3.14 e 3.15 é possível visualizar o processo de ovogénese em *A. anatina*, mediante a observação ao microscópio óptico de cortes da gónada.

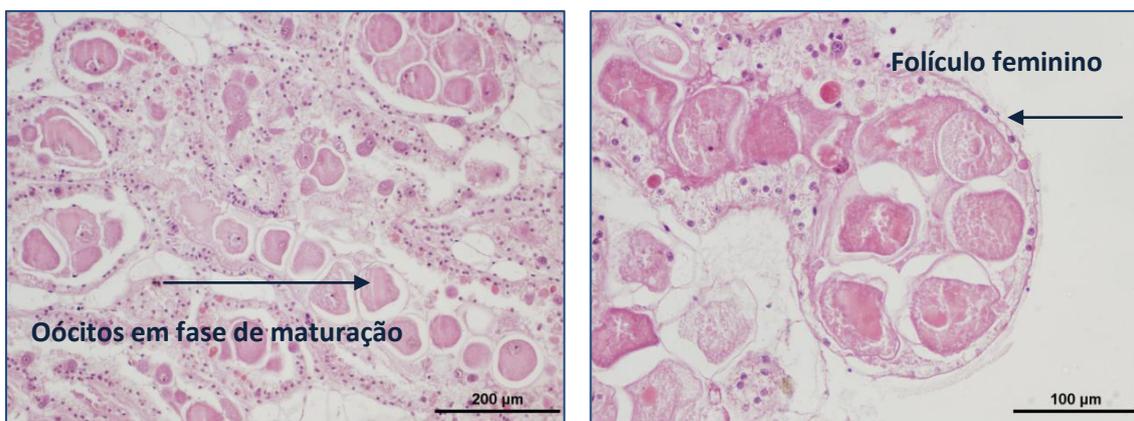


Figura 3.14- Corte feminino com oócitos em fase de maturação (Abril 2010).

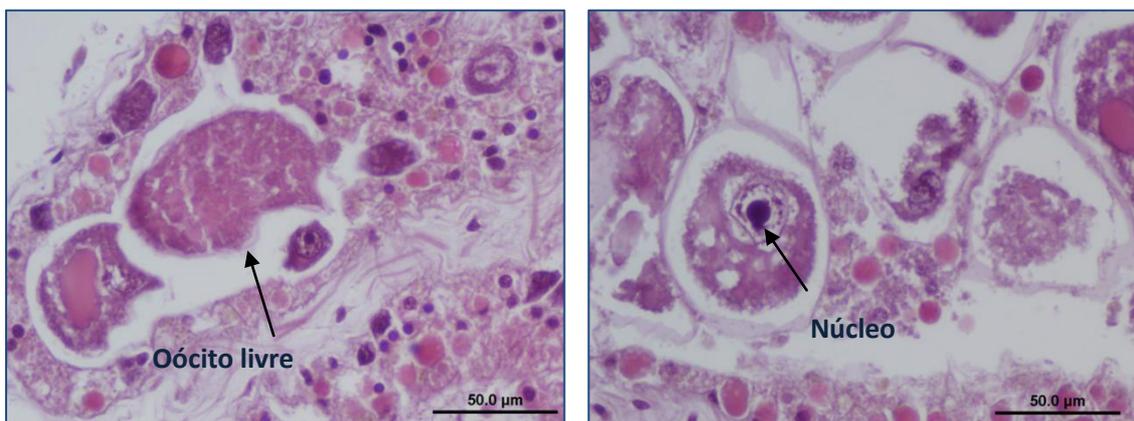


Figura 3.15- Cortes de gónada do mês de Abril apresentando folículos femininos com oócitos desenvolvidos observados a diferentes ampliações no microscópio óptico.

Com base nos resultados obtidos através dos cortes estudados (Figuras 3.11 a 3.15), identificou-se a maior quantidade de gâmetas maduras no período de Fevereiro a Junho. O mês de Setembro destacou-se como o início de um novo ciclo, com a presença de muito músculo nos cortes. Assim sendo, o processo da ovogénese decorre essencialmente na primavera e verão, com temperaturas da água amenas. Observamos uma relação directa entre a presença de músculo no corte e a gametogénese, de facto, os cortes dominados por músculo correspondiam aos meses em que os gâmetas se apresentavam pouco maduros.

3.3.3. Gametogênese em indivíduos hermafroditas

Foi observada a gametogênese em indivíduos hermafroditas, com a presença de espermátides e oócitos livres (Figuras 3.16 e 3.17).

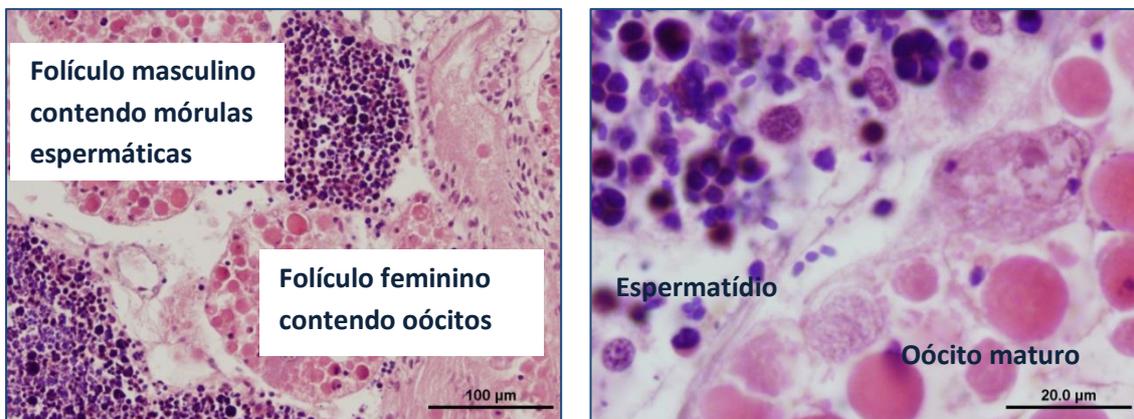


Figura 3.16- Corte com folículos masculinos e femininos separados em fase de maturação indicando a ocorrência de hermafroditismo (Abril 2010).

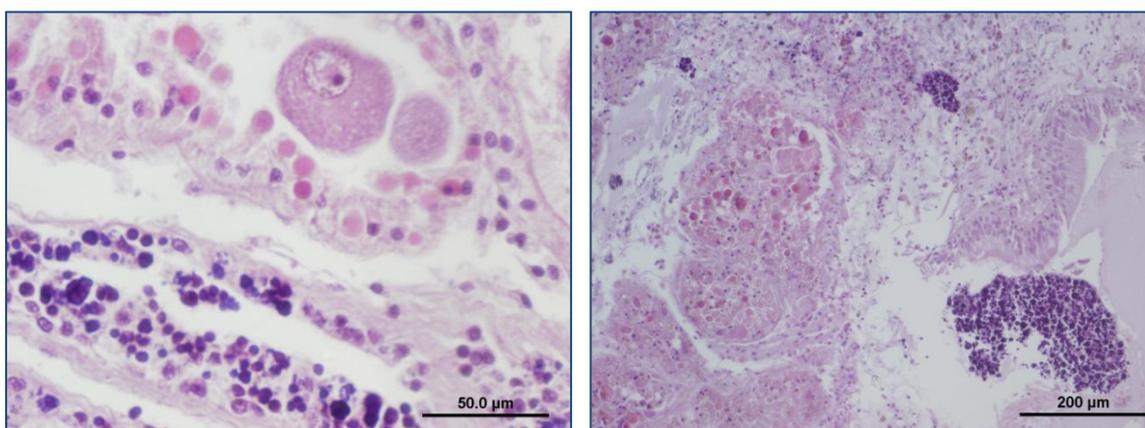


Figura 3.17- Corte hermafrodita com mórulas maduras e espermatídios livres. Presença de oócitos livres e outros em fase de maturação (Abril 2010).

Todos os indivíduos hermafroditas observados apresentavam separação dos folículos, não tendo encontrado em nenhum caso oócitos e mórulas espermáticas no mesmo folículo. Nem todos os indivíduos se encontravam no mesmo estado de maturação.

ALDRIDGE (1998) identifica o período reprodutivo da *Anodonta anatina* em Janeiro, Fevereiro, Março, Agosto, Setembro, Outubro, Novembro e Dezembro. No caso de GIUSTI (1975), os gâmetas mais maduros aparecem em Julho, Agosto, Setembro e Outubro. O declínio inicia-se no mês de Novembro, retomando actividade em Janeiro. Apesar de não ter sido seguida esta tendência, foi confirmado o período de reprodução da espécie nos meses com temperaturas menos adversas. Este mesmo autor explica este facto pela dependência do ciclo reprodutor da espécie às condições ambientais e à disponibilidade de peixes hospedeiros.

3.3.4. Variação mensal

Entre os meses de Fevereiro e Novembro de 2010, apenas se encontraram casos de indivíduos hermafroditas em Abril e Junho, não podendo excluir-se a sua presença nos restantes meses, visto que se trata de uma amostra aleatória com relativamente poucos exemplares analisados. Paralelamente, foram amostrados, de forma geral, mais exemplares de *Anodonta anatina* masculinos do que femininos, com exclusão do mês de Abril, no qual não foi encontrado qualquer exemplar (Figura 3.18).

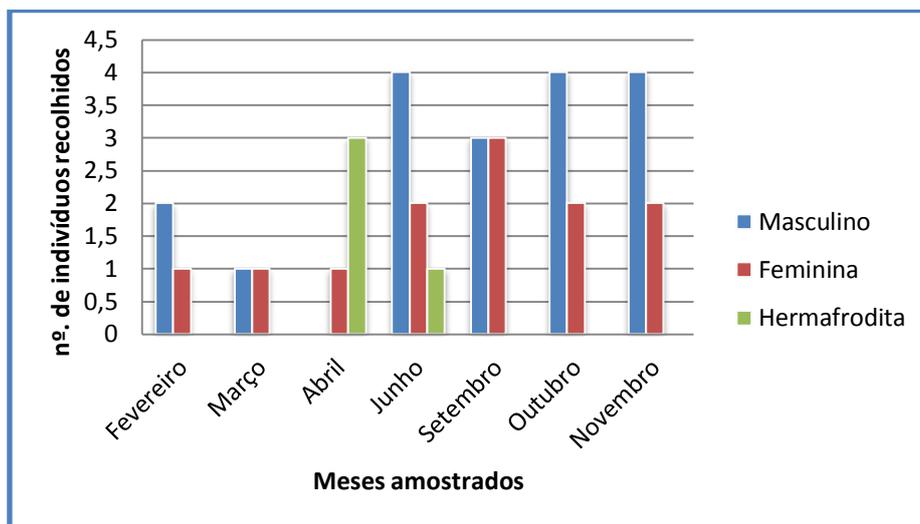


Figura 3.18- Quantificação mensal dos sexos de *Anodonta anatina*.

3.3.5. Observação dos gloquídeos nas brânquias

O processo de formação dos gloquídeos nas brânquias pode ser acompanhado ao longo das figuras 3.19 a 3.21.

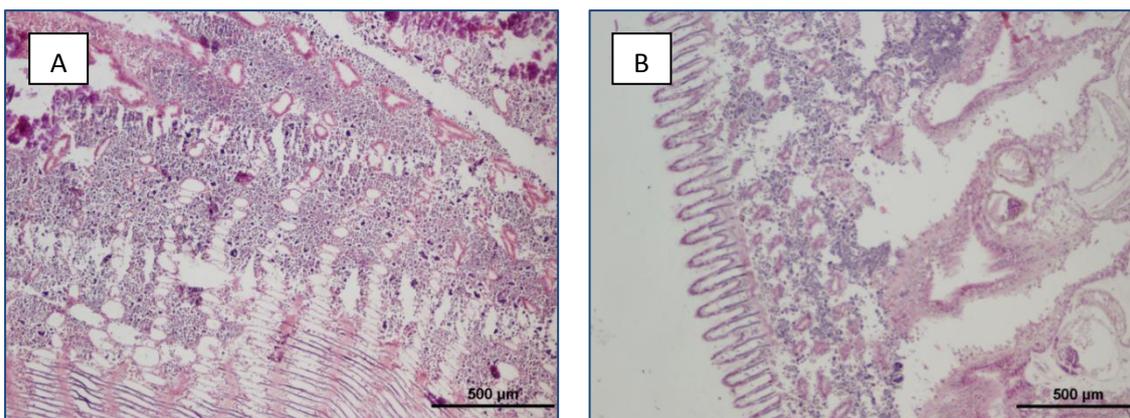


Figura 3.19- A) Corte sem gloquídeos com presença de numerosas concreções (coloração mais escura). B) Corte com inúmeras concreções na parte mais superficial da brânquia e presença de gloquídeos no restante.

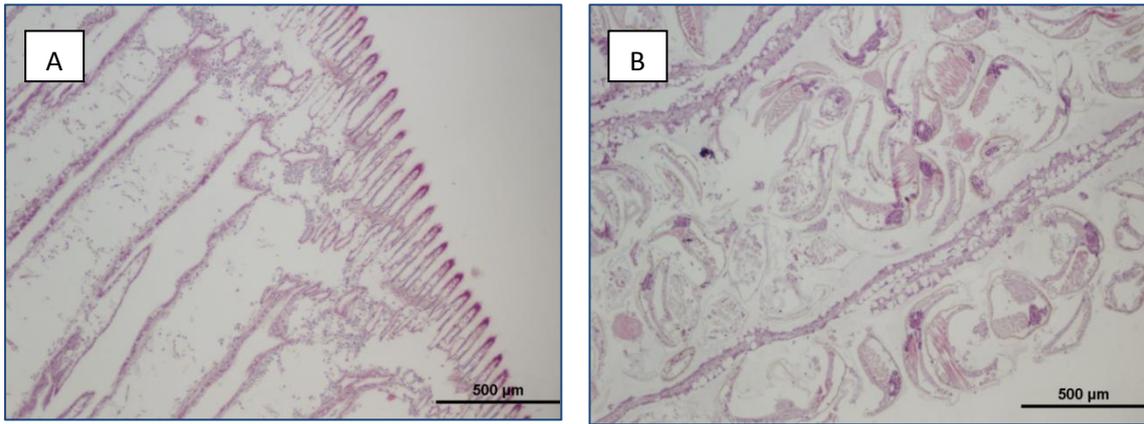


Figura 3.20- A) Brânquia com ductos de água vazios induzindo que os gloquídeos já foram libertados; B) Brânquia com ductos de água dilatados cheios de gloquídeos.

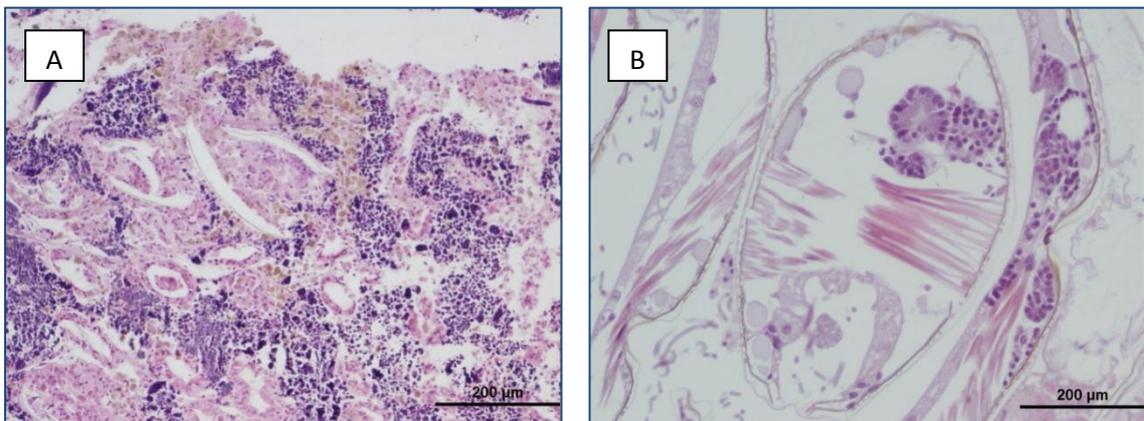


Figura 3.21- A) Corte de brânquia com numerosas concreções e com o início de formação de gloquídeos; B) Corte de brânquia com formação de gloquídeos.

As concreções presentes na brânquia acompanham o aparecimento de gloquídeos em que vão desaparecendo desde o interior para o exterior desta. Observou-se uma tendência para o desaparecimento de concreções à volta de gloquídeos já formados. No caso das brânquias, verificou-se uma relação directa entre as concreções e a formação dos gloquídeos. Segundo MACHADO (1989) as concreções são compostas por carbonato de cálcio, elemento fundamental na formação da concha. Observou-se uma tendência para um desaparecimento destas concreções do interior da brânquia para o exterior (parte mais superficial) como se o carbonato de cálcio estivesse a ser consumido na formação dos gloquídeos que seguiriam a mesma direcção de migração.

3.3.6. Determinação dos peixes hospedeiros

As experiências realizadas em Fevereiro e Março de 2010, mostraram os gloquídeos extremamente activos (*i.e.* no seu auge de maturação), confirmado pela intensa actividade quando adicionada uma gota de solução saturada de *NaCl*. No processo de infestação os gloquídeos fixaram-se preferencialmente nas guelras e barbatanas dos peixes (Figura 3.22).

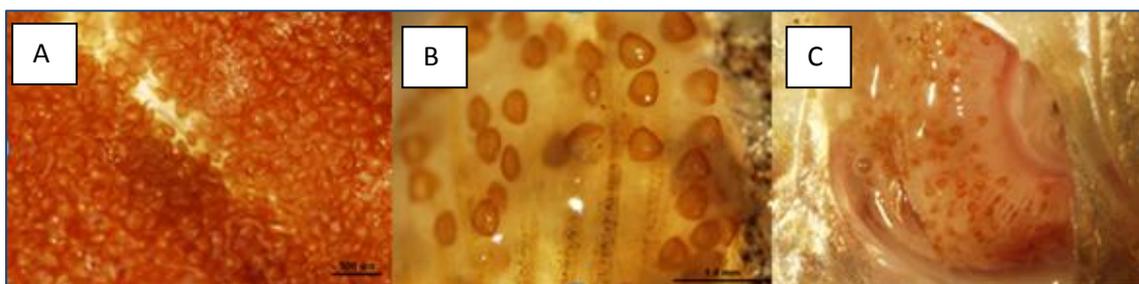


Figura 3.22- A) Gloquídeos de *A. anatina* antes da infestação; B) Gloquídeos presentes na barbatana de peixes; C) Gloquídeos presentes na brânquia dos peixes.

Os resultados obtidos demonstraram que, a infestação no góbio e achigã, duas espécies exóticas, teve sucesso limitado, dado que os gloquídeos rapidamente se soltaram. De facto, para o achigã, as larvas do bivalve soltaram-se após um período de 24 horas, inviabilizando-se o enquistamento e subsequente transformação em juvenis (Figura 3.23). Por sua vez, a boga revelou-se como a espécie com taxa superior de infestação, embora tal facto não seja sinónimo de maiores taxas de transformação de larvas para juvenis de *A. anatina* (Figura 3.24).

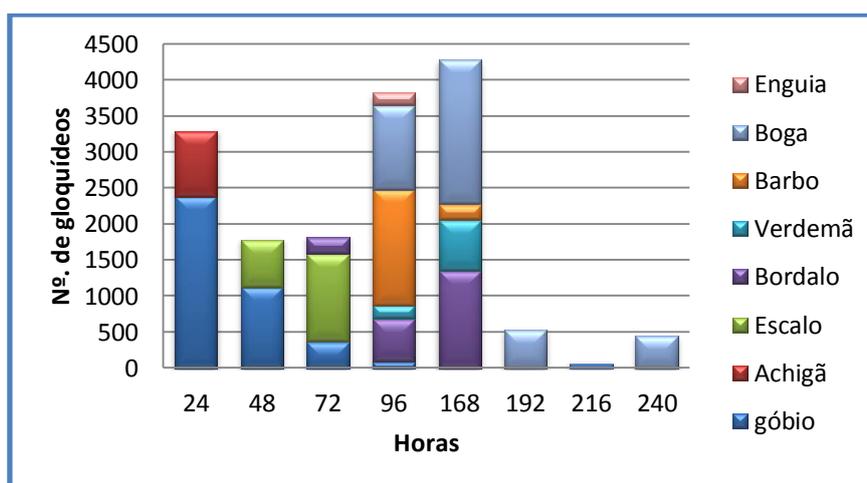


Figura 3.23- Quantificação dos gloquídeos presentes nas barbatanas e brânquias dos peixes (Fevereiro 2010).

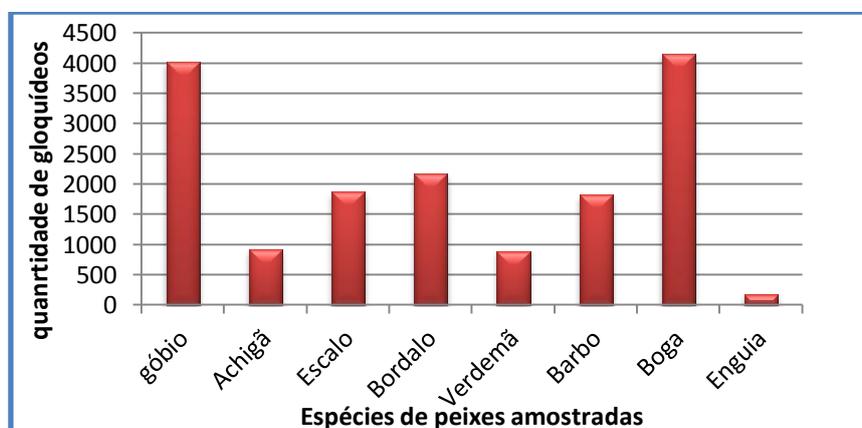


Figura 3.24- Número total de gloquídeos presentes nas brânquias e nas barbatanas dos peixes (Fevereiro 2010).

Realce para o facto dos gloquídeos de *Anodonta anatina* terem enquistado e transformado em juvenis para todas as espécies piscícolas nativas (Quadro 3.2). As melhores taxas de transformação couberam ao escaló e à truta-de-rio, respectivamente com 16,4 e 16,5 juvenis por peixe.

Quadro 3.2- Resultados da infestação de peixes com gloquídeos de *A. anatina*.

	Juvenis	N	Réplica	Média (juv. /peixe)	Metam. (dias)	Temp. média (°C)	Dias grau
Nativas							
<i>A. oligolepis</i>	71	18(9)	3	7,9	16-23	19,0 ± 0,9	347 ± 42
<i>C. paludica</i> *	3	12(6)	2	0,5	16-20	19,7 ± 1,7	341 ± 50
<i>L. bocagei</i>	32	18(8)	3	4,0	13-17	18,1 ± 1,5	231 ± 19
<i>P. duriense</i>	93	18(9)	3	10,3	7-20	19,5 ± 5,1	196 ± 40
<i>S. trutta</i>	99	6(6)	1	16,5	22-24	15,0 ± 3,5	331 ± 5
<i>S. alburnoides</i>	204	18(16)	3	12,8	16-23	16,6 ± 1,6	311 ± 8
<i>S. carolitertii</i>	115	17(7)	3	16,4	12-23	19,0 ± 1,2	301 ± 36
Introduzidas							
<i>C. carpio</i>	0	4	2	--	--	--	--
<i>G. lozanoi</i>	0	18(16)	3	--	--	--	--
<i>L. gibbosus</i>	0	18(18)	3	--	--	--	--
<i>M. salmoides</i>	0	5(4)	1	--	--	--	--
<i>O. mykiss</i>	75	6(6)	1	12,5	23-24	15,0 ± 3,5	3585

*espécie nativa do sul de Portugal

Por sua vez, o verdemã-do-sul (*Cobitis palúdica*), uma espécie introduzida nos rios do Norte de Portugal como isco na actividade da pesca desportiva, foi aquela onde ocorreram as menores taxas de transformação em juvenis. Registou-se ainda que apenas para a truta arco-íris, espécie exótica originária da América do Norte, se obteve sucesso na transformação de larvas para juvenis. Apesar do sucesso observado no processo de infestação e enquistamento para os restantes peixes exóticos, não foram obtidos quaisquer juvenis para estas espécies.

Relativamente à metamorfose dos gloquídeos, verificou-se que o tempo de transformação não depende unicamente da temperatura mas também da espécie piscícola em causa (Quadro 3.2). Assim, os resultados obtidos confirmaram que a boga e o barbo são as espécies onde ocorreram as taxas de transformação mais rápidas, i.e. 196 ± 40 e 231 ± 19 dias-grau, respectivamente, enquanto para o ruivaco, com 347 ± 42, e para o verdemã-do-sul, com 341 ± 50, o número de dias-grau foi superior.

No que respeita à preferência dos locais de infestação pelos gloquídeos de *A. anatina*, os dados obtidos revelaram uma similitude para ambas as espécies estudadas, caso do barbo e do góbio, correspondendo a diferença mais relevante à localização nas guelras dos peixes, *i.e.* *G. lozanoi* com 6,2% e *L. bocagei* com 13,2% (Quadro 3.3).

Quadro 3.3- Preferência dos locais de infestação pelos gloquídeos de *A. anatina*.

Localização	Percentagem de infestação por gloquídeos	
	<i>Gobio lozanoi</i>	<i>Luciobarbus bocagei</i>
Guelras	6,2	13,2
Barbatana Anal	8,2	6,1
Barbatana Dorsal	8,3	7,7
Barbatana Caudal	11,9	13,8
Barbatana Peitoral	44,4	40,0
Barbatana Pélvica	21,0	19,2

Uma análise mais pormenorizada ao processo de infestação permitiu verificar que a capacidade das larvas de *A. anatina* se fixarem ao peixe (neste estudo correspondente à espécie *Luciobarbus bocagei*), é superior nas primeiras horas (*i.e.* < 6 horas) a partir das quais decresce rapidamente (Figura 3.25).

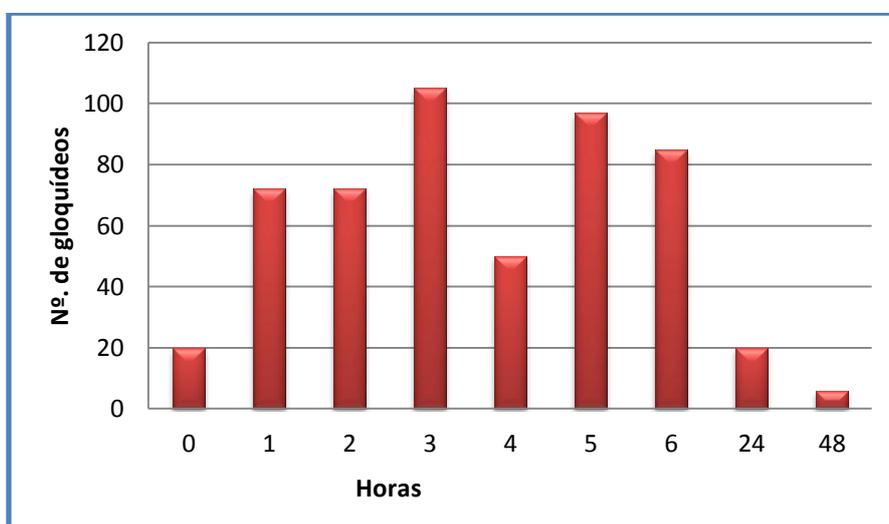


Figura 3.25- Quantificação do processo de infestação por gloquídeos no barbo.

3.3.7. Cultivo de juvenis de *Anodonta anatina*

O cultivo dos juvenis de *A. anatina*, realizado durante um período de 60 dias, permitiu observar algumas estruturas, como as brânquias e o pé expandido, e ainda outros detalhes importantes na formação do bivalve, conforme aparece ilustrado nas figuras 3.26 a 3.29.

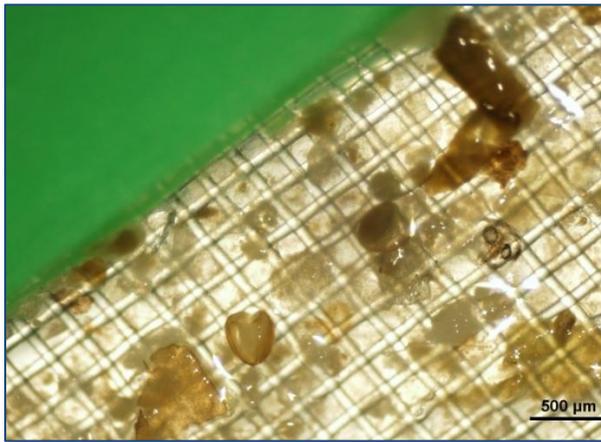


Figura 3.26- Juvenil de *A. anatina* obtido após processo de metamorfose em escalo.

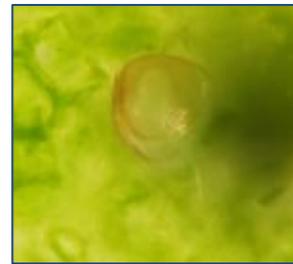
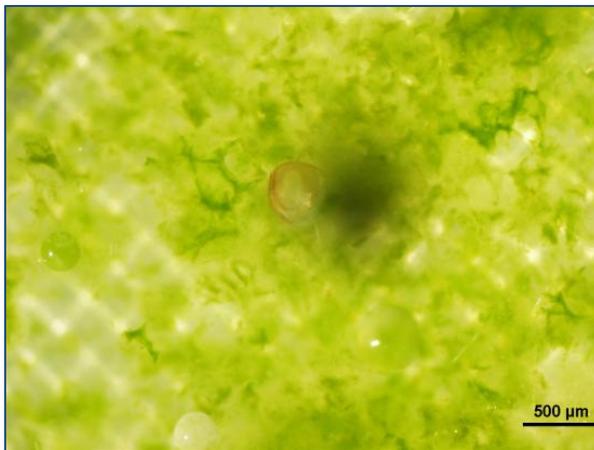


Figura 3.27- Juvenil de *A. anatina* observado no sistema de manutenção de juvenis no meio de microalgas que lhe servem de alimento.



Figura 3.28- A) Gloquídeo observado ao microscópio óptico (pormenor do gancho); B) Juvenil observado ao microscópio óptico (pormenor do pé).

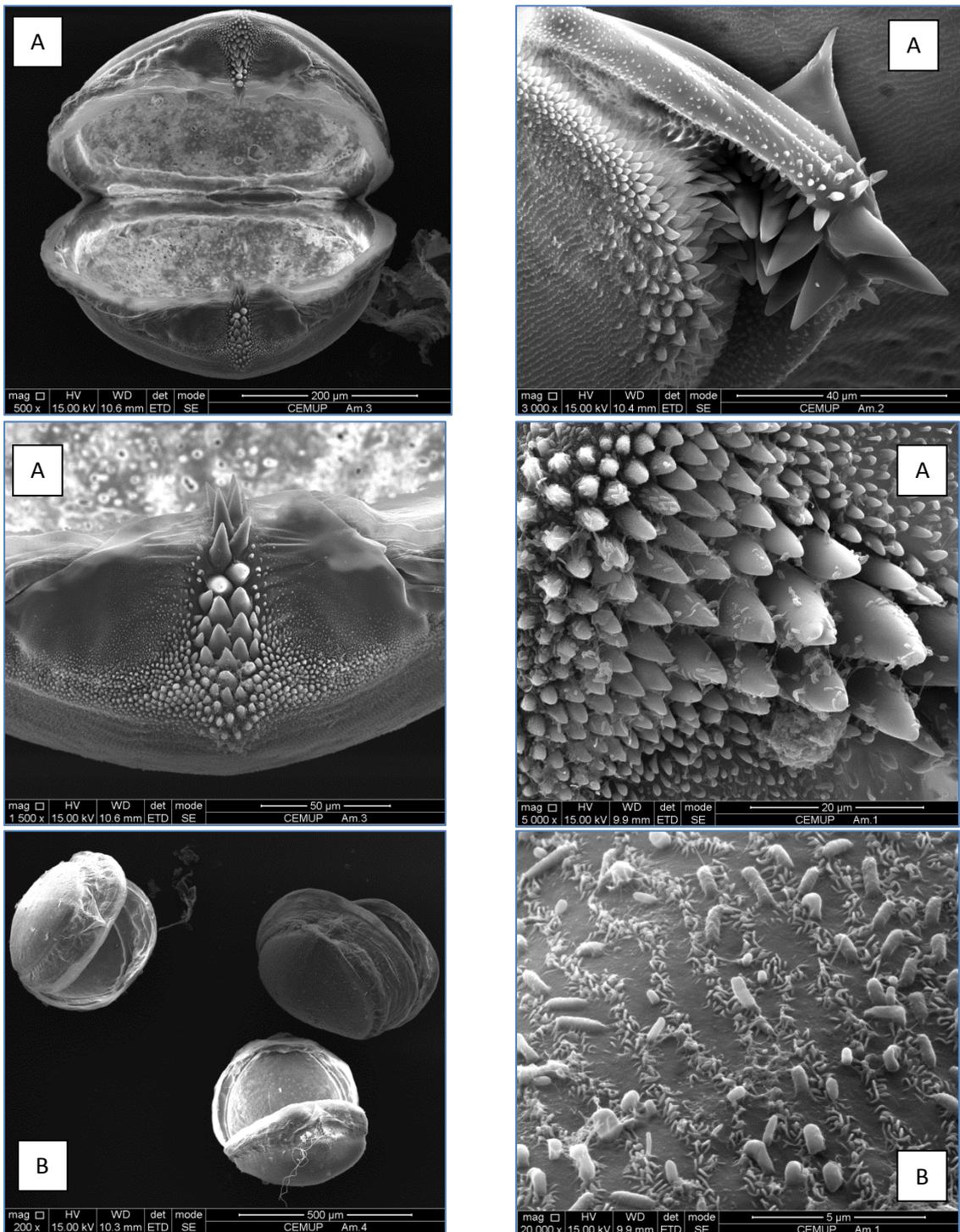


Figura 3.29- Pormenores observado ao microscópio electrónico de transmissão (SEM) para gloquídeos (A) e juvenis (B) de *Anodonta anatina*.

As figuras ilustram a complexidade do gancho dos gloquídeos de *Anodonta anatina* usado para se agarrarem aos peixes hospedeiros. Observa-se ainda a granulometria da concha de um juvenil, com pequenas saliências que conferem rugosidade à concha, muito provavelmente no intuito de uma melhor adesão ao substrato, complementando assim o papel do pé ainda em formação.

3.3.8. Bioensaios de toxicidade com gloquídeos de *A. anatina*

Os resultados obtidos demonstraram a elevada vulnerabilidade das larvas de *A. anatina* relativamente à presença de metais pesados, mesmo para concentrações muito baixas no meio aquático (Figuras 3.30 e 3.31).

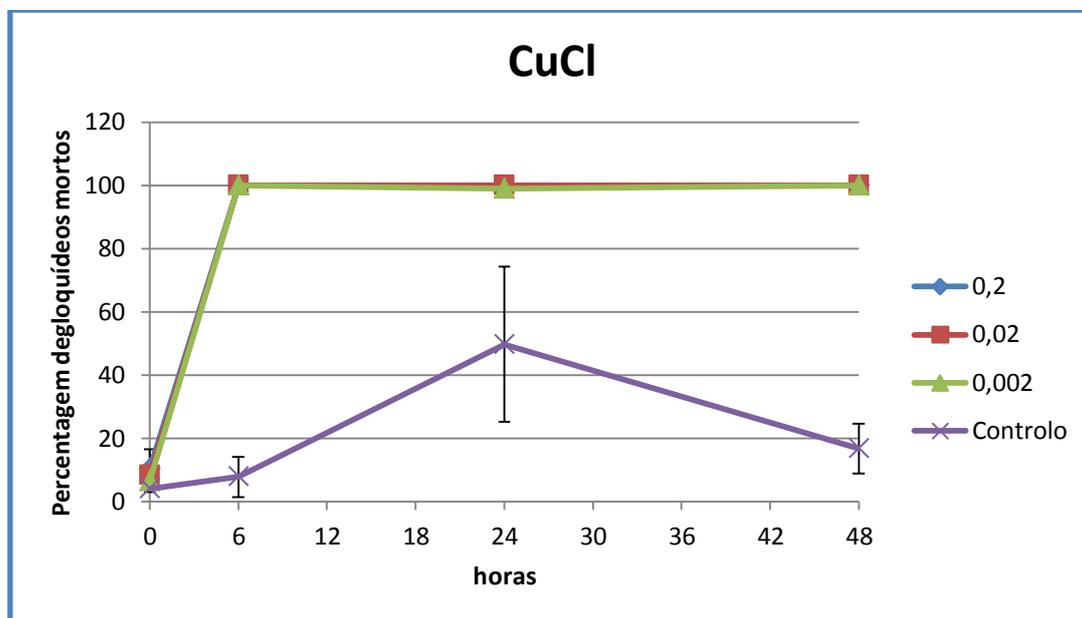


Figura 3.30- Toxicidade do cobre em gloquídeos de *Anodonta anatina*.

A mortalidade atingiu 100% para períodos de exposição superiores a 6 horas, tendo sido registada uma acção mais nefasta para a presença de cobre, mesmo para as concentrações mais diluídas (0,002 mg CuCl/L).

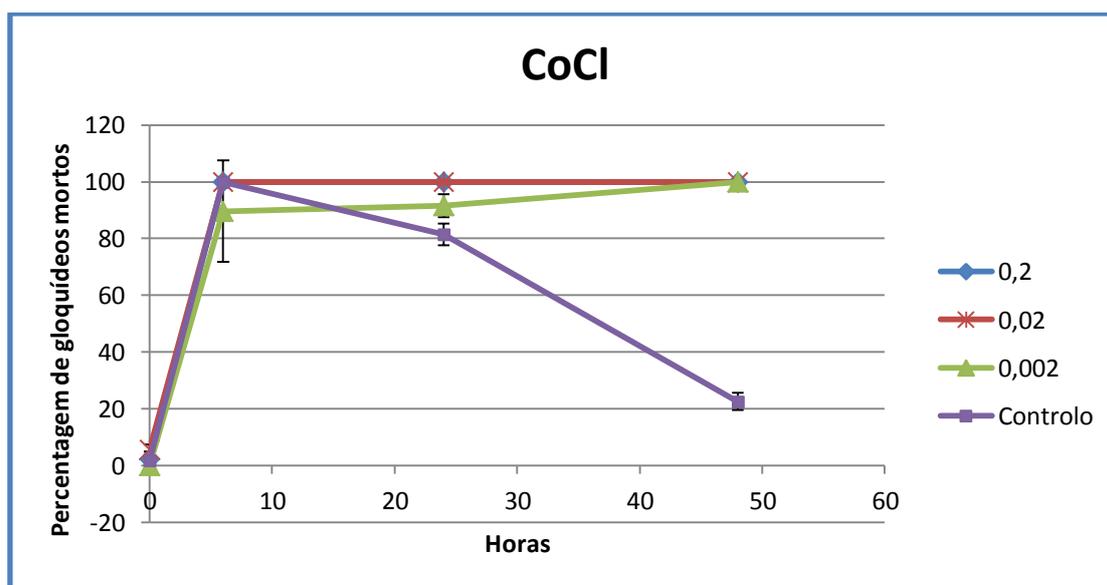


Figura 3.31- Toxicidade do cobalto em gloquídeos de *Anodonta anatina*.

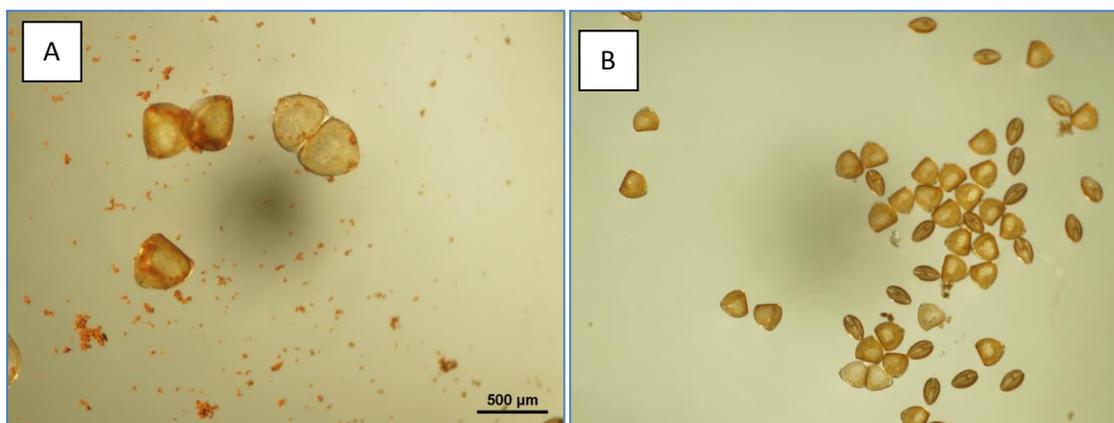


Figura 3.32- Ensaio de toxicidade nos larvas de *Anodonta anatina* com cobre (A) no tempo 0 com concentração de 2 g/L e com cobalto (B) no tempo 6 com concentração de 0,2 g/L.

Os resultados obtidos através dos ensaios de toxicidade revelaram o cobre como o elemento mais tóxico cujo efeito é mais visível por agregar-se à concha dos gloquídeos.

3.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu verificar que o almeijão de rio, *Anodonta anatina*, exibe uma grande selectividade relativamente aos peixes hospedeiros. De facto, a fauna piscícola nativa dos rios do Norte de Portugal pertencente às famílias dos salmonídeos, ciprinídeos e cobitídeos funcionaram, com maiores ou menores taxas de transformação, como espécies hospedeiras. Verificou-se que, com excepção da truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*), as espécies exóticas testadas não revelaram qualquer sucesso na produção de juvenis, apesar da elevada fixação dos gloquídeos, detectada durante o processo de infestação. Esta evidência reforça a necessidade de estabelecer medidas que visem a protecção integrada da fauna autóctone, nomeadamente das espécies de bivalves cada vez mais ameaçadas e dos peixes hospedeiros nativos. Os hábitos da maioria das espécies de salmonídeos e ciprinídeos, nomeadamente através das migrações potamódromas reprodutivas, são essenciais na dispersão das náíades, uma vez que promovem a colonização de novos habitats para montante. Estas tendências não são, contudo, observadas nas espécies alienígenas, que possuem comportamentos distintos, mais estacionários, caso da família Centrarchidae, cujas espécies mais representativas no nosso país são a perca-sol e o achigã, e que tendem a adquirir dominância e eliminar as espécies autóctones em ambientes modificados. Efectivamente, a regularização contínua dos sistemas lóticos, com a construção de pequenas e grandes barragens, tem vindo a potenciar o carácter invasor de espécies exóticas que se têm revelado altamente nefasto para a sobrevivência e reprodução das populações de náíades, outrora abundantes nestes

rios onde assumem uma função chave na depuração natural e funcionamento do ecossistema.

Como seria de esperar, as taxas de transformação dos gloquídeos estão correlacionadas positivamente com a temperatura, embora também estejam dependentes da associação específica com a espécie piscícola (REIS 2010). Por exemplo, a boga, *Pseudochondrostoma duriense*, foi a espécie que revelou a taxa de transformação mais rápida, com 196 ± 40 dias grau, enquanto a truta arco-íris, *Onchorynchus mykiss*, uma espécie exótica, foi a mais lenta com 358 ± 5 dias grau. Relativamente ao local preferencial no processo de infestação, ficou demonstrado pelo estudo efectuado que é a zona ventral dos peixes (*i.e.* barbatanas pélvicas e peitorais), comparativamente com outras (*i.e.* guelras e barbatanas dorsais) aquela onde ocorreram as taxas maiores de infestação e enquistamento. Tal situação pode ficar a dever-se a uma estratégia do género *Anodonta*, dado o peculiar modo de disseminação dos gloquídeos, através de filamentos de *mucus* expelidos pelo bivalve e mantidos em suspensão a partir da zona bentónica (WILBUR 1983).

Não é conhecida a relação entre a produção de gâmetas nas gónadas e a formação dos gloquídeos nas brânquias visto que os gloquídeos apresentaram um auge de actividade a partir do mês de Fevereiro enquanto a observação dos cortes ao microscópio, independentemente do sexo, demonstrou o mesmo período como sendo o início do desenvolvimento dos gâmetas nos seus respectivos folículos. A explicação deste facto pode, muito provavelmente, residir na capacidade de retenção das *Anodonta anatina* dos gloquídeos nas brânquias durante um longo período de tempo dando assim indícios de uma contínua actividade por parte das gónadas, cujo papel seria um abastecimento de forma contínuo das brânquias.

A elevada quantidade de gloquídeos armazenados nas brânquias demonstra uma baixa probabilidade de sucesso no processo de infestação, explicado pela sua dependência relativamente aos peixes hospedeiros específicos. No entanto, com o lançamento para o curso de água de uma grande quantidade de gloquídeos, a náide permite viabilizar a possibilidade de um peixe poder estar envolvido na metamorfose de vários gloquídeos em juvenis de vida livre. Normalmente, um peixe depois de infestado desenvolve imunidade, tornando inviável qualquer infestação subsequente.

Também a quantidade média de juvenis obtidos apenas serve de comparativo entre as espécies de peixes estudados, destacando-se nesta situação as bogas como os peixes hospedeiros onde se transformaram mais larvas em juvenis. De facto, numa situação real, a incidência de factores externos como o pH, a temperatura, a velocidade da corrente, a quantidade de peixe disponível, entre outros, não permite o estabelecimento de valores médios.

Nem todos os indivíduos capturados no meio selvagem, num dado momento, apresentaram o mesmo grau de desenvolvimento dos órgãos reprodutores, podendo representar uma estratégia de sobrevivência da espécie. O desfasamento dos estados de maturação entre indivíduos de sexos opostos poderá colocar em risco a compatibilidade entre os respectivos gâmetas, podendo até justificar o aparecimento de casos de hermafroditismo, identificados em alguns cortes das gónadas, especialmente nos meses de Abril e Junho. Esta situação pode expressar uma adaptação do género *Anodonta* a perturbações que possam colocar em risco o seu processo de fecundação. A separação dos folículos indicia também uma maior adaptabilidade, tendo sido detectado estruturas femininas mais desenvolvidas do que as masculinas.

Este estudo permitiu ainda determinar o impacto que potencialmente poderá ter acontecido pela poluição química ocorrida em 2009, resultante do colapso e entrada duma grande quantidade de sedimentos contendo metais pesados, no troço de cabeceira do rio Sabor. Conforme comprovou o estudo, baixíssimas concentrações de cobre e o cobalto (dois dos metais cuja concentração atingiu valores elevados) foram suficientes para eliminar completamente (100%) as larvas de *A. anatina* no primeiro intervalo da experiência. Este tipo de perturbações poderá ter ocorrido ao longo do eixo longitudinal do rio Sabor, com a ocorrência de impactos significativos ao nível dos organismos mais sensíveis ou em fases ontogénicas precoces, mais susceptíveis à contaminação por resíduos mineiros. Segundo NAIMO (1995), os órgãos mais afectados pelos metais pesados são o manto e as brânquias. Provavelmente, apesar da diluição e imobilização nos sedimentos de grande parte dos tóxicos incorporados no meio aquático, a concentração existente é seguramente motivo de preocupação pela capacidade de bioacumulação que os bivalves possuem. Paralelamente, destaque ainda para a possibilidade dos fenómenos de toxicidade poderem ter sido amplificados pela transferência dos contaminantes ao longo da cadeia alimentar.

Como conclusão, foi determinado por este estudo que *A. anatina* usa as espécies piscícolas nativas como os principais hospedeiros no processo de metamorfose (larva para juvenil) e dispersão e sofrerá não somente pelo impacto directo da construção de barragens como também pelo desaparecimento das espécies piscícolas resultantes das alterações subitamente ocorridas derivadas da transformação de ambientes lóticos em lênticos.

3.5. BIBLIOGRAFIA

- ALDRIDGE D.C. 1998. The morphology, growth and reproduction of unionidae (Bivalvia) in a Fenland waterway. Department of Zoology, University of Cambridge, Cambridge.
- BAUER G. 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. In Central Europe. *Biological Conservation* 45, 239 - 253.
- BEREZINA N.A. 1999. Influence of Ambient pH on Freshwater Invertebrates under Experimental Conditions. *Russian Journal of Ecology*, pp. 372-381.
- BOGAN A.E. 1993. Freshwater bivalve extinctions (Mollusca: Unionoida): a search for causes. *American Zoologist* 33, 599 - 609.
- DIRECTIVA 2000/60/CE DO PARLAMENTO EUROPEU e do CONSELHO, 23 de Outubro de 2000.
- GIUSTI F., CASTAGNOLO L., MORETTIFARINA L. & RENZONI A. 1975. The reproductive cycle and the glochidium of *Anodonta cygnea* L. from Lago Trasimeno (Central Italy). *Monitore Zool.* 9: 99-118
- HAVLIK M.E. & MARKING L.L. 1987. Effects of Contaminants on Naiad Mollusks (Unionidae): A Review. *Resource publication*, Washington.
- INAG I.P. 2008 Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segunda a Directiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola. Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.
- LOPES-LIMA M., LOPES A., CASACA P., CEACA A., MACHADO J. 2007. Seasonal correlation of pH, pCO₂, pO₂, HCO₃ and Ca²⁺ with acidosis/ calcification in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem Physiol B* 178B(1): 17-25.
- MACHADO J. 1989. *Estudos morfofuncionais da génese da concha de Anodonta Cygnea*. Tese de Doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Universidade do Porto, Porto.
- MCIVOR A.L. 2004. Freshwater Mussels as Biofilters. Tese de Doutoramento em Filosofia. Universidade de Cambridge, Cambridge.
- NAIMO T.J. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. In: *Ecotoxicology* 4: 341-362
- NEVES R.J., BOGAN A.E., WILLIAMS J.D., AHLSTEDT S.A. & HARTFIELD, P.W. 1997. *Status of aquatic mollusks in the Southeastern United States: A downward*

- spiral of diversity. In: Aquatic Fauna in Peril: The southeastern perspective*, editado por G.E. Benz e D.E. Collins. Decatur, Southeast Aquatic Research Institute, Special Publication 1, pp. 43-85
- PANDOLFO T., COPE W.G. & ARELLANO C. 2009. Thermal tolerance of juvenile freshwater mussels (*Unionidae*) under the added stress of copper. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 691-699.
- REIS J. (coord.) 2006. *Atlas dos bivalves de água-doce em Portugal continental*. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- REIS J. 2010. Systematics, Biology and Conservation of *Unio Tumidiformis* Castro, 1885 (Unionidae: Bivalvia) in the South-West of the Iberian Peninsula. Tese de Doutoramento em Biologia da Conservação - Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa. 273 pp.
- STRAYER D.L., DOWNING J.A., HAAG W.R., KING T.L., LAYZER J.B., NEWTON T.J. & NICHOLS S.J. 2004. Changing perspectives on pearl mussels, North America's most imperiled animals. *BioScience* 54 (5): 429 - 439.
- VAUGHN C.C. & TAYLOR C.M. 1999. Impoundments and the decline of freshwater mussels: A case study of an extinction gradient. *Conservation Biology* 13: 912-20.
- VAUGHN C.C. & HAKENKAMP C.C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 46: 1431 - 1446.
- WILBUR K.M. 1983. *The Mollusca*. 5ª edição, vol. 7. USA.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objectivo deste estudo passou pelo aprofundamento do conhecimento do ciclo de vida de uma espécie particular de bivalve de água doce, o almeijão de rio, cuja existência nos rios do Nordeste de Portugal poderá, a breve trecho, estar seriamente posta em causa. Especial ênfase foi dado a aspectos diferentes mas complementares da bio-ecologia e fisiologia desta espécie-alvo, *i.e.* *Anodonta anatina*, assim como dos potenciais impactos decorrentes por exemplo de situações de fenómenos de poluição química por metais pesados que, apesar de pontuais, estão também correlacionados com qualquer organismo vivo presente no meio aquático afectado. As principais conclusões do estudo realizado foram:

- 1) Relativamente ao **colapso das escombreyras das minas do Portelo**, assistiu-se à **eliminação completa da fauna macrobentónica do troço inicial** da ribeira. A alteração profunda em termos químicos, avalizada pelos valores obtidos pelos parâmetros pH (< 5), condutividade (> 200 µS/cm) e TDS (> 50 mg/L) e metais pesados (Al, Cu, Co) e em termos físicos, com a colmatção do canal e deposição de materiais finos margens provenientes da mina, estão na origem do desaparecimento dos organismos aquáticos;
- 2) **Não se verificaram para a escala temporal** observada (7 meses) **sinais evidente de recuperação** em termos da recolonização dos rios por parte da fauna bentónica. Em termos espaciais, o efeito de diluição, retenção e imobilização de compostos químicos poderá estar na base da menor mortalidades registada nos locais situados a jusante (> 20 km);
- 3) De qualquer forma, os impactos ecológicos e ambientais podem aparecer mascarados e pouco visíveis a curto prazo. Por exemplo, neste estudo verificaram-se **taxas de mortalidade de 100%**, mesmo para concentrações muito baixas **de metais pesados (e.g. Cu e Co), nos testes com larvas de *Anodonta anatina***, pertencente ao grupo faunístico dos bivalves de água doce, cujas funções de filtração no ecossistema para além duma capacidade de bioacumulação conhecida podem atribuir-lhe um estatuto de espécies-sentinela;
- 4) Para além dos impactos decorrentes da poluição, outro factor de ameaça para as populações de *Anodonta anatina* do Nordeste de Portugal consiste na construção de pequenos e grandes empreendimentos hidroeléctricos. Em Portugal multiplicam-se os projectos de regularização dos caudais para produção de energia e o Norte do país é uma das zonas privilegiadas para o

seu desenvolvimento. Os *impactos* podem ser diferenciados: **a) directos** pela alteração do habitat, seja pela sedimentação seja pela modificação das características físico-químicas da água, e **b) indirectos**, pela eliminação das espécies nativas piscícolas em ambientes modificados (e.g. albufeiras de barragens). Os estudos de determinação dos **peixes hospedeiros de *Anodonta anatina***, permitiram verificar que todos os peixes nativos testados (**truta, escalo, bordalo, boga, barbo, ruivaco e verdemã**) e apenas a **truta arco-íris**, dentro dos peixes exóticos, funcionaram como hospedeiros deste bivalve. As maiores taxas de transformação corresponderam ao escalo e à truta, enquanto os primeiros juvenis surgiram na boga e no barbo, para condições ambientais controladas (e.g. temperatura).

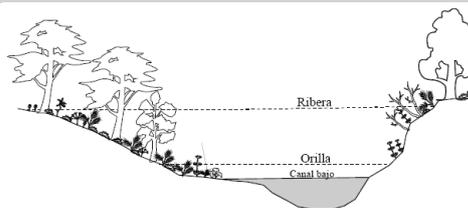
- 5) Relativamente à **reprodução em *A. anatina***, foram encontrados **exemplares dióicos e outros hermafroditas**, com separação dos folículos femininos e masculinos. Tal facto, pode resultar de uma adaptação a situações diferentes como o aumento do stress no habitat natural, falta de indivíduos de um determinado sexo, falta de comunicação dos gâmetas entre bivalves ou devido ao isolamento/ desaparecimento dos indivíduos. A **fase de maturação dos gloquídeos** corresponde ao **período de Fevereiro a Março**, estando presentes antes, mas sendo demasiados imaturos. No decorrer do mês de Março, foram observadas brânquias vazias indicando o fim de um ciclo e a preparação para o início de outro.
- 6) As ameaças que poderão no futuro contribuir para a extinção das náíades dos rios do Nordeste Transmontano, justificam a criação de medidas de conservação especificamente adaptadas às condicionantes ambientais nos locais onde ocorrem tais populações. Refira-se, no entanto, que o sucesso desta medidas só será eficaz quando realizado num quadro de sustentabilidade à escala do ecossistema.

ANEXOS (CAPÍTULO 2)

ANEXO I

ÍNDICE QBR: CLASSIFICAÇÃO DA ZONA RIBEIRINHA DE ECOSISTEMAS FLUVIAIS

- Esta classificação deve ser aplicada a toda a zona ribeirinha dos rios (margem e encostas propriamente dito). Zonas inundadas periodicamente pelas cheias e caudais máximos)
- Os cálculos serão realizados sobre a área que apresenta uma potencialidade de suportar uma massa vegetal nas encostas. Não se contemplam as zonas com substrato duro onde não é possível enraizar uma massa vegetal permanente.



A pontuação de cada um dos 4 blocos não pode ser negativa nem exceder os 25 pontos

Estação	
Classificação	

1 – Grau de cobertura da zona ribeirinha - Pontuação entre 0 e 25

Pontuação	
25	> 80% de cobertura vegetal da zona ribeirinha (as plantas anuais não se contabilizam)
10	50-80% de cobertura vegetal da zona ribeirinha
5	10-50% de cobertura vegetal da zona ribeirinha
0	< 10% de cobertura vegetal da zona ribeirinha
+10	Se a conectividade entre o bosque ribeirinho e o ecossistema florestal adjacente é total
+5	Se a conectividade entre o bosque ribeirinho e o ecossistema florestal adjacente é superior a 50%
-5	Se a conectividade entre o bosque ribeirinho e o ecossistema florestal adjacente é entre 25 e 50%
-10	Se a conectividade entre o bosque ribeirinho e o ecossistema florestal adjacente é inferior a 25%

2 – Estrutura da cobertura (contabiliza-se toda a zona ribeirinha) - Pontuação entre 0 e 25

Pontuação	
25	Cobertura de árvores superior a 75%
10	Cobertura de árvores entre 50 e 75% ou cobertura de árvores entre 25 e 50% e no resto da cobertura os arbustos superam os 25%
5	Cobertura de árvores inferior a 50% e o resto da cobertura com arbustos entre 10 e 25%
0	Sem árvores e arbustos abaixo dos 10%
+10	Se na margem a concentração de helófitos ou arbustos é superior a 50%
+5	Se na margem a concentração de helófitos ou arbustos é entre 25 e 50%
+5	Se existe uma boa conexão entre a zona de arbustos e árvores com um sub-bosque
-5	Se existe uma distribuição regular (linearidade) nos pés das árvores e o sub-bosque é > 50%
-5	Se as árvores e arbustos se distribuem em manchas, sem uma continuidade
-10	Se existe uma distribuição regular (linearidade) nos pés das árvores e o sub-bosque é < 50%

3 – Qualidade da cobertura vegetal (depende do tipo geomorfológico da zona ribeirinha*) - Pontuação (0 e 25)

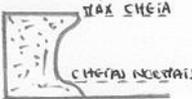
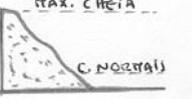
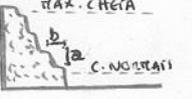
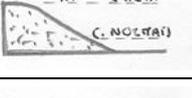
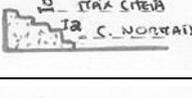
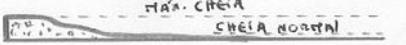
Pontuação		Tipo1	Tipo 2	Tipo 3
25	Número de espécies diferentes de árvores autóctones	> 1	> 2	> 3
10	Número de espécies diferentes de árvores autóctones	1	2	3
5	Número de espécies diferentes de árvores autóctones	-	1	1 - 2
0	Sem árvores autóctones			
+10	Se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio, uniforme e ocupando > 75% da zona ribeirinha (em toda a sua largura)			
+5	Se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio (entre 50 – 75% da zona ribeirinha)			
+5	Se existe uma disposição em galeria de diferentes comunidades			
+5	Se o número de espécies diferentes de arbustos é:	> 2	> 3	> 4
-5	Se existem estruturas construídas pelo homem			
-5	Se existe alguma espécie de árvore introduzida (alóctone)** isolada			
-10	Se existem espécies de árvores alóctones** formando comunidades			
-10	Se existem lixos			

4 – Grau de naturalidade do canal fluvial - Pontuação entre 0 e 25

Pontuação	
25	O canal do rio não está modificado
10	Modificações nos terraços adjacentes ao leito do rio com redução do canal
5	Sinais de alteração e estruturas rígidas intermitentes que modificam o canal do rio
0	Rio canalizado na totalidade do troço
-10	Se existe alguma estrutura sólida dentro do leito do rio
-10	Se existe alguma represa ou outra infraestrutura transversal no leito do rio

Pontuação final (soma das pontuações anteriores)	
---	--

* **Determinação do tipo geomorfológico da zona ribeirinha** (característica 3, qualidade da cobertura vegetal)
Somar o tipo de desnível da margem direita e da esquerda, e somar a pontuação das restantes características.

Tipos de desnível da zona ripária	Pontuação			
	Esquerda	Direita		
Vertical côncavo (declive > 75°), com uma altura não superável pelas máximas cheias			6	6
Igual, mas com um pequeno talude ou margem inundável periodicamente (cheias normais)			5	5
Declive entre 45 e 75°, escalado ou não. O declive mede-se a partir do ângulo entre a horizontal e a recta entre a margem e o último ponto da ribeira. $\Sigma a > \Sigma b$			3	3
Declive entre 20 e 45°, escalonado ou não. $\Sigma a > \Sigma b$			2	2
Decliv < 20°, zona ribeirinha uniforme e plana.			1	1

Existência de uma ilha ou ilhas no meio do leito do rio

Largura conjunta "a" > 5 m		-2
Largura conjunta "a" entre e 5 m		-1

Potencialidade de suportar uma massa vegetal ribeirinha. Percentagem de substrato duro com incapacidade para enraizar uma massa vegetal permanente

> 80%	No se pode medir
60 – 80%	+6
30 – 60%	+4
20 – 30%	+2

Pontuação Total

--	--

Tipo geomorfológico segundo a pontuação

> 8	Tipo 1	Zonas ribeirinhas fechadas, normalmente de cabeceira, com baixa potencialidade para suportar um extenso bosque de ribeira
Entre 5 – 8	Tipo 2	Zonas ribeirinhas com uma potencialidade intermédia para suportar uma zona vegetada, sectores médios dos rios
< 5	Tipo 3	Zonas ribeirinhas extensas, sectores baixos dos rios, com elevada potencialidade para possuir um bosque extenso.

**** Espécies frequentes e consideradas alóctonas**

- *Populus deltoides* - *Populus nigra ssp. italica* - *Ailanthus altissima* - *Robinia pseudo-acacia*
- *Populus x canadensis* - *Salix babylonica* - *Celtis australis* - *Platanus x hispanica*

Anexo I

ÍNDICE GQC: CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO CANAL

Índice da qualidade de canal:	Código:
(realizado em pelo menos três transectos com distância entre si de 20 metros)	

1. Presença de estruturas de retenção

Ausência de estruturas	4
Açude rústico semi-desagregado	3
Açude rústico bem consolidado	2
Açude ou barragem de betão	1

2. Estrutura do canal

$W/D < 7$, não ocorre inundação das margens	4
$W/D = 8-15$, inundação das margens rara	3
$W/D = 15-25$, inundação frequente das margens	2
$W/D > 25$, inundação muito frequente das margens	1

W – Média da largura do leito molhado obtida nos transectos

D – Média da profundidade máxima obtida nos transectos.

3. Sedimentos e estabilidade do canal

Ausência de alargamento do canal ou de acumulações de materiais transportados; canal único;	4
Algumas acumulações de materiais transportados; canal único;	3
Línguas de cascalho, areia e limo; o leito de cheia apresenta canais independentes;	2
Canal dividido em múltiplas línguas de areia e limo (ou rio canalizado).	1

4. Estrutura das margens

Margens estáveis com vegetação ripária contínua e estruturalmente complexa (árvores e arbustos); sem sinais de erosão;	4
Margens estáveis mas com vegetação ripária fragmentada; alguns regos desprovidos de vegetação;	3
Margens pouco consolidados mantidas por uma vegetação esparsa de herbáceas e arbustos;	2
Margens com vegetação muito escassa e uniforme, rebaixadas pela erosão ao longo do troço.	1

5. Alteração artificial das margens

Ausência quase completa de alteração artificial das margens;	4
Uma das margens apresenta alterações moderadas (e.g. enrocamentos >30% do comprimento troço);	3
Ambas as margens apresentam alterações moderadas (e.g. enrocamentos >30%), ou uma delas está alterada significativamente (e.g. linearização da margem),	2
Como no caso anterior mas a estrutura da margem é de betão armado ou ciclópico.	1

6. Heterogeneidade do canal

Canal curvilíneo e sequencia lótica/lêntica muito marcada;	4
Canal rectilíneo com reduzida sequencia lótica/lêntica;	3
Velocidade praticamente constante ao longo de todo o troço;	2
Zona lêntica artificial ou rio canalizado.	1

7. Estrutura do leito

Tipo 1	Troços encaixados, normalmente de cabeceira e com muita rocha, baixa potencialidade de suportar um extenso bosque ribeirinho;
Tipo 2	Troços com desníveis médios das margens, potencialidade intermédia para suportar um bosque ribeirinho; “zonas médias do rio”;
Tipo 3	Troços com desníveis das margens muito pouco acentuadas, potencialidade elevada para suportar um bosque ribeirinho; zonas baixas de alguns rios.

Tipo 1 (Troço em que predomina a erosão)

>50% do material é constituído por granulometria >25 cm (blocos);	8
>50% do material é constituído por granulometria >6,5 cm (pedra);	6
>50% do material é constituído por granulometria >2,0 cm (salto);	3
Predomina a areia e o limo (>50%).	1

Tipo 2 (troço em que predomina o transporte)

> 50% do material é constituído por blocos e pedras (>6,5 cm);	8
50% do material é constituído por pedra ou superior (>6,5 cm);	6
< 25% do material é de dimensões superiores a cascalho (>1,5 cm);	3
O leito é exclusivamente de limo e areia fina (>1,5 cm) é inferior a 10%.	1

Tipo 3 (troço em que predomina a sedimentação)

>50% do material é constituído por dimensões superiores a areia grossa (0,5 cm);	8
30-50% do material é constituído por dimensões superiores a areia grossa (0,5 cm) e o resto é formado por limo e areia fina;	6
<30% do material é constituído por dimensões superiores a areia grossa (0,5 cm) e o resto é formado por limo e areia fina;	3
O leito é exclusivamente de limo e areia fina (<0,125 cm).	1

8. Deposição de finos intersticiais

A % de finos e < 5%;	4
A % de finos é de 5-25%;	3
A % de finos é de 25-50%;	2
A % de finos é >50%.	1

- Para os rios Tipo 1 os finos consideram-se <0,5 cm.
- Para os rios Tipo 2 e 3 os finos consideram-se <0,125 cm.

ANEXO II

GUIA PARA PREENCHIMENTO DAS VARIÁVEIS *ANTHROPOGENIC IMPACTS*

Land use	Impacto de práticas agrícolas/silvícolas
5	> 40% uso agrícola (agricultura intensiva), impacto muito severo (e.g., arrozal)
4	> 40% uso agrícola/silvícola (UAS), forte impacto (e.g., área com forte exploração florestal, incluindo cortes rasos; área de regadio)
3	< 40% UAS, impacto moderado (e.g., hortas p/subsistência)
2	< 40% UAS, pequeno impacto (e.g., montado)
1	< 10% UAS, sem impactos significativos

Urbanization	Impacto de aglomerados urbanos
1 a 5	Avaliação pericial (5 – impactos muito severos (e.g., local junto a uma urbe com carências ao nível do saneamento básico) a 1 – sem impactos significativos (e.g., habitações isoladas))

Riparian area	Desvio relativamente ao estado natural da ZONA RIPÁRIA
1 a 5	Avaliação pericial (5 – impactos muito severos (e.g., corte regular e em grandes extensões da vegetação ribeirinha, acompanhado de sobrepastoreio) a 1 – sem impactos significativos))

Sediment load	Desvio relativamente à carga natural de sedimentos (tanto a transportada na coluna de água como a depositada no leito do rio)
5	A % de finos > 75% e/ou carga sedimentos transportada muito elevada
4	A % de finos = 50-75% e/ou carga sedimentos transportada elevada
3	A % de finos = 25-50% e carga sedimentos transportada natural
2	A % de finos = 5-25% e carga sedimentos transportada natural
1	A % de finos < 5% e carga sedimentos transportada natural

Morphological condition	Desvio relativamente ao estado natural do leito e das margens
5	Canal
4	Sector canalizado, faltam a maior parte dos habitats naturais
3	Sector canalizado; faltam alguns tipos de habitats naturais, embora se mantenha grande parte da forma natural do canal
2	Uma das margens pode apresentar enrocamentos rústicos, mas estão presentes a maioria dos habitats
1	Alterações morfológicas ausentes ou desprezáveis

ANEXO III

Pontuações atribuídas às diferentes famílias de macroinvertebrados aquáticos para o cálculo do IBMWP (adaptado de ALBA-TERCEDOR & SANCHEZ ORTEGA 1988).

FAMÍLIAS	PONTUAÇÃO
E: Siphonuridae, Heptageniidae, Leptophlebiidae, Potamanthidae, Ephemeridae P: Taeniopterygidae, Leuctridae, Capniidae, Perlodidae, Perlidae, Chloroperlidae T: Phryganeidae, Molannidae, Beraeidae, Odontoceridae, Leptoceridae, Goeridae, Lepidostomatidae, Brachycentridae, Sericostomatidae D: Athericidae, Blephariceridae H: Aphelocheiridae	10
T: Psychomyiidae, Philopotamidae, Glossosomatidae O: Lestidae, Calopterygidae, Gomphidae, Cordulegasteridae, Aeschnidae, Corduliidae, Libellulidae C: Astacidae	8
E: Ephemerellidae, Prosopistomatidae P: Nemouridae T: Rhyacophilidae, Polycentropodidae, Limnephilidae, Ecnomidae	7
M: Neritidae, Viviparidae, Ancyliidae, Thiaridae, Unionidae T: Hydroptilidae C: Gammaridae, Atyidae, Corophiidae O: Platycnemididae, Coenagrionidae	6
E: Oligoneuriidae, Polymitarcidae C: Dryopidae, Elmidae, Helophoridae, Hydrochidae, Hydraenidae, Clambidae T: Hydropsychidae, Helicopsychidae D: Tipulidae, Simuliidae Pl: Planariidae, Dendrocoelidae, Dugesiidae	5
E: Baetidae, Caenidae C: Haliplidae, Curculionidae, Chrysomelidae D: Tabanidae, Stratiomyidae, Empididae, Dolichopodidae, Dixidae, Sciomyzidae, Ceratopogonidae, Anthomyidae, Limoniidae, Psychodidae, Rhagionidae Mg: Sialidae Pl: Piscicolidae A: Hidracarina	4
H: Mesovellidae, Hydrometridae, Gerridae, Nepidae, Naucoridae, Pleidae, Veliidae, Notonectidae, Corixidae C: Helodidae, Hydrophilidae, Higiobiidae, Dytiscidae, Gyrinidae M: Valvatidae, Hydrobiidae, Lymnaeidae, Physidae, Planorbidae, Bithyniidae, Bythinellidae, Sphaeriidae Hr: Glossiphoniidae, Hirudidae, Erpobdellidae C: Asellidae, Ostracoda	3
D: Chironomidae, Culicidae, Muscidae, Thaumaleidae, Ephyridae	2
O: Oligochaeta (Todas As Famílias) D: Syrphidae	1

ANEXO III

AMPLITUDES DE VARIAÇÃO PARA O ÍNDICE IBMWP E SEU SIGNIFICADO.

Amplitude de valores	Classe	Significado
> 100	I	Água limpa
61 – 100	II	Água ligeiramente poluída
36 – 60	III	Água moderadamente poluída
16 – 35	IV	Água muito poluída
<15	V	Água fortemente poluída

MEDIANA DOS VALORES DE REFERÊNCIA E FRONTEIRAS PARA OS RIOS DE PORTUGAL CONTINENTAL

Tipos de Rios	Índice adoptado	Valor de Referência	Exc./Bom (RQE)	Bom/Raz. (RQE)	Raz./Med. (RQE)	Med./Mau (RQE)
Rios Montanhosos do Norte	IPt_{I_N}	0.98	0.86	0.60	0.40	0.20
Rios do Norte de Pequena Dimensão	IPt_{I_N}	1.02	0.87	0.65	0.44	0.22
Rios do Norte de Média-Grande Dimensão	IPt_{I_N}	1.00	0.88	0.66	0.44	0.22
Rios do Alto Douro de Média-Grande Dimensão	IPt_{I_N}	1.01	0.83	0.61	0.41	0.20
Rios do Alto Douro de Pequena Dimensão	IPt_{I_N}	1.01	0.85	0.59	0.40	0.20
Rios de Transição Norte-Sul	IPt_{I_N}	1.00	0.86	0.64	0.42	0.21
Rios do Litoral Centro	IPt_{I_S}	0.98	0.74	0.56	0.37	0.19
Rios do Sul de Pequena Dimensão	IPt_{I_S}	0.99	0.95	0.70	0.47	0.23
Rios do Sul de Média-Grande Dimensão	IPt_{I_S}	0.98	0.97	0.72	0.48	0.24
Rios Montanhosos do Sul	IPt_{I_N}	0.99	0.82	0.56	0.38	0.19
Depósitos Sedimentares do Tejo e Sado	IPt_{I_S}	1.05	0.88	0.66	0.44	0.22
Calcários do Algarve	IPt_{I_S}	0.99	0.95	0.70	0.47	0.23

ANEXO IV

Report Date: 3/9/2010

Analyte Symbol	Au	Ag	Cu	Cd	Mo	Pb	Ni	Zn	S	Al	As	Ba	Be	Bi	Br	Ca	Co	Cr	Cs	Eu	Fe	Hf	Hg	Ir	K	Mg
Unit Symbol	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppb	%	%
Detection Limit	2	0.3	1	0.3	1	3	1	1	0.01	0.01	0.5	50	1	2	0.5	0.01	1	2	1	0.2	0.01	1	1	5	0.01	0.01
Analysis Method	INAA	MULT INAA / TD-ICP	TD-ICP	TD-ICP	TD-ICP	TD-ICP	MULT INAA / TD-ICP	MULT INAA / TD-ICP	TD-ICP	TD-ICP	INAA	INAA	TD-ICP	TD-ICP	INAA	TD-ICP	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	TD-ICP	TD-ICP
1 (Água recolhida junto às escombreiras)																										
2 (Água do rio a montante das escombreiras)																										
3 (Água recolhida no Portelo)																										
4 (Água recolhida a jusante do Portelo)																										
5 (Branco do método)																										
A (Sedimentos recolhidos no Portelo)	< 2		0.6	139	0.8	1	16	20	< 0.01	9.08	26	550	122	14	< 0.5	0.06	13	71	136	12	3.44	2	< 1	< 5	3.35	0.69
B (Sedimentos recolhidos nas escombreiras)	< 2		0.8	144	0.9	2	11	13	0.02	7.93	294	530	168	7	< 0.5	0.04	11	58	148	11	4.04	2	< 1	< 5	3.08	0.56
		Minas	Classe 2	Classe 1	Minas	Classe 1	Classe 1	Classe 1 e 2			Classe 4	Minas	Minas	Minas		Minas	Classe 2									

Mn	Na	P	Rb	Sb	Sc	Se	Sr	Ta	Ti	Th	U	V	W	Y	La	Ce	Nd	Sm	Sn	Tb	Yb	Lu	Mass	Na	Li	Be	Mg	Al	Si	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	
ppm	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	g	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	
1	0.01	0.001	15	0.1	0.1	3	1	0.5	0.01	0.2	0.5	2	1	1	0.5	3	5	0.1	0.01	0.5	0.2	0.05		5	1	0.1	1	2	200	30	700	1	0.1	0.1	0.5	0.1	10	
TD-ICP	INAA	TD-ICP	INAA	INAA	INAA	TD-ICP	INAA	TD-ICP	INAA	INAA	TD-ICP	INAA	TD-ICP	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	INAA	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS
																								270	46	6.8	4830	1490	5600	1640	6000	1	0.7	< 0.1	< 0.5	905	< 10	
																								2080	5	< 0.1	697	28	3000	1590	1200	< 1	0.4	< 0.1	< 0.5	3.7	< 10	
																								2100	20	1.8	2160	319	4100	940	3000	< 1	0.5	< 0.1	< 0.5	341	30	
																								1980	3	< 0.1	1150	16	3400	370	2800	< 1	0.4	< 0.1	< 0.5	35.7	< 10	
																								43	< 1	< 0.1	18	8	< 200	< 30	< 700	< 1	< 0.1	< 0.1	< 0.5	0.4	< 10	
349	0.3	0.063	329	2.3	11.3	< 3	120	< 0.5	0.25	9.5	3.6	52	13	12	35.9	56	20	4.6	< 0.01	< 0.5	2.3	0.32	25.2	Doc INAG	oc INAG										Doc INAG	oc INAG	DL 1998	DL 1998
290	0.23	0.085	312	3	10.3	< 3	99	13	0.27	9.6	< 0.5	55	13	11	32.9	53	20	4.3	< 0.01	< 0.5	19	0.26	29.6															

Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Ru	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Cs	Ba	La	Ce	Pr	Nd							
µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L							
0.005	0.3	0.2	0.5	0.01	0.01	0.03	0.2	3	0.005	0.04	0.003	0.01	0.005	0.1	0.01	0.01	0.2	0.01	0.001	0.1	0.01	0.1	1	0.001	0.1	0.001	0.001	0.001	0.001							
ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS							
190	17	> 200	246	0.12	0.12	2.35	0.4	7	18.8	25	16	0.03	< 0.005	< 0.1	0.07	< 0.01	< 0.2	8.74	< 0.001	< 0.1	0.17	< 0.1	< 1	20.6	12.4	5.51	14.9	194	9.87							
11	2.5	2.2	9	< 0.01	0.02	0.71	< 0.2	10	2.55	10.5	0.065	0.02	< 0.005	< 0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.2	0.28	< 0.001	< 0.1	0.3	< 0.1	< 1	1.5	7.3	0.045	0.103	0.015	0.055							
56.5	40.7	155	100	0.03	0.15	158	< 0.2	10	8.62	16.7	2.04	0.02	< 0.005	< 0.1	0.02	< 0.01	< 0.2	2.84	< 0.001	< 0.1	0.26	< 0.1	< 1	6.8	10	0.75	1.54	0.211	0.98							
3.21	3.8	15	6.9	< 0.01	0.01	178	< 0.2	6	1.31	10.4	0.06	0.01	< 0.005	0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.2	0.17	< 0.001	< 0.1	0.33	< 0.1	< 1	0.556	3.3	0.032	0.076	0.01	0.061							
0.108	0.6	2.1	27	< 0.01	0.09	< 0.03	< 0.2	< 3	0.023	0.53	0.031	< 0.01	< 0.005	< 0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.2	0.02	< 0.001	0.1	0.16	< 0.1	< 1	0.005	0.3	0.057	0.138	0.013	0.042							
oc INAG	DL 1998	oc INAG	oc INAG			Doc INAG	oc INAG							Doc INAG			Doc INAG	DL 1998		Doc INAG					Doc INAG											

ANEXOS (CAPÍTULO 3)

Anexo I

Microscopia Óptica - Procedimento

1. Material e equipamentos

- Fixador *Bouin*
- Xilol
- Parafina
- Álcool (50; 70; 90; 95; 100 %)
- Cassetes
- Processador
- Mesa de inclusão
- Hote
- Micropipeta

2. Procedimento

- Recolher o material que se pretende analisar, colocar em cassetes e de seguida, trabalhando na hote, no fixador *Bouin* pelo menos 24 horas.

- Lavar o material em álcool a 50 e 70% para remover o excesso de *Bouin*.

Nota: este passo tem como objectivo evitar a contaminação dos álcoois do processador *Citadel 2000*.

- Procedemos à desidratação do tecido através do processador *Citadel 2000*.

Nota: O equipamento passa o material nos álcoois a 70, 90, 95%, três passagens no álcool a 100% e três passagens em xilol durante uma hora cada.

- Impregnar as cassetes em parafina I durante uma hora e uma segunda vez em Parafina II durante 3 a 4 horas. (Parafina I e II: trata-se de diferentes recipientes contendo ambos parafina)

- Colocar as cassetes em suportes de alumínio e Incluir em parafina na mesa de inclusão SHADON HISTOCENTRE 2.

Nota: para amostras com mais de 1 cm, duplicam-se os tempos em cada um dos passos anteriormente referidos.

3. Realização de cortes no micrótomo

a. Material e equipamentos

- Micrótomo
- Recipiente de água destilada morna contendo um pouco de álcool.
- Agulha lanceolada
- Pincel
- Lâminas
- Estufa
- Suporte de lâminas
- Banho-maria

b. Procedimento

- Colocar as cassetes algum tempo no frigorífico, em média uma hora, para facilitar o corte.
- Colocar a cassette no micrótomo e regular o corte para 5 μm .

Nota: é aconselhado não considerar os primeiros cortes até que apanhe bem o material e não fique com quebras.

- Colocar os cortes na tina de água morna com álcool.
- Desenrolar os cortes com um pincel, de seguida, seccioná-los com atenção para não cortar o tecido.
- Colocar os cortes em lâminas.
- Passar rapidamente as lâminas no banho-maria para estica-lo.
- Colocar as lâminas em tinas suportes e secar na estufa por 12 horas.

4. Coloração dos cortes

a. Material

- Tinas
- Álcool a 50, 75, 90 e 100 %
- Água desionizada
- Corante Hemalumen
- Corante Eosina
- Xilol
- Suporte de lâminas
- Lâminas
- Lamelas
- DPX

b. Procedimento

Hidratação:

- Tirar as lâminas da estufa e proceder à desparafinização colocando o material em xilol por 10 minutos.
- Colocar de seguida em álcool a 100% com alguma agitação durante 3 minutos.
- Repetir o processo anterior com álcoois a 90, 75 e 50% respectivamente.
- Lavar o material passando duas vezes por água desionizada com bastante agitação.

Coloração:

- Colocar as lâminas no corante Hemalumen 5 a 10 minutos (cora os núcleos).
- Passar por água desionizada com agitação até ficar translúcida.
- Colocar as lâminas 5 minutos no corante Eosina (cora o citoplasma).
- Realizamos uma passagem rápida por água desionizada.

Nota: os corantes apenas têm afinidade com material hidratado. A desidratação é necessária para a montagem.

Desidratação:

- Passar as lâminas rapidamente duas vezes em álcool a 50%.
- De seguida, uma passagem rápida em álcool a 75%,
- Deixar 3 minutos no álcool a 90%, 3 minutos no álcool a 100% e 3 minutos em álcool a 100% (álcool novo).
- Colocar de seguida 10 minutos em Xilol.

Nota: se as lâminas apresentarem um aspecto leitoso aquando da passagem em xilol significa que a amostra não ficou bem desidratada, repetir a passagem pelo álcool a 100%. Manter as lâminas em xilol até se proceder à montagem.

- Proceder à montagem das lâminas colocando uma gota de DPX antes de colocar a lamela.
- Pressionar a lamela para remover o excesso de DPX.
- Deixar secar até o DPX solidificar totalmente permitindo remover com um bisturi os excessos.

Anexo II

Preparação de células para microscopia electrónica de transmissão

Reagente	Tempo	Observação
Fixação		
Gluteraldeído 2.5% em CAC	2 horas	4°C
Lavagem		
Tampão CAC	10 minutos	4°C
Tampão CAC	10 minutos	4°C
Pós-fixação		
Tetróxido de ósmio 2% em CAC	1 hora	4°C
Lavagem		
Tampão CAC	15 minutos	4°C
Desidratação		
Álcool 30%	15 minutos	4°C
Álcool 50%	15 minutos	4°C
Álcool 70% (possível ponto de paragem da experiência)	15 minutos	4°C
Álcool 90%	15 minutos	4°C
Álcool 95%	15 minutos	Temperatura ambiente
Álcool abs.	20 minutos	
Álcool abs.	20 minutos	
Óxido de propileno	10 minutos	
Óxido de propileno	10 minutos	
**Impregnação		
Óxido de propileno + Epoxy (1:1)	3 horas	Durante a noite
Óxido de propileno + Epoxy (1:3)	1 hora	
Epoxy	2 hora	
**Inclusão		
Epoxy final em molde (colocar etiqueta)	12 horas	45°C
	24 horas	60°C
	Alguns dias	Temperatura ambiente

**No caso da microscopia electrónica de varrimento, não foi realizado o passo da Impregnação e da Inclusão.