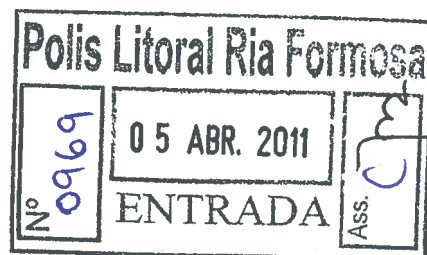


Ria Formosa – POLIS LITORAL – Plano P6

Plano de valorização e gestão sustentável das actividades ligadas aos recursos da Ria

Qualidade Ambiental e Sustentabilidade dos  
Recursos Biológicos da Ria Formosa  
**QUASUS**



## Segundo Relatório de Progresso

C. Vale, M. Caetano, D. Matias, F. Soares, M.J. Botelho, M.L. Santos



Período: 15/07/2010 a 15/01/2011

Data de início do projecto: 15/01/2010

## **Índice**

- 1. Campanhas para caracterização das massas de água**
  - 1.1. Objectivos**
  - 1.2. Locais de amostragem**
  - 1.3. Parâmetros monitorizados**
  - 1.4. Mediana dos níveis registados nas águas da Ria Formosa**
  - 1.5. Desvio dos níveis registados em cada massa de água face às medianas estimadas para a Ria**
  - 1.6. Desvio dos níveis registados em cada massa de água face às medianas estimadas para a zona costeira adjacente à Ria Formosa**
- 2. Ensaios experimentais em viveiros**
  - 2.1. Objectivos**
  - 2.2. Locais dos ensaios**
  - 2.3. Transferência das amêijoas para os viveiros**
  - 2.4. Amostragens realizadas**
  - 2.5. Observação de parâmetros ligadas à produção**
  - 2.6. Efeito da troca de amêijoas entre viveiros**
  - 2.7. Observação de parâmetros ligados à qualidade das amêijoas**
  - 2.8. Observações ligadas ao meio**
- 3. Reuniões**

## **Referências**

## **Anexo I - Metodologias analíticas e de observação**

## Sumário executivo

O projecto QUASUS é realizado em estreita colaboração com o projecto FORWARD, ambos contribuindo para a valorização e gestão sustentável das actividades ligadas aos recursos da Ria Formosa. Este Relatório apresenta os resultados obtidos neste segundo período de execução, em que as principais actividades realizadas do QUASUS estiveram relacionadas com (i) a participação em reuniões de trabalho, com vista a identificar problemas e a discutir metodologias de trabalho comum e (ii) a recolha de dados sobre a qualidade do ambiente lagunar e a qualidade da espécie amêijo-a-ba *Ruditapes decussatus* produzida na Ria.

As reuniões, organizadas em forma de workshops, foram realizadas com os restantes elementos do projecto integrado FORWARD, envolvendo Entidades da Administração Regional e Central, assim como Organizações de Produtores e especialistas internacionais convidados para estes workshops.

A recolha de dados foi obtida através de campanhas de amostragem de água tendo em vista dois objectivos distintos. As campanhas que incidiram sobre a globalidade da Ria destinaram-se a obter informação adicional sobre as características físico-químicas das massas de água da Ria, definidas no âmbito da Directiva-Quadro da Água. Os dados recolhidos nos períodos seleccionados permitiram ainda, avaliar a qualidade das águas em épocas de precipitação atmosférica elevada quando as fontes difusas têm maior expressão. As campanhas do segundo tipo foram centradas em viveiros-tipo escolhidos para avaliar o impacto das fontes antropogénicas na qualidade da água e das amêijoas. Estes resultados, ainda em reduzido número, permitirão avaliar a influência das descargas de efluentes urbanos e de aquacultura nas zonas de produção de amêijo-a seleccionadas. Para além dos objectivos específicos, os resultados destes dois tipos de campanha serão utilizados em modelos a desenvolver no âmbito do FORWARD.

## 1. Campanhas para caracterização das massas de água

### 1.1. Objectivos

A realização destas campanhas de caracterização das massas de águas destina-se a obter dados com vista a responder às seguintes questões:

- i. Qual a variabilidade espacial da qualidade da água na Ria Formosa e sua relação com os viveiros de amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*)?
- ii. De que forma a qualidade da água é alterada em períodos de elevada pluviosidade?

Para além disso, pretender fornecer dados para:

- iii. Aplicação do modelo ecológico no âmbito do projecto FORWARD.
- iv. Apoiar na classificação ecológica da Directiva-Quadro da Água.

### 1.2. Locais de amostragem

Foram já efectuadas 3 campanhas de amostragem na Ria Formosa (Tabela 1) que permitirão avaliar a qualidade da água, bem como, a aplicação de um modelo ecológico. A amostragem foi efectuada em 5 locais da Ria (Tabela 2; Figura 1), correspondendo às massas de água definidas para a implementação da Directiva-Quadro da Água. A amostragem realizada no inverno permite avaliar melhor o efeito das escorrências (fontes difusas) sobre a qualidade da água.

Para as determinações dos elementos físico-químicos foram recolhidas amostras de água com garrafas Niskin, à superfície e fundo (quando a coluna de água foi superior a 3 m), em situação de baixa-mar e preia-mar.

**Tabela 1** - Datas das campanhas de amostragem realizadas e previstas na Ria Formosa

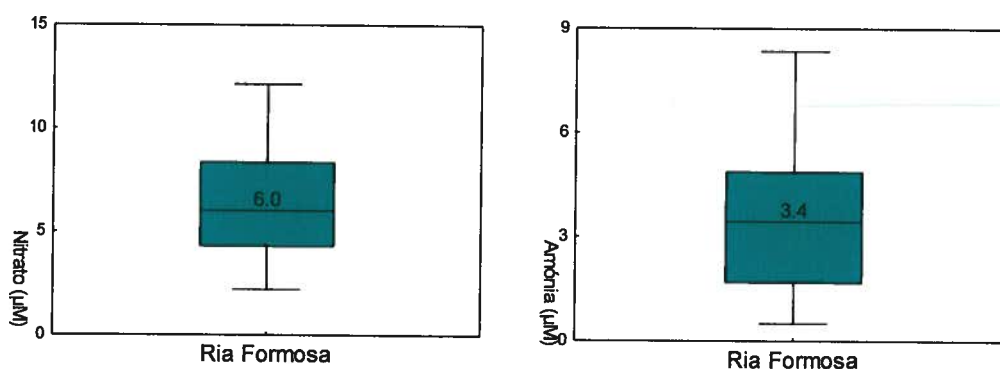
Campanhas realizadas	Campanhas previstas
10-11 Março de 2010	Abril de 2011
16-17 Junho de 2010	Maio de 2011
11-13 Janeiro de 2011	

#### QUASUS Qualidade Ambiental e Sustentabilidade dos Recursos Biológicos da Ria Formosa

Foram calculadas as medianas, os percentis 25 e 75% e valores máximos e mínimos do conjunto de dados disponíveis para cada determinação. A Tabela 3 apresenta as medianas dos valores de nutrientes ( $\mu\text{M}$ ) e metais ( $\text{ng L}^{-1}$ ) na coluna de água da Ria Formosa. A Figura 2 ilustra a variabilidade das medianas para os compostos inorgânicos de azoto, mostrando que os níveis tiveram uma pequena dispersão e são baixos em relação a outros sistemas estuarinos.

**Tabela 3** – Medianas dos níveis de nutrientes e metais na Ria Formosa.

Parâmetro	Unidades	Mediana
Nitrato	$\mu\text{M}$	6.0
Nitrito		0.30
Amónia		3.4
Fosfato		0.23
Silicato		7.4
Cádmio	$\text{ng L}^{-1}$	14
Chumbo		197
Cobre		143
Níquel		179

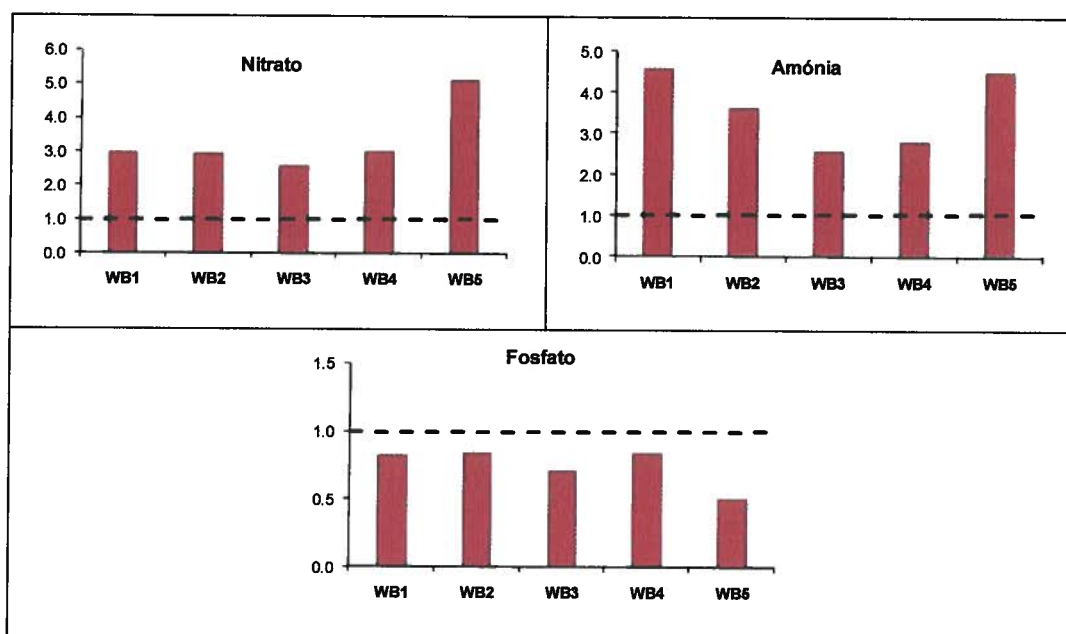


**Figura 2** - Medianas, percentis 25 e 75% e concentrações máximas e mínimas de nitrato e amónia ( $\mu\text{M}$ ) na Ria Formosa.

#### 1.5. Desvio dos níveis registados em cada massa de água face às medianas estimadas para a Ria

Foi calculado o desvio das condições existentes nas massas de água em relação às condições da generalidade da Ria, estimada com base nas três campanhas de amostragem realizadas. O desvio foi expresso através da razão entre as medianas dos respectivos parâmetros. As razões

- (i) Desvios positivos para a amónia e nitrato, indicando que a Ria Formosa é uma fonte de azoto para a zona costeira. Para além da proximidade das fontes antropogénicas, as trocas de nutrientes entre o sedimento e a coluna de água, impulsionadas pela inundação e exposição à atmosfera da zona intertidal da Ria, podem contribuir para estas diferenças. No período de inverno as descargas difusas são uma fonte relevante de azoto para a Ria.
- (ii) Desvios negativos para o fósforo, apresentando um comportamento oposto aos compostos de azoto, indicando concentrações na Ria inferiores à zona costeira. A retenção nos sedimentos, em particular nas áreas intertidais da Ria pode explicar estes desvios.



**Figura 4.** Razões entre as concentrações de nitrato, amónia e fosfato em cada massa de água relativamente às medianas estimadas para a zona costeira.

## 2. Ensaios experimentais em viveiros

### 2.1. Objectivos

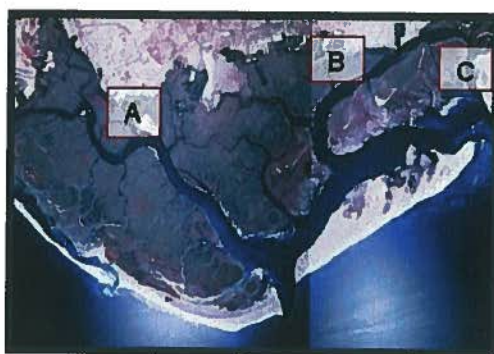
A realização dos ensaios experimentais destina-se a obter dados com vista a responder às seguintes questões:

- i. As descargas de efluentes urbanos e de pisciculturas têm influência na produção de amêijoas-boas (*Ruditapes decussatus*) em viveiros da Ria Formosa?
- ii. Qual a qualidade das águas e das amêijoas em viveiros directamente influenciados por estas descargas?

### 2.2. Locais dos ensaios

Para responder a estas questões foram seleccionados três viveiros-tipo (Figura 5) com as seguintes localizações e características:

- i. Viveiro A – em Marchil, perto da cidade de Faro, sendo as suas características influenciadas pela descarga de efluentes urbanos e reduzida circulação de água.
- ii. Viveiro B – perto de Olhão, junto à rejeição das águas da Estação de Piscicultura do IPIMAR.
- iii. Viveiro C – no local designado por Fortaleza,, no enfiamento da Barra Velha e caracterizado por elevado hidrodinamismo.



**Figura 5** – Localização dos viveiro-tipo.

### 2.3. Transferência das amêijoas para os viveiros

Após a selecção dos viveiros-tipo deu-se início à delimitação de uma área de 25 m<sup>2</sup> em cada um deles, tendo-se posteriormente procedido à transferência das amêijoas para esta superfície (Figura 6). A transposição das amêijoas para os viveiros foi efectuada nos dias 25 e 26 Novembro. As amêijoas colocadas nos viveiros A e B eram provenientes dos bancos naturais da Ria Formosa. O viveiro C foi repovoado com amêijoas provenientes de outro viveiro, de forma a avaliar o efeito da transposição de indivíduos com maiores dimensões e também a possível transmissão de patologias entre viveiros. Posteriormente foi delimitada outra área de 25 m<sup>2</sup> no viveiro C, tendo esta sido repovoada em Fevereiro com semente de amêijoa proveniente dos bancos naturais. Assim as duas áreas existentes no viveiro C passaram a ser denominadas viveiro C1 e C2. A densidade de repovoamento utilizada foi de 1kg.m<sup>-2</sup>.



**Figura 6** - Delimitação da área de estudo e transposição das amêijoas nos viveiros-tipo.



## 2.4. Amostragens realizadas

As amostragens de amêijoas foram realizadas mensalmente pelo que até à presente data foram efectuadas 3 amostragens (Tabela 4).

Tabela 4 – Datas de amostragens de amêijoas nos viveiros-tipo.

	Amostragens		
	T0	T1	T2
Viveiro A	24-Nov	04-Jan	07-Fev
Viveiro B	25-Nov	05-Jan	07-Fev
Viveiro C1	25-Nov	05-Jan	09-Fev
Viveiro C2	09-Fev		

## 2.5. Observação de parâmetros ligadas à produção

No âmbito destes ensaios, decorre a monitorização dos seguintes parâmetros ligados à produção:

- Comprimento e peso
- Sobrevivência
- Índice de condição
- Composição bioquímica
- Maturação sexual
- Stress oxidativo (peroxidase lipídica e ferritina)

As alterações sazonais de alguns parâmetros ambientais e as características do local de cultivo influenciam o desenvolvimento das populações de bivalves, tanto ao nível de sobrevivência e parâmetros biométricos, como também na composição bioquímica e consequentemente na maturação sexual desses bivalves. Qualquer factor, exógeno ou endógeno, que afecte os processos fisiológicos, pode afectar o crescimento e a sobrevivência. A sobrevivência dos organismos numa cultura depende de uma série de variáveis, tais como a qualidade da água, o tamanho da semente, a densidade de cultura e a protecção contra predadores (Kraeuter & Castagna, 1989). Ainda que, numerosos estudos mostrem a influência de factores físicos e químicos (tais como a temperatura, oxigénio e salinidade) no crescimento dos bivalves, o factor ambiental considerado mais importante é a disponibilidade de alimento (Bayne & Newell, 1983). As extensas áreas intertidais da Ria Formosa são diariamente inundadas e

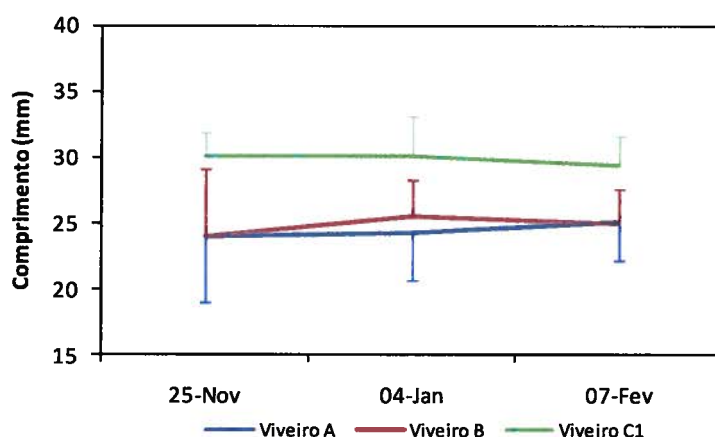
expostas à atmosfera com a subida e descida da maré. Estas flutuações tendem a provocar alterações na camada superficial do sedimento. O microfitobentos existente nesta camada superficial pode ser transportado do sedimento para a coluna de água por acção da maré levando a um enriquecimento da coluna de água em clorofila. Assim, a concentração de clorofila *a* disponível na coluna de água, proveniente do fitoplâncton da laguna (Falcão, 1997), é adicionado semi-diurnamente a concentração de clorofila *a* proveniente do microfitobentos ressuspendido pelo efeito de maré nas zonas intertidais, o que favorece a disponibilidade de alimento para os bivalves que filtram na interface sedimento-água.

A disponibilidade de alimento, para além de ser um factor preponderante no crescimento dos organismos, também o é na sua reprodução. A gametogénese é um processo energeticamente dispendioso, sendo referido que o crescimento somático decresce quando a energia é canalizada para a gónada (Bricelj & Shumway, 1991). Deste modo, a reprodução é um factor endógeno que afecta o crescimento somático, uma vez que as reservas metabólicas, acumuladas nos tecidos podem ser usadas para a produção de energia ou convertidas em vários componentes bioquímicos (Marin et al., 2003).

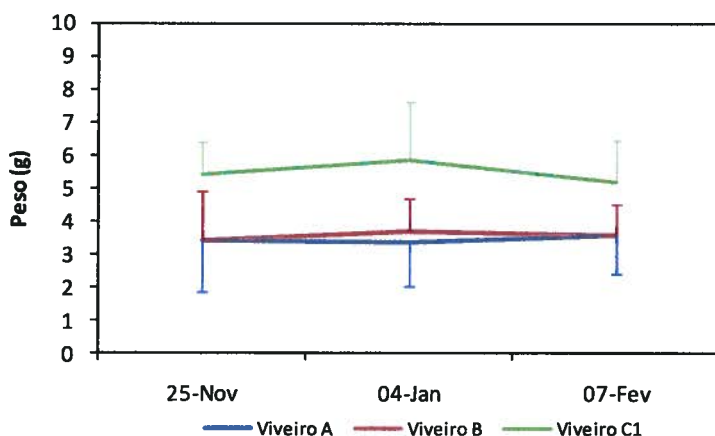
A composição bioquímica dos bivalves depende do alimento disponível, do estado de desenvolvimento das gónadas e da actividade metabólica do indivíduo (Ruiz et al., 1990), isto é, a composição bioquímica está estreitamente relacionada com o meio envolvente. A utilização das reservas metabólicas inicia-se preferencialmente com os hidratos de carbono; quando a concentração destes compostos diminui os organismos recorrem aos lípidos e/ou às proteínas. Os lípidos são também utilizados na gametogénese e desova (Ruiz et al. 1990). Assim o estudo da composição bioquímica contribui não só para um melhor conhecimento dos parâmetros condicionantes do sucesso no crescimento, mas igualmente para uma caracterização mais eficiente da condição e qualidade dos organismos, o que poderá ter uma resposta positiva em termos de resistência a eventuais agentes patogénicos e a situações de stress comuns nos sistemas lagunares (Ruiz et al, 1990). Paralelamente, a avaliação do índice de condição permite uma apreciação geral sobre o estado fisiológico geral das população de bivalves e é reconhecido como um útil biomarcador capaz de reflectir a capacidade dos bivalves em resistir a condições naturais adversas e/ou stress antropogénico (Fernandez Castro & Vido de Mattio, 1987). Assim a optimização e rentabilização de uma cultura passam pelo conhecimento das densidades óptimas, crescimento e sobrevivência da espécie, em cada local de cultura.

Estudos já desenvolvidos pela equipa que visaram avaliar o crescimento, a sobrevivência e a qualidade biológica da amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) em função das condições ambientais que condicionam os viveiros da Ria Formosa mostraram que: os parâmetros

No que se refere à variação do crescimento das amêijoas em comprimento e peso ao longo do tempo, verificou-se que, de um modo geral, os valores se mantiveram relativamente constantes no período amostrado (Figuras 7 e 8). Estes resultados estão de acordo com os observados pela equipa noutros ensaios (Banha, 1984; Matias, 2004), apontando para um período de adaptação das amêijoas transpostas ao novo local e crescimento praticamente nulo nos meses de Inverno. A conjugação com informação de outros compartimentos permitirá dar uma resposta mais consistente no que se refere à avaliação da qualidade biológica da amêijoal-boa face a diferentes condições de cultivo.



**Figura 7** – Variação do comprimento (mm) de *Ruditapes decussatus* ao longo do tempo, nos diferentes viveiros-tipo ( A, B e C1).



**Figura 8** – Variação do peso (g) de *Ruditapes decussatus* ao longo do tempo, nos diferentes viveiros-tipo ( A, B e C1).

As observações relativas aos parâmetros índice de condição, composição bioquímica, maturação sexual e stress oxidativo estão em curso e, portanto, não serão apresentadas neste relatório.

## **2.6. Efeito da troca de amêijoas entre viveiros**

A elevada mortalidade (cerca de 60 %) obtida com a transposição de indivíduos de maiores dimensões entre viveiros mostrou que não poderá ser considerada uma boa prática de cultivo de amêijoas na Ria Formosa. Verificou-se que os indivíduos de maiores dimensões apresentaram maior mortalidade, pelo que se registou um decréscimo no crescimento em peso e comprimento, sugerindo que quanto maior o indivíduo menor a sua capacidade de adaptação. O facto de serem sempre os indivíduos de maiores dimensões a apresentarem uma maior mortalidade quando as condições de cultivo lhe são adversas, também já foi observado noutros estudos realizados pela equipa. Os indivíduos de maiores dimensões são, também, aqueles que apresentam uma maior predisposição para a apresentação de patologias, isto verifica-se com a perkinsiose, pelo que a transposição de indivíduos de maior dimensão aumenta o risco de transmissão de patologias, funcionando este como vectores. É de realçar que a área onde se encontra situado o viveiro C (Fortaleza) tem elevado hidrodinamismo e uma boa renovação de água por se encontrar no enfiamento de uma barra. Com base nestes critérios este Viveiro foi considerado como situação de referência nestes ensaios.

## **2.7. Observação de parâmetros ligados à qualidade das amêijoas**

Em conjunto com a observação dos parâmetros ligados à produção decorrem também as seguintes determinações:

- *Escherichia coli* e coliformes totais
- Toxinas marinhas (algas tóxicas)
- Contaminantes químicos (metais e hidrocarbonetos)

O controlo da salubridade dos moluscos bivalves vivos reveste-se de uma importância relevante porque os surtos de infecções, toxinfecções e intoxicações causados pelo consumo de bivalves contaminados com microrganismos patogénicos bacterianos e virais ou biotoxinas marinhas, configuram um problema de saúde pública recorrente a nível mundial. A legislação em vigor atribui ao IPIMAR, enquanto Laboratório Nacional de Referência, competências no controlo da salubridade dos moluscos bivalves vivos, que consiste na delimitação e classificação periódica das zonas de produção, assim como na monitorização de algas tóxicas nas zonas de produção e das biotoxinas marinhas nos moluscos bivalves.

**QUASUS Qualidade Ambiental e Sustentabilidade dos Recursos Biológicos da Ria Formosa**

Em 2005, o IPIMAR iniciou a quantificação da bactéria *Escherichia coli*, por recomendação da União Europeia, em virtude desta bactéria estar directamente associada à contaminação entérica de origem humana ou animal. Os resultados históricos dos níveis de coliformes demonstram que, nos últimos anos, ocorreu uma diminuição significativa da contaminação nos bivalves provenientes da região intermédia da laguna e das zonas mais próximas das barras. Contudo observaram-se níveis anormalmente elevados durante os meses de pluviosidade intensa de 2004 e 2005. Os dados obtidos de *Escherichia coli* e de coliformes totais para as determinações efectuadas nos ensaios experimentais a decorrer (Anexo I - Metodologias analíticas e observações) estão apresentados na Tabela 6.

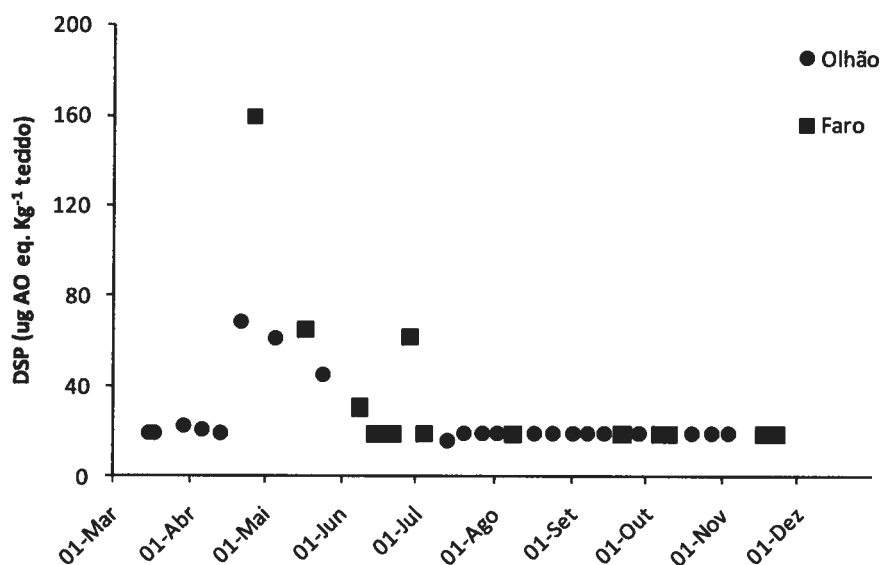
**Tabela 6** - Valores de *E. coli* e coliformes totais obtidos ao longo do tempo nos diferentes viveiros-tipo ( A, B e C).

	<i>E. coli</i> (UFC/100g)		Coliformes totais (UFC/100g)	
	T0	T1	T0	T1
Viveiro A	1013	3500	20199	14866
Viveiro B	1013	490	20199	1766
Viveiro C	1013	2400	20199	11958

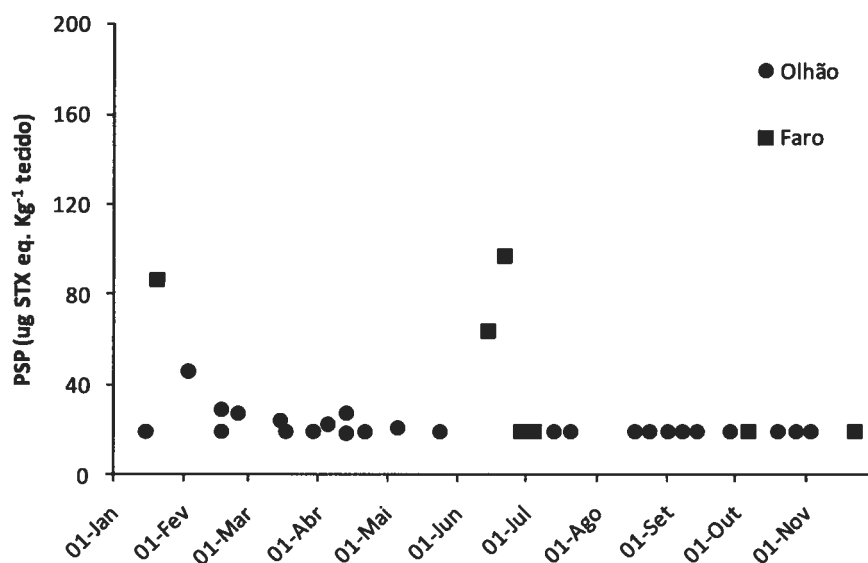
As toxinas marinhas nos moluscos bivalves provenientes das zonas de produção da Ria Formosa têm ocorrido devido à presença de elevadas concentrações de espécies fitoplantónicas tóxicas como *Dinophysis* spp. e *Gymnodinium catenatum* (Vale et al, 2008). Estas microalgas são produtoras de toxinas marinhas dos grupos diarreico (diarrhetic shellfish poisoning - DSP) e paralisante (paralytic shellfish poisoning - PSP), respectivamente. Os dados do programa de monitorização de biotoxinas pelo IPIMAR mostram que na maioria dos anos são ultrapassados os limites máximos admissíveis para estes grupos de compostos, levando à interdição da apanha e comercialização dos bivalves da Ria Formosa. A ocorrência de toxinas DSP e PSP tem sido mais frequente, o que não se tem vindo a verificar para os compostos do grupo amnésico (amnesic shellfish poisoning - ASP), acumulados em moluscos bivalves devido à ocorrência de blooms de diatomáceas tóxicas do género *Pseudonitzschia* spp.

Nas Figuras 9 e 10 apresentam-se os dados de toxicidade por biotoxinas marinhas em amêijoas e berbigão provenientes da Ria Formosa (zonas de produção de Faro e Olhão) no âmbito do programa de monitorização de biotoxinas realizado pelo IPIMAR (Anexo I - Metodologias

analíticas e observações). A Figura 9 refere-se a valores de toxicidade devido a DSP e a Figura 10 devido a PSP. Relativamente às toxicidades por compostos DSP e PSP, os valores foram baixos com excepção de uma semana em Abril de 2010, em que foi atingido o limite regulamentar para DSP (160  $\mu\text{g}$  ácido ocadáico equivalente por Kg tecido) (EU 2004).



**Figura 9** – Níveis de DSP (diarrhetic shellfish poisoning) em amêijoa-boa (*Ruditapes decussatus*) e berbigão (*Cerastoderma edulis*) recolhidos na Ria Formosa (zonas de produção Faro e Olhão) entre Março e Dezembro de 2010.



**Figura 10** – Níveis de PSP (paralytic shellfish poisoning) em amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) e berbigão (*Cerastoderma edulis*) recolhidos na Ria Formosa (zonas de produção Faro e Olhão) entre Janeiro e Novembro de 2010.

No período a que se refere este Relatório os níveis de toxicidade por DSP, PSP e ASP detectados no âmbito do programa de monitorização foram muito inferiores aos respectivos limites regulamentares (PSP - 800 µg saxitoxina equivalente por Kg tecido; ASP - 20 mg ácido domóico por Kg tecido) (EU 2004). Em concordância, a monitorização de espécies de fitoplâncton tóxico em amostras de água colhidas nas zonas de produção da Ria Formosa não detectou a presença das espécies associadas às biotoxinas acima referidas. Não foi assim necessário efectuar a intensificação de amostragens de água e de amêijoia-boia dos viveiros-tipo, como era previsto no planeamento das actividades.

## 2.8. Observações ligadas ao meio

Foram realizadas determinações da qualidade de água nos viveiros-tipo, relativamente a amostragens efectuadas nas mesmas datas em que se recolheram as amêijoas para as observações relacionadas com a qualidade e o crescimento. Os parâmetros principais foram os seguintes:

- Nutrientes
- Clorofila *a*
- Contaminantes químicos (metais e hidrocarbonetos)
- Algas tóxicas (ocasional)

Os nutrientes e a clorofila *a* foram determinados na água junto dos viveiros em situações de baixa-mar e preia-mar e à superfície (Anexo I - Metodologias analíticas e de observação). Trabalhos anteriores realizados pela equipa mostraram as trocas de nutrientes entre o sedimento e a água nos viveiros da Ria Formosa, quer pela inundação das áreas intertidais, incluindo os viveiros, quer pela perturbação do sedimento pelos organismos e pelas colheitas frequentes das amêijoas nos viveiros (Falcão e Vale, 2003; Falcão et al, 2006).

A Tabela 4 apresenta os níveis de nutrientes e clorofila *a* referentes às colheitas realizadas em Novembro e Dezembro de 2010 nos três viveiros-tipo. As diferenças mais notórias foram entre baixa-mar e preia-mar nos três viveiros estudados, independentemente da sua localização e proximidade de fontes antropogénicas. Esta situação aponta para a importância da maré na diluição dos valores registados em áreas confinadas da Ria, como é o caso dos viveiros A e B. Para além disso, registaram-se aumentos substanciais dos níveis de nitrato, amónia e silicatos em Dezembro de 2010. Os aumentos foram mais acentuados no viveiro B, sugerindo uma maior influência das fontes difusas associadas às escorrências. Os valores de clorofila *a* foram relativamente baixos, dada a época de amostragem (Inverno).

Estes valores foram comparados com as medianas e os percentis 25% e 75% obtidos para a Ria Formosa, com base em amostragens nas massas de águas definidas no âmbito da Directiva-Quadro da Água (Tabela 3 e Figura 2). A maioria dos valores registados nos viveiros encontra-se no intervalo de percentis 25 a 75%. Contudo, os valores mais elevados de nitrato, amónia, silicato e fosfato (amostragem de Dezembro 2010 e no viveiro B) estão fora destes intervalos, em resultado do efeito das fontes difusas ou eventualmente localizadas.

Tabela 4 – Níveis de nutrientes ( $\mu\text{M}$ ) e clorofila *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em águas de superfície dos três viveiros-tipo; situação de preia-mar (PM) e baixa-mar (BM).

Viveiro	Data	Situação de maré	NH <sub>4</sub> ( $\mu\text{M}$ )	NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{M}$ )	NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Si(OH) <sub>4</sub> ( $\mu\text{M}$ )	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu\text{M}$ )	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
A	24 Nov 10	BM	4.3	5.6	0.18	6.2	0.43	1.2
		PM	1.9	1.1	0.05	1.3	0.22	0.53
	13 Dez 10	BM	4.1	6.3	0.30	4.2	0.38	0.53
		PM	5.6	4.5	0.23	4.1	0.39	1.1
B	24 Nov 10	BM	14	2.5	0.66	2.9	0.43	2.1
		PM	3.1	1.1	0.12	9.4	0.32	1.3
	13 Dez 10	BM	11	10	0.82	15	0.72	2.0
		PM	4.3	11	0.25	12	0.58	2.7
C	24 Nov 10	BM	3.1	0.56	0.07	4.7	0.19	0.80
		PM	1.7	1.9	0.12	6.4	0.37	1.6
	13 Dez 10	BM	5.9	7.5	0.22	8.9	0.40	2.7
		PM	1.6	5.4	0.35	4.3	0.22	2.9



#### **QUASUS Qualidade Ambiental e Sustentabilidade dos Recursos Biológicos da Ria Formosa**

As determinações de contaminantes químicos estão em curso e, portanto, não serão apresentadas neste relatório. Como já foi referido anteriormente, devido à ausência de concentrações elevadas de algas tóxicas nas zonas de produção da Ria, não foram realizadas colheitas e determinações de biotoxinas em amostras de águas colhidas nos viveiros-tipo.

### 3. Reuniões

Descrição	Entidades	Data
Apresentação EXPOMAR	IMAR/IPIMAR	29/04/2010
Reunião interna	IMAR/IPIMAR/ Cooperativa RF	19/05/2010
Reunião interna	IMAR/IPIMAR/ARH	15/12/2010
Visita aos viveiros	IMAR/IPIMAR/ Cooperativa RF	22/09/2010
Reunião plenária	Todos	20/01/2011
Visita aos viveiros	IMAR/IPIMAR/ Cooperativa RF	21/01/2011
Workshop internacional	Todos/Convidados internacionais	21-22/02/2011
Visita aos viveiros	IMAR/IPIMAR/ Cooperativa RF/Convidados internacionais	22/02/2011

## Referências

- Banha, M., 1984. Aspectos da biologia (crescimento e reprodução) de *Ruditapes decussatus* Lineu, 1789 (Mollusca, Bivalvia) na Ria Formosa-Algarve. Relatório Estágio de Licenciatura em Biologia, Faculdade de Ciências de Lisboa, Portugal, 119p.
- Bayne, B., Newell, R., 1983. Physiological energetic of marine molluscs. In: Wilbur, K.M., Saleuddin, A.S.M. (Eds.), *The Mollusca, Physiology* 4 (1). Academic Press, New York, 407-515.
- Botelho M.J., Vale C., Mota A.M., Simões Gonçalves M.L.S. 2010a. Depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Gymnodinium catenatum*: laboratory and field experiments. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 2269–2275.
- Bricelj, V., Shumway, S., 1991. Physiology: energy acquisition and utilization. In: Shumway, S.E. (Eds.), *Scallops: biology, ecology and aquaculture*, 21. Elsevier, Amsterdam, 305–346.
- Donovan, T.J., Gallacher, S., Andrews, N.J., Greenwood, M.H., Graham, J., Russell, J.E., Roberts, D., Lee, R., 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve mollusks. *Communicable Disease and Public Health* 1 (3), 188-196.
- European Commission 2004. Regulation (EC) no. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. Off. J. Europe Communities L226, 22–82.
- Falcão, M., 1997. Dinâmica dos nutrientes na Ria Formosa: efeitos da interação da laguna com as suas interfaces na reciclagem do azoto, fósforo e sílica. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, Portugal, 223 p.
- Falcão M., Vale C., 2003. Nutrient dynamics in a coastal lagoon (Ria Formosa, Portugal: the importance of lagoon-sea water exchanges on the biological productivity. *Sciencias Marinas* 29, 49-58.
- Falcão M., Caetano M., Serpa D., Gaspar M., Vale C., 2006. Effects of infauna harvesting on tidal flats of a coastal lagoon (Ria Formosa-Portugal): implications on phosphorus dynamics. *Marine Environmental Research*, 61, 136-148.
- Fernandez Castro. N., Vido De Mattio, N., 1987. Biochemical composition, condition index, and energy value of *Ostrea puelchana* (d'Orbigny): Relationships with reproductive cycle, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 108, 113-126.
- Kraeuter, J., Castagna, M., 1989. Factors affecting the growth and survival of clam seed planted in the natural environment. In: Manzi, J.J., Castagna, M., (Eds.) *Clam Mariculture in North America*, Elsevier, Amsterdam, 149-165.
- Lawrence, J.F., Menard, C., Charbonneau, C.F., 1991. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International* 74, 404-409.

Lorenzen, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Research* 13, 223-227.

Marin, M., Moschino, V., Deppieri, M., Luccheta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice. *Aquaculture* 219, 859-871.

Matias, D., 2007. A cultura da amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*, L., 1758) em viveiros da Ria Formosa: Avaliação do crescimento e qualidade face a diferentes condições de cultura e situações ambientais. Dissertação apresentada no L-IPIMAR para obtenção à categoria de Assistente de Investigação, Olhão, 96pp.

Pereira P., de Pablo H., Carvalho S., Vale C., Pacheco M. 2010. Daily availability of nutrients and metals in a eutrophic meso-tidal coastal lagoon (Óbidos lagoon, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 60, 10, 1868-1872.

Quilliam, M.A., Xie, M., Hardstaff, W.R., 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *Journal of AOAC International* 78, 543–554.

Ruiz, C., Abad, M., Rodriguez, T., Sanchez, J., 1990. Variacion estacional en la condicion, actividade reproductora y composición bioquímica en *Crassostrea gigas* (Thunberg). Actas III Congreso Nac. Acuicult., 421-426.

Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS—a widespread phenomenon. *Toxicon* 40, 33-42.

Vale P., Botelho M.J., Rodrigues S.M., Gomes S.S., Sampayo M.A.M. 2008. Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986-2006): a review of exposure assessment. *Harmful Algae* 7: 11-25.

## ANEXO I - Metodologias analíticas e de observação

### 1. Parâmetros ligados à qualidade da água

**Temperatura, salinidade, pH e oxigénio dissolvido.** A temperatura, salinidade, pH e oxigénio dissolvido foram medidos *in situ* com uma sonda multiparamétrica.

**Concentração de sólidos em suspensão.** As amostras de água foram filtradas através de membranas de polycarbonato com porosidade de 0.45  $\mu\text{m}$  e secas a 40 °C até peso constante. A concentração de matéria particulada em suspensão foi calculada como sendo a massa de partículas retidas na membrana por unidade de volume ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

**Nutrientes.** As amostras de água foram filtradas através de membranas Nuclepore (MSI) com 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidade e conservadas no frio. Os nutrientes dissolvidos foram determinados por colorimetria num autoanalisador TRAACS 2000: amónia, nitrito e nitrato, com limite de detecção de 0.001  $\text{mg L}^{-1}$  e silicato e fosfato, com um limite de detecção de 0.003  $\text{mg L}^{-1}$ . Os compostos de azoto foram oxidados em meio alcalino enquanto que os compostos de fósforo oxidados em meio ácido. Posteriormente procedeu-se à sua determinação por titulação colorimétrica no referido autoanalisador. Na determinação da amónia, os iões presentes na amostra reagem com fenol e hipoclorito em meio alcalino, seguindo a reacção de Berthelot. O citrato de trissódio e o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) são adicionados à amostra para evitar a precipitação dos hidróxidos alcalinos, enquanto que o nitroprussido age como catalisador. O indofenol azul foi medido a 660 nm. Na determinação do nitrito, este composto reage com o sulfanilamido e o ácido N-(1-naftil)-etilenodiamino em meio ácido originando sal diazonium, colorido, que é medido a 550 nm. Na determinação do nitrato, os nitratos presentes na amostra foram reduzidos a nitrito numa coluna de cádmio, num meio tampão. Os nitritos formados reagem com o sulfanilamido e o ácido N-(1-naftil)-etilenodiamino em meio ácido originando sal diazonium, colorido, que é medido a 550 nm. Na determinação do fosfato, os iões ortofosfato reagem com o molibdato em meio ácido para formar fosfomolibdato e depois com o ácido ascórbico para formar molibedénio azul, cuja intensidade é medida a 880 nm ou 660 nm (Falcão e Vale, 2003).

**Clorofila *a*.** Após a colheita, as amostras de água foram filtradas através de filtros *Whatman GF/F* 45mm diâmetro e porosidade 0.7  $\mu\text{m}$ , colocados os filtros em tubos de polipropileno, congelados de imediato e transportados para o laboratório. Posteriormente foram extraídos com acetona a 90 %, durante 24h no frio e centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 min. A

determinação da clorofila *a* foi realizada em espectrofotómetro antes e após acidificação dos extractos com HCl (0.5M) e as leituras efectuadas a 750 nm e 664 nm (Lorenzen, 1967).

**Metais nas Fracção Dissolvida.** Para a determinação de Ni, Cu, Cd e Pb na fracção dissolvida recolheram-se cerca de 2 L de água em frascos descontaminados com HNO<sub>3</sub> (20%) e posteriormente com HCl (20%) onde se colocou durante 48 horas uma unidade DGT (*diffusive gradient in thin film*), a temperatura constante. O processo de extracção de cada unidade DGT corresponde à difusão dos metais dissolvidos (fracção <0.45 µm) através de uma membrana de nitrato de celulose e retenção em resina quelante. Posteriormente, esta resina foi eluída numa solução de HNO<sub>3</sub> e determinados os teores de metais por ICP-MS (Pereira et al, 2010).

## **2. Parâmetros ligadas à produção das amêijoas**

**Sobrevivência.** Antes de se proceder à montagem do ensaio e atendendo que se pretendia efectuar uma cultura com uma densidade de juvenis de amêijoa de 1Kg.m<sup>-2</sup>, foram retiradas cinco amostras de 1 kg do total de indivíduos existente para repovoar cada viveiro e quantificado o número médio de indivíduos existentes por Kg de juvenis. Em cada amostragem mensal seleccionou-se aleatoriamente 2 quadrículas de 1x1m e foi efectuada a recolha da totalidade dos juvenis existentes em cada. quadrícula. A diferença entre o número de juvenis colocados no tempo 0 e em cada um dos tempos amostrados permitiu determinar a taxa de sobrevivência.

**Crescimento.** O crescimento em peso, comprimento (maior distância no sentido antero-posterior), altura (maior distância no sentido dorso-ventral, passando pelo umbo) e espessura (maior distância entre as duas valvas) foi quantificado em 50 indivíduos mensalmente, em cada viveiro.

## **3. Parâmetros ligados à qualidade das amêijoas**

***E. coli* e coliformes totais.** A análise microbiológica dos bivalves é efectuada no dia da recolha das amostras. É utilizado o número suficiente de amêijoas até se atingirem as 80g de carne e líquido intervalvar. Utiliza-se a técnica da fermentação dos tubos múltiplos, com séries de cinco tubos pelo método do Número Mais Provável (NMP; Donovan et al., 1998). Os ensaios são realizados em duplicado.

Para a prova presuntiva, semeiam-se 10 ml da suspensão-mãe em cada tubo de uma série de cinco tubos contendo o caldo de glutamato modificado com minerais (meio MMGB) em concentração dupla. Inocula-se 1 mL da suspensão-mãe nos cinco tubos contendo o meio MMGB em concentração simples e 1 mL das diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> noutras séries de cinco

tubos com o mesmo meio. Os tubos são colocados numa estufa de incubação a 37°C durante 24h. Consideraram-se suspeitos (e positivos) os tubos que apresentaram turvação e alteração da cor lilás do meio para amarelo, indicando viragem do pH devido à produção de ácido.

Os tubos com reacção positiva são sujeitos a prova de confirmação. Repicaram-se os tubos com ansas de 10µl para placas com meio Agar de triptona biliar x-glucoronídeo (TBX) e com meio Agar ChromoCult® Coliform (CHR). Incubam-se as placas com meio TBX na estufa de 44°C e as com meio CHR a 36°, durante 24h.

Nas placas com meio TBX, o crescimento de colónias azuis/esverdeadas indica a presença de *Escherichia coli*. Nas placas com meio CHR, o crescimento de colónias de cor vermelha ou rosadas indica a presença de bactérias coliformes e o crescimento de colónias de cor violeta escuro a presença de *E. coli*. Reportam-se as secções consideradas positivas aos tubos de MMGB e anota-se o número de tubos com reacção positiva. A partir da tabela do NMP lê-se o número de organismos presentes em 100g de amostra.

**Biotoxinas marinhas.** As determinações foram efectuadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (DSP), com detecção fluorimétrica (PSP) e com detecção por ultra-violeta (ASP). Após a amostragem os moluscos bivalves foram dissecados e preparadas amostras compostas (n=30) com a totalidade dos tecidos. As metodologias utilizadas para a extracção das toxinas, determinação das concentrações dos diferentes compostos e conversão para valores de toxicidade encontram-se descritas em Vale e Sampayo (2002) para DSP, em Lawrence et al. (1991) e Botelho et al. (2010) para PSP e Quilliam et al. (1995) para ASP. Os limites de detecção para os diferentes grupos de compostos foram os seguintes: 18 µg ácido ocadáico equiv. por Kg tecido; 19 µg saxitoxina equiv. por Kg tecido e 0.8 µg ácido domóico por g tecido.