

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

Projecto QUASUS

Terceiro Relatório de Progresso

Qualidade do Ambiente e dos Bivalves:

Dados Experimentais e Comparação com Dados Históricos

Carlos Vale, Domitília Matias, Florbela Soares, Maria João Botelho, Miguel Caetano, Ana

Catarina Almeida, Maria de Lurdes Santos



Período: 16.01.2011 a 31.12.2011

Data de início do projecto: 15.01.2010

Índice

1. Sumário executivo - Objectivos	3
2. Ensaio experimentais	3
2.1. Amostragem	4
3. Resultados e Discussão	4
3.1. Nutrientes e clorofila <i>a</i> : dados experimentais	4
3.2. Nutrientes e clorofila <i>a</i> : comparação com dados históricos	8
3.3. <i>Escherichia coli</i> em amêijoas dos viveiros: dados experimentais	10
3.4. <i>Escherichia coli</i> em amêijoas dos viveiros: comparação com dados históricos	12
3.5. Toxinas marinhas em bivalves: dados experimentais	15
3.6. Toxinas marinhas em bivalves da Ria Formosa: comparação com dados históricos	16
3.7. Contaminantes químicos acumulados nas amêijoas: dados experimentais e comparação com dados históricos	17
3.8. Sobrevivência de amêijoas em viveiros: dados experimentais	19
3.9. Sobrevivência de amêijoas em viveiros: comparação com dados históricos	20
3.10. Factores explicativos para a mortalidade anormal das amêijoas	21
4. Considerações finais	24
Referências	25
Anexo I - Metodologias analíticas e de observação	27

1. Sumário executivo - Objectivos

Este relatório apresenta os resultados obtidos nos ensaios experimentais realizados nos três viveiros seleccionados na Ria Formosa. Apresenta-se informação sobre a qualidade das amêijoas para as condições existentes nos três viveiros sujeitos a potenciais pressões resultantes das actividades humanas. Para além disso, comparam-se estes resultados com dados históricos sobre a Ria Formosa examinando possíveis efeitos da redução das pressões antropogénicas na concentração de nutrientes e clorofila *a* nas águas da Ria e na acumulação de contaminantes químicos. A ocorrência de toxinas em bivalves e a classificação microbiológica das zonas de produção de bivalves na Ria é também discutida. Equacionam-se prováveis razões para a mortalidade anormal das amêijoas nos viveiros da Ria Formosa. Este trabalho beneficiou de sinergias com o projecto FORWARD e das reuniões com elementos da Polis da Ria Formosa, profissionais do sector da aquicultura, ARH, Parque da Ria Formosa e Administração.

2. Ensaios experimentais

Os locais onde decorreram os ensaios experimentais são assinalados na figura 1. O viveiro A situa-se em Marchil, perto da cidade de Faro, o viveiro B fica perto da Estação de Piscicultura do IPIMAR, em Olhão, e o viveiro C na zona designada por Fortaleza, perto da Barra do Lavage da Ria Formosa. Estes viveiros foram seleccionados com vista avaliar o efeito da descarga de efluentes urbanos na área de reduzida circulação de água (viveiro A), das rejeições provenientes da Estação de Piscicultura do IPIMAR (viveiro B) e de uma zona de elevado hidrodinamismo situada na proximidade do mar (viveiro C).

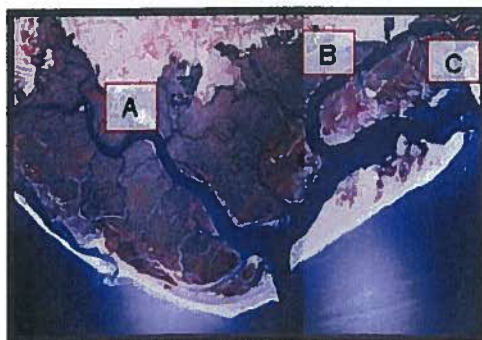


Figura 1. Localização dos viveiros-tipo.

2.1. Amostragem

As amêijoas transplantadas para estes viveiros foram recolhidas mensalmente entre Novembro de 2010 a Outubro de 2011 (Tabela 1). Nos mesmos viveiros foram realizadas recolhas de água para a determinação de parâmetros físico-químicos nos meses de Novembro, Março, Agosto e Outubro. As metodologias analíticas e de medições *in situ* são apresentadas no Anexo 1.

Tabela 1. Datas de amostragens de amêijoa (*Ruditapes decussatus*) nos viveiros A, B e C.

	Datas de Amostragem									
Viveiro	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
A	24-Nov	04-Jan	07-Fev	22-Mar	5-Abr	3-Mai	2-Jun	3-Ago	12-Set	26-Out
B	25-Nov	05-Jan	07-Fev	23-Mar	5-Abr	3-Mai	2-Jun	3-Ago	14-Set	27-Out
C	25-Nov	05-Jan	09-Fev	23-Mar	5 -Abr	4-Mai	1-Jun	2-Ago	12-Set	26-Out

3. Resultados e Discussão

3.1. Nutrientes e clorofila *a*: dados experimentais

Os valores dos nutrientes e clorofila *a* foram determinados em amostras de água colhidas nos viveiros em situação de preia-mar e no canal próximo em baixa-mar seguindo as metodologias descritas no Anexo I.

Compostos azotados. A figura 2 mostra a concentração de fosfato e de azoto inorgânico dissolvido (DIN), calculada como a soma dos valores de nitrato, nitrito e amónia nos três viveiros em situação de baixa-mar e preia-mar em Novembro de 2010, Março, Agosto e Outubro de 2011. Esta representação ilustra a variação sazonal de nutrientes, com valores mais elevados no Inverno, devido ao menor consumo pelos produtores, ao efeito de descargas associadas à maior pluviosidade e a fontes difusas. Observou-se ainda um acentuado decréscimo em Março, que deve resultar do maior consumo pelos produtores. Na Primavera e Verão os valores mantiveram-se baixos. Salientam-se as diferenças entre as concentrações de

nutrientes registadas entre as duas situações de maré, sugerindo que os incrementos em baixa-mar resultam de escurrências através da zona intertidal durante a vazante. Os valores mais baixos registados em preia-mar indicam a diluição dos nutrientes com a mistura com a água proveniente da zona costeira durante a enchente.

Fósforo. As diferenças entre baixa-mar e preia-mar e a variação sazonal foram menos acentuadas no caso dos fosfatos. Tal como observado para o DIN registou-se também um decréscimo em Março. No entanto, as concentrações de fosfatos em Agosto e Outubro de 2011 foram superiores às registadas em Novembro de 2010, contrariamente ao observado para os compostos azotados. Esta diferença está em concordância com trabalhos anteriores que apontam para a maior libertação de fósforo dos sedimentos durante os meses do Verão em consequência de menor concentração de oxigénio dissolvido na interface sedimento-água (Falcão, 1997). A similaridade de concentrações entre baixa-mar e preia-mar sugere um menor input durante a vazante com a escurrência da zona intertidal.

Regeneração de nutrientes. Estes resultados reforçam a hipótese formulada em trabalhos anteriores sobre a importância da regeneração de nutrientes nos sedimentos (Falcão e Vale, 2003; Falcão et al, 2006). Apesar da importância das trocas entre a Ria e a zona costeira, a disponibilidade de nutrientes nos viveiros parece ser fortemente influenciada por processos de menor escala, como a regeneração de nutrientes nos sedimentos e a transferência através das águas de escurrência da zonas intertidais, que durante a vazante drenam para os canais. A importância destes processos foi registada nos três viveiros apesar das diferenças na natureza do substrato e teor em matéria orgânica.

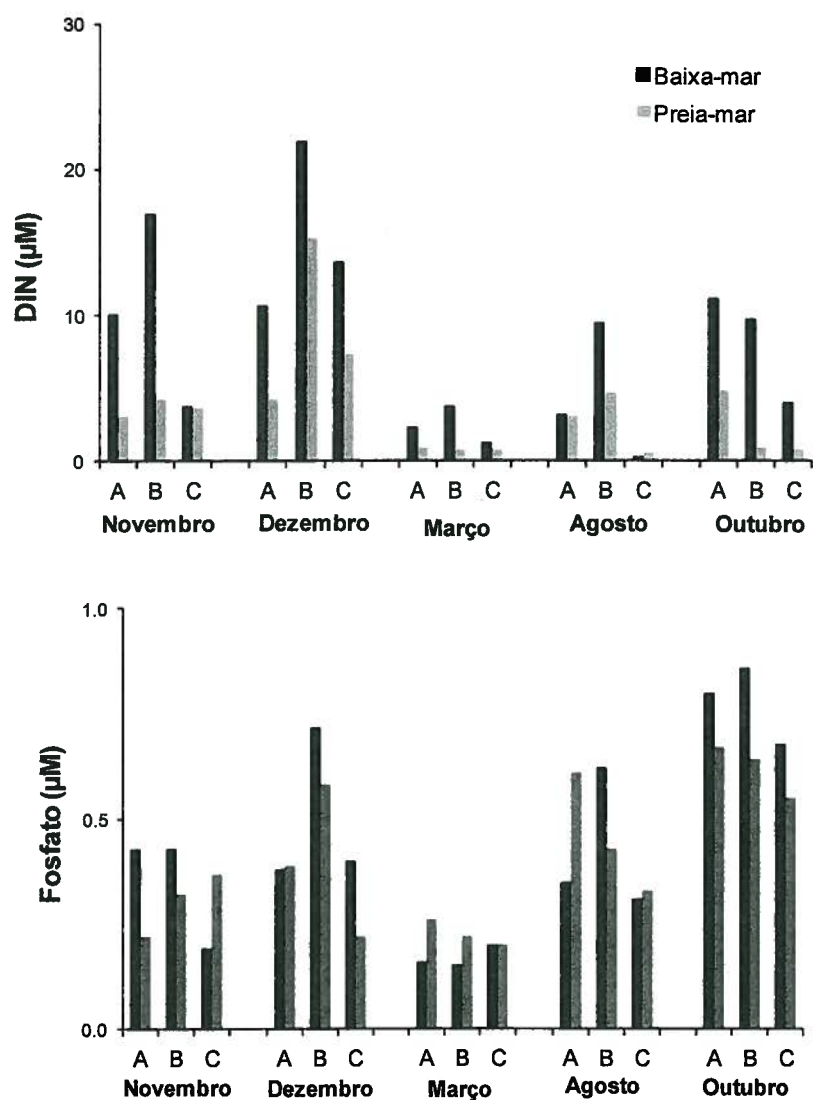


Figura 2. Concentrações de azoto inorgânico dissolvido (DIN)(μM) e fosfato (μM) em água superficial nos viveiros A, B e C; situação de baixa-mar e preia-mar.

Clorofila *a*. A figura 3 mostra as variações registadas na clorofila *a* nos três viveiros e nas duas situações de maré. Em concordância com o baixo teor de nutrientes observou-se em aumento acentuado de clorofila *a* em Março de 2011, justificando assim o seu consumo na coluna de água. Também se registaram valores mais elevados em baixa-mar sugerindo que as águas de escorrência arrastam microfítobentos dos sedimentos enriquecendo a coluna de água em material planctónico. Estas diferenças foram mais acentuadas em Março de 2011 quando a produção primária foi mais elevada. Tal como observado nos nutrientes não se observaram

diferenças entre os três viveiros, embora a localização dos viveiros A e B sugiram maior impacto das descargas de actividades humanas e maior acumulação de microalgas. A ausência desta situação aponta para uma dinâmica de nutrientes e uma produção mais influenciada por processos naturais.

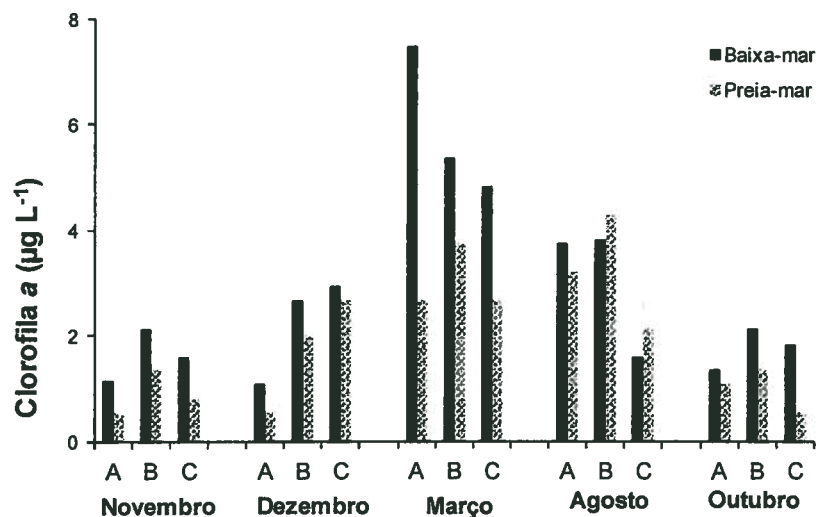


Figura 3. Níveis de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) em água superficiais nos viveiros A, B e C; situação de baixa-mar e preia-mar.

Razão DIN/P. Com vista a examinar qual dos nutrientes, azoto ou fósforo, é limitante para a produção, foi calculada a razão molar entre DIN e P e comparado com o valor teórico de Redfield (16). A variação temporal da razão DIN/P nos viveiros mostra claramente um padrão sazonal. Verificou-se um excesso de azoto no Inverno relativamente ao fósforo, enquanto na Primavera e Verão houve défice de azoto. Esta variabilidade indica um incremento de fósforo que não foi acompanhado pelo aumento de azoto. Este contraste foi mais pronunciado nos viveiros A e B, indicando que a água destes viveiros é deficientes em azoto, com excepção do Inverno em que as fontes difusas e as escorrências do sedimento intertidal são ricas neste elemento. O excesso de azoto pode ser reduzido em anos de seca, por diminuir a importância das fontes difusas.

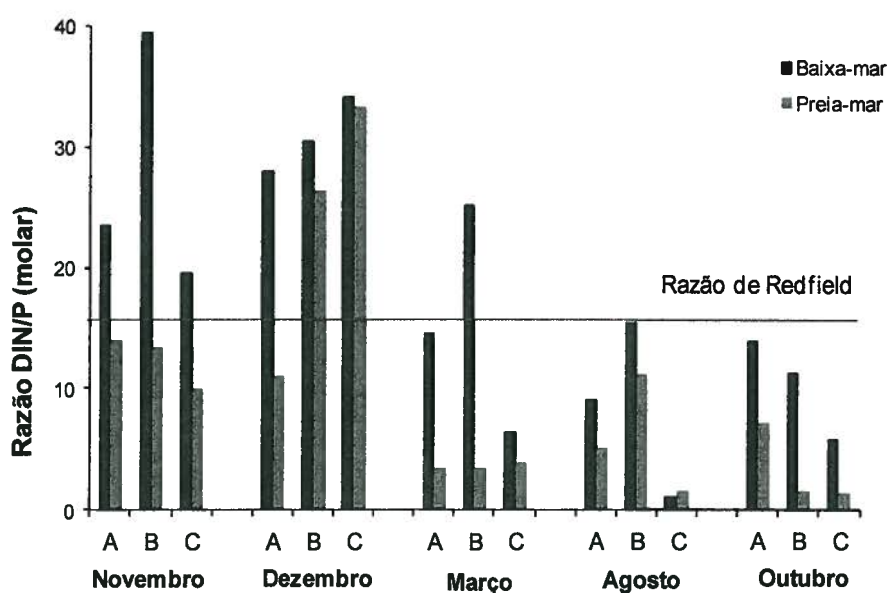


Figura 4. Razão molar de azoto inorgânico dissolvido (DIN) e fosfato em água superficial dos viveiros A, B e C; situação de baixa-mar e preia-mar.

3.2. Nutrientes e clorofila *a*: comparação com dados históricos

No passado a Ria era receptora de efluentes urbanos com tratamento preliminar, a par da rejeição de desperdícios provenientes de pequenas actividades industriais. Presentemente existe um tratamento de efluentes urbanos e as descargas de nutrientes são controladas. Apesar de outras modificações puderem ter alterado as concentrações de nutrientes, como a produção primária, o tipo de coberto vegetal, a produção de amêijoas, etc., foi considerado interessante comparar os dados obtidos nos ensaios realizados no âmbito deste projecto com dados históricos obtidos pelo IPIMAR.

Razão DIN/P. Usaram-se dados de DIN e P registados em 1986 e 1992 do viveiro C em situação de baixa e preia-mar. Para os mesmos períodos anuais foram comparadas as razões DIN/P (Fig. 5). Observou-se o mesmo padrão sazonal com valores mais elevados em Novembro e acentuadas diferenças entre baixa-mar e preia-mar. A comparação das condições no viveiro C, mais próximo na barra, indica um défice de azoto, apenas superado no período das chuvas quando as fontes difusas são mais activas.

Clorofila *a*. Nas mesmas condições foi também feita a comparação dos valores de clorofila *a* (Fig. 6). Apesar das alterações ocorridas na Ria Formosa nas últimas décadas, não se encontraram diferenças substanciais nos valores deste parâmetro indicador da produção fitoplanctónica entre as condições actuais e há 25 anos. Estas comparações podem ser interpretadas face à predominância dos processos naturais na Ria para a produção primária.

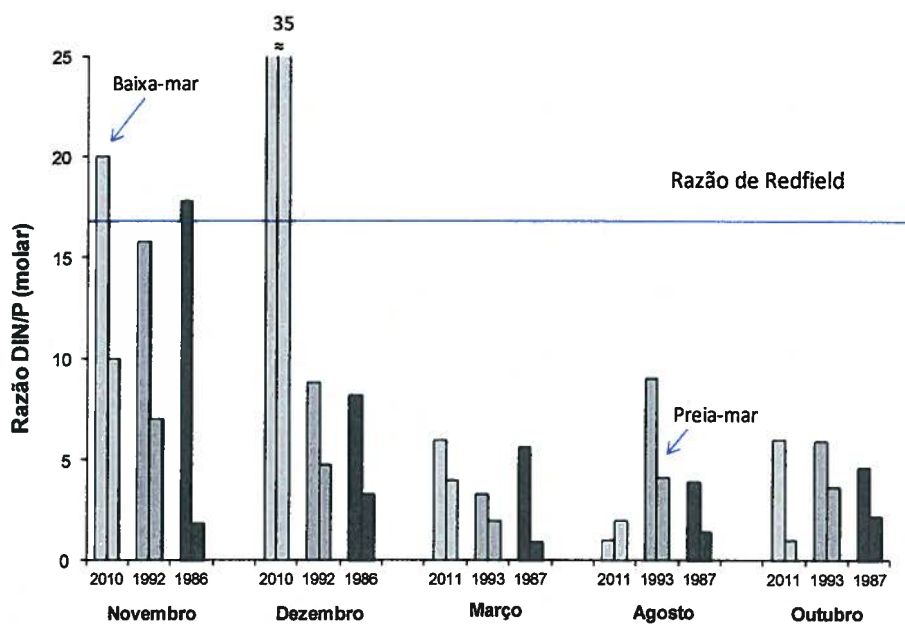


Figura 5. Razão molar de azoto inorgânico dissolvido (DIN) e fosfato em água superficial do viveiro C ; anos 2010/2011, 1992/1993 e 1986/1987; situação de baixa-mar e preia-mar.

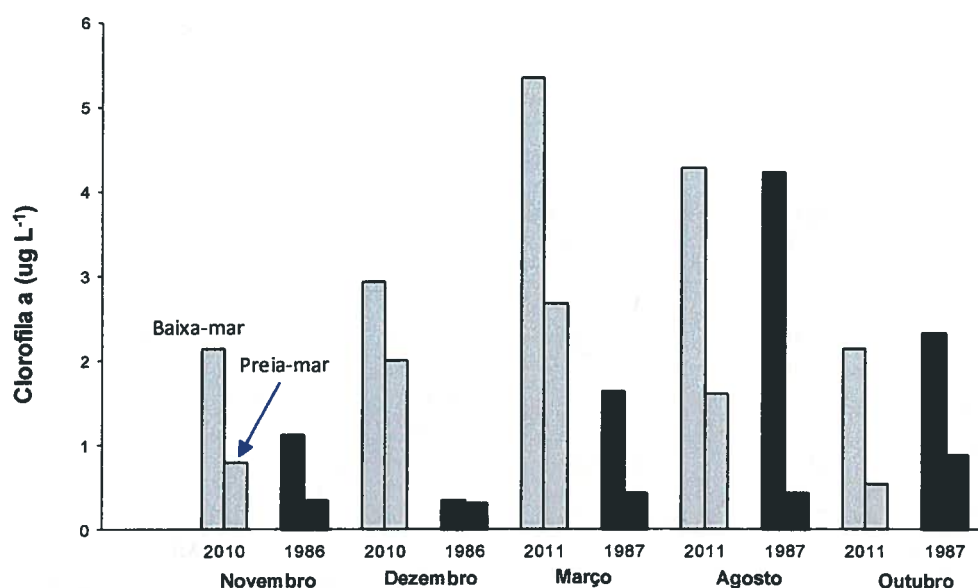


Figura 6. Níveis de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) em água superficial no viveiro C; anos 2010/2011, 1992/1993 e 1986/1987; situação de baixa-mar e preia-mar.

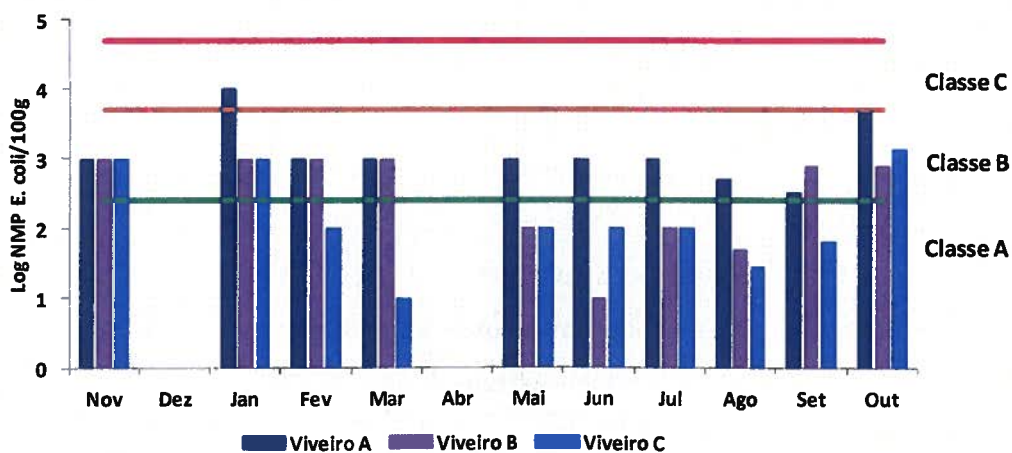
3.3. *Escherichia coli* em amêijoas dos viveiros: dados experimentais

Classificação microbiológica para comercialização de bivalves. O controlo da salubridade dos moluscos bivalves vivos é relevante, dado que os surtos de infeções e intoxicações causados pelo consumo de bivalves contaminados com microrganismos patogénicos bacterianos 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 de moluscos bivalves. Esta classificação é efectuada em categorias ou estatuto sanitário, de acordo com os teores bacteriológicos encontrados (Tabela 2). Desde 2005 a União Europeia recomenda que esta classificação se baseie no teor de *Escherichia coli* (*E. coli*). Esta classificação permite avaliar o grau de contaminação fecal existente nas diferentes zonas de produção de bivalves, assim como determinar o tipo de tratamento necessário para a posterior comercialização. Actualmente toda a Ria Formosa está classificada como B, de acordo com os resultados obtidos no plano de amostragens efectuado às diferentes zonas de produção.

Tabela 2. Critérios microbiológicos para classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos de acordo com o Regulamento (CE) Nº854 (EU 2004).

Classes	Níveis Permitidos (Teor de <i>E. coli</i> /100g)	Ações necessárias
A	≤ 230 <i>E. coli</i> /100g de carne e líquido intervalvar	Centro de Expedição e Consumo Directo
B	$230 < E. coli \leq 4600$ /100g de carne e líquido intervalvar em 90% das amostras	Depuração e depois cumprir os requisitos da Classe A
C	$4600 < E. coli \leq 46000$ /100g de carne e líquido intervalvar	Indústria transformadora ou permanecer pelo menos 2 meses em zona de transposição
D	> 46000 <i>E. coli</i> /100g de carne e líquido intervalvar	Proibida a apanha

Níveis de *E. coli* em amêijoas dos viveiros. Os dados obtidos de *E. coli* para as determinações efectuadas nos ensaios experimentais nos viveiros A, B e C (zonas de produção de Faro e Olhão) que decorreram entre Nov. de 2010 e Out de 2011 são apresentados na figura 7. Os níveis oscilam entre valores das classes A e B, atingindo apenas uma amostra a classe C no Inverno. A figura 8 compara os valores médios dos teores de *E. coli* em amêijoas dos três viveiros durante este período anual de observações. Os valores no viveiro A são significativamente superiores aos encontrados no viveiro C, enquanto o viveiro B encontra-se numa situação intermédia de contaminação microbiológica.

**Figura 7.** Teores de *Escherichia coli* em amêijoas (*Ruditapes decussatus*) colhidas nos viveiros A, B e C, entre Novembro de 2010 e Outubro de 2011.

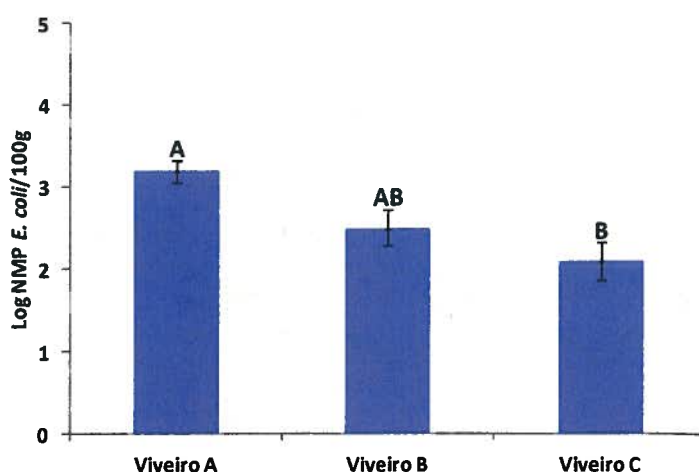


Figura 8. Teor médio de *Escherichia coli* em amêijoas (*Ruditapes decussatus*) colhidas nos viveiros A, B e C entre Novembro de 2010 e Outubro de 2011. As letras representam as diferenças significativas ($p < 0,05$).

Efeito da temperatura, radiação solar e pluviosidade. Com o aumento da temperatura da água no Verão, e presumivelmente da intensidade e duração da radiação solar, observou-se um decréscimo nos valores de *E. coli*. Apesar do aumento da população no período estival e, consequentemente do débito dos efluentes urbanos, registou-se uma diminuição nos teores de *E. coli* nas amêijoas. Estes dados sugerem o efeito bactericida da radiação solar e temperatura complementando o tratamento existente nas ETAR. No entanto, os teores de *E. coli* mais elevados foram observados nos meses de maior precipitação, especialmente nos viveiros mais próximos das cidades (viveiros A e B). Provavelmente estas variações dos teores resultam do efeito de fontes difusas, nomeadamente actividades agro-pecuárias, industriais, fossas, entre outras. Estas observações estão de acordo com dados anteriores que sugerem uma relação entre a contaminação microbiológica dos bivalves e os factores climáticos. Observaram-se níveis baixos de contaminação microbiana durante o período de seca extrema de 2004 e 2005, e níveis anormalmente elevados durante os meses de pluviosidade intensa (Almeida & Soares, 2012).

3.4. *Escherichia coli* em amêijoas dos viveiros: comparação com dados históricos

Com base em dados históricos existentes no IPIMAR foi feita uma análise da evolução do estatuto sanitário das zonas de produção de bivalves de Faro e Olhão entre 1990 e 2009.

Evolução do estatuto sanitário da zona de produção de Faro. A classificação desta zona de produção variou ao longo duas décadas entre a classe A, B e C, tendo maioritariamente sido classificada como B (Fig. 9). Os níveis de *E. coli* correspondentes à classe C foram mais comuns durante os anos 90, especialmente em 1998. Comparando os níveis de *E. coli* nos bivalves de Faro entre 1990 e 2009 (Fig. 10), verifica-se também que o ano em que se registaram os valores mais elevados foi em 1998, seguindo-se os restantes anos 90. Na década de 2000 observaram-se menores proporções de níveis de *E. coli* elevados, tendo sido obtido o valor mais baixo em 2008.

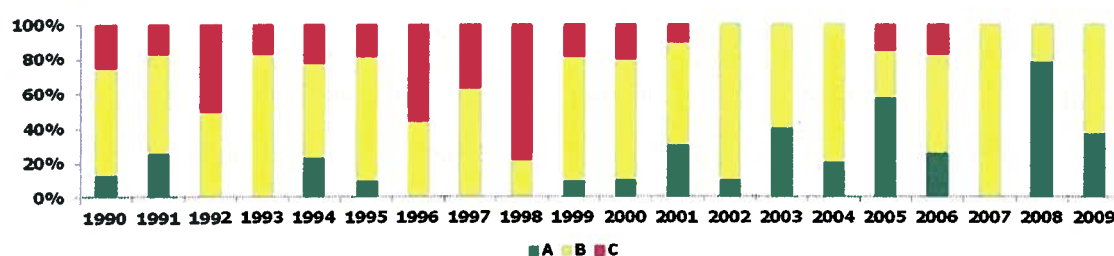


Figura 9. Evolução do estatuto sanitário (A, B e C) da zona de produção de Faro entre os anos 1990 e 2009. Os teores de *Escherichia coli* por classe são: A ≤ 230 NMP *E. coli*/100g, B > 230 e ≤ 4600 NMP *E. coli*/100g, C > 4600 e ≤ 46000 NMP *E. coli*/100g.

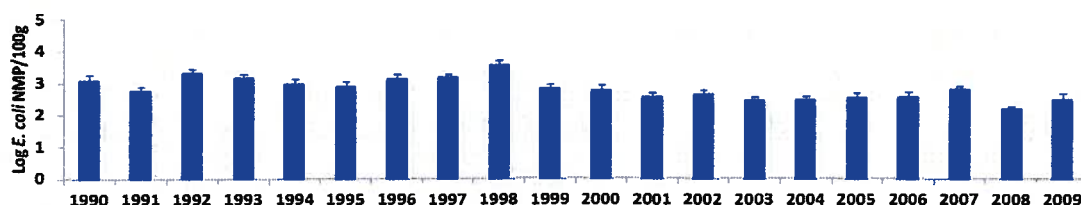


Figura 10. Variações anuais do teor de *Escherichia coli* (média \pm erro padrão) nos bivalves da zona de produção de Faro, entre os anos 1990 e 2009.

Evolução do estatuto sanitário da zona de produção de Olhão. A classificação desta zona variou entre A, B e C, tendo maioritariamente sido classificada como B (Fig. 11). Por diversas vezes a zona atingiu a classificação C, nomeadamente entre 1990 e 1992, em 1996, entre 2000 e 2002 e ainda entre 2005 e 2007. Relativamente às variações anuais dos níveis de *E. coli* nos bivalves de Olhão (Fig. 12), foram detectadas algumas diferenças significativas. Os valores mais altos verificaram-se em 1992 e 1996. Em 2003, 2004, 2008 e 2009 foram os anos em que se registaram os valores mais baixos.

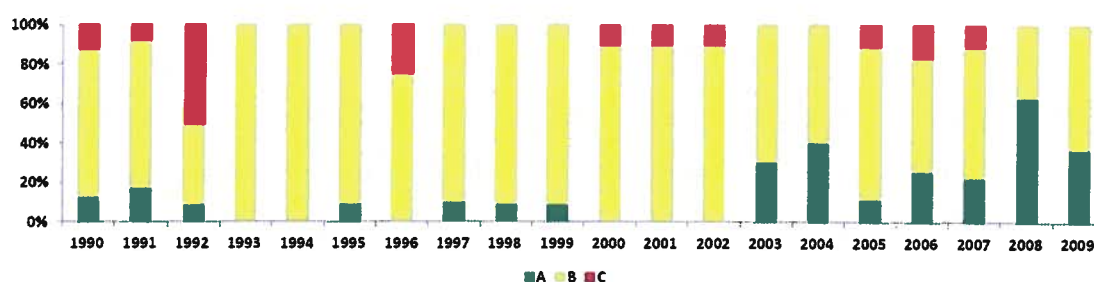


Figura 11. Evolução do estatuto sanitário (A, B e C) da zona de produção de Olhão entre os anos 1990 e 2009. Os teores de *Escherichia coli* por classe são: A ≤ 230 NMP *E. coli*/100g, B > 230 e ≤ 4600 NMP *E. coli*/100g, C > 4600 e ≤ 46000 NMP *E. coli*/100g.

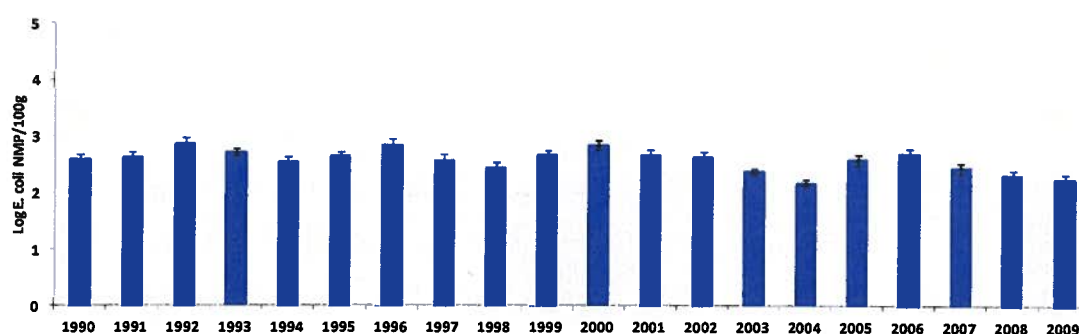


Figura 12. Variações anuais do teor de *Escherichia coli* (média \pm erro padrão) nos bivalves de Olhão, entre os anos 1990 e 2009.

Tendências. Os valores mais baixos de *E. coli* nos bivalves da Ria Formosa na monitorização do IPIMAR foram registados em 2004, parecendo existir uma tendência para a diminuição do seu teor nos últimos anos da década de 2000 em todas as zonas de produção definidas. Em 2002, o tratamento de águas residuais já abrangia 83% da população do Algarve. Nos últimos anos têm sido construídas e remodeladas várias ETAR, nomeadamente as existentes em Castro Marim, Tavira, Olhão e Faro, muitas já com tratamento secundário com desinfecção. Cachola & Campos (2006) verificaram também a diminuição da contaminação fecal nestes últimos anos em algumas zonas da Ria Formosa. Estes resultados apontam, portanto, para uma diminuição significativa da contaminação nos bivalves provenientes da região intermédia da laguna e das zonas mais próximas das barras ao longo da década de 2000, com a implementação e melhoramento das ETAR existentes no litoral algarvio. No entanto, para garantir a qualidade da água nas zonas de produção de bivalves na Ria Formosa é necessário uma redução das fontes de contaminação, tanto pontuais como difusas.

3.5. Toxinas marinhas em bivalves: dados experimentais

Monitorização de algas tóxicas e de toxinas marinhas em bivalves. O controlo da salubridade dos moluscos bivalves inclui também a determinação de toxinas marinhas, assim como vigilância das concentrações de algas tóxicas nas zonas de produção dos bivalves. O IPIMAR detém a responsabilidade deste programa de monitorização e possui competências sendo considerado o Laboratório de Referência Nacional. A comparação dos níveis de toxinas determinados nos bivalves com os limites máximos admissíveis, estabelecidos pela Comissão Europeia para os vários grupos de toxinas (EU 2004), permite desencadear acções de interdição de apanha e comercialização de bivalves nas zonas de produção quando estes limites são ultrapassados. Pretende-se, assim, proteger a saúde dos consumidores e garantir a qualidade dos produtos comercializados.

Níveis de toxinas marinhas em bivalves da Ria Formosa. No período a que se refere este Relatório registou-se a ocorrência de um *bloom* de dinoflagelados *Dinophysis acuminata* na zona costeira adjacente à Ria Formosa, no final de Março de 2011. Estas microalgas produtoras de toxinas lipofílicas do grupo diarreico (diarrhetic shellfish poisoning - DSP) foram responsáveis por níveis de ácido ocadáico e de dinofisistoxinas superiores aos limites máximos admissíveis detectados em amêijoas, berbigão e ostra de todas as zonas de produção da Ria Formosa. Houve, portanto, uma entrada de um elevado número de células desta alga no sistema lagunar. A figura 13 apresenta os dados de toxicidade por DSP em amêijoas, berbigão e ostra provenientes da Ria Formosa (zonas de produção de Faro e Olhão) obtidos também no âmbito do programa de monitorização de toxinas realizado pelo IPIMAR (Anexo 1 - Metodologias analíticas e observações). O limite de 160 µg ácido ocadáico (AO) equivalente por kg de tecido (EU 2004) foi ultrapassado em todas as espécies com excepção da ostra, tendo o berbigão atingido o valor mais elevado nas amostras analisadas durante o *bloom* algal. A ocorrência de toxinas nestas espécies de bivalves levou à interdição da apanha e comercialização para consumo humano durante três semanas de amêijoas com início em 1 de Abril de 2011. Esta interdição incluiu os viveiros A, B e C deste trabalho.

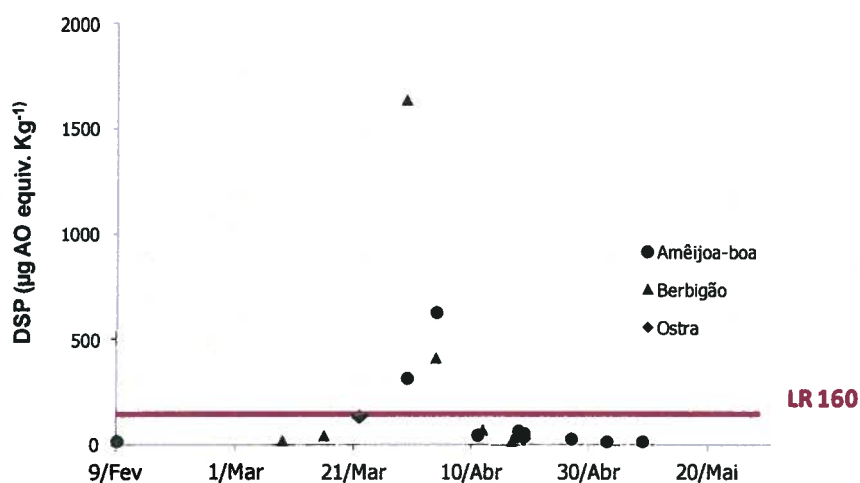


Figura 13. Níveis de DSP (diarrhetic shellfish poisoning) em amêijoa (*Ruditapes decussatus*), berbigão (*Cerastoderme edule*) e ostra (*Crassostrea* spp., *Ostrea* spp.) colhidos na Ria Formosa (zonas de produção de Faro e Olhão) entre Fevereiro e Maio de 2011.

3.6. Toxinas marinhas em bivalves da Ria Formosa: comparação com dados históricos

Período 2001-2010. A comparação dos dados de 2011 foi realizada com dados históricos do programa de monitorização de toxinas do IPIMAR referentes ao período entre 2001 e 2010. Os tipos de toxicidade mais frequentemente detectados foram DSP e PSP (paralytic shellfish poisoning) (Vale et al, 2008). Analisando os períodos de interdição nesta década verifica-se uma menor intensidade e duração curta relativamente a outras zonas de produção em Portugal. Na maioria dos anos, o limite regulamentar para toxinas diarreicas é apenas ligeiramente ultrapassado e por períodos muito curtos. A situação em 2011 foi diferente devido à interdição mais prolongada causada por DSP.

3.7. Contaminantes químicos acumulados nas amêijoas: dados experimentais e comparação com dados históricos

Zinco e Cobre. As concentrações de zinco e cobre, na parte edível das amêijoas colhidas nos viveiros A, B e C, entre Novembro de 2010 e Outubro de 2011, foram baixos em comparação com valores registados em outros ambientes lagunares ou estuarinos (Raimundo et al, 2011). Estes dados foram comparados com valores registados em amêijoas recolhidas nos mesmos locais em 1984 (Fig. 14). Apesar destes elementos serem essenciais para o metabolismo dos organismos, esta comparação mostra que, em 1984, a acumulação era superior à actual. Aqueles valores deverão estar relacionados com uma maior disponibilidade ambiental dos elementos existente no passado na Ria. Os valores actuais, mais baixos, são atribuídos a uma menor disponibilidade em resultado de uma redução da descarga de contaminantes químicos para a Ria. Vários factores podem ter contribuído para estas alterações, designadamente o tratamento mais eficaz dos efluentes urbanos, as alterações nos processos industriais incorporando preocupações ambientais e o eventual fecho de algumas actividades na zona. As diferenças entre os dois anos foram mais acentuadas no viveiro A provavelmente devido à proximidade da zona urbana/industrial da cidade de Faro.

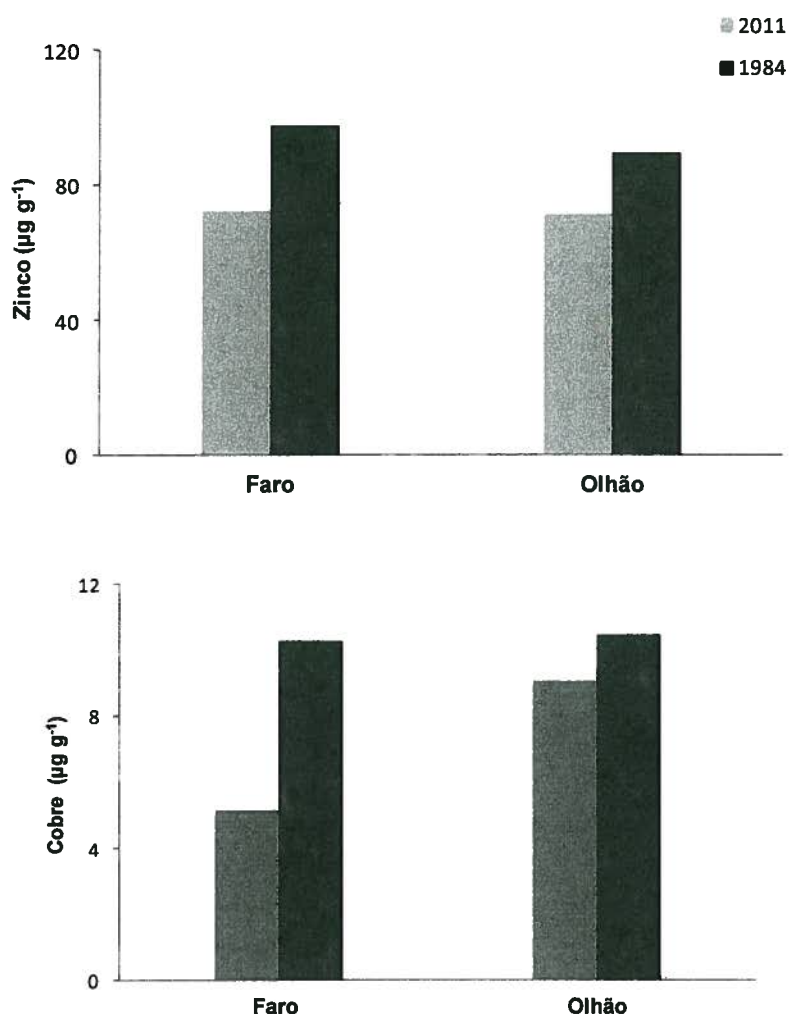


Figura 14. Níveis de zinco e cobre (μg por g tecido) na parte edível de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) colhidas nos viveiros A e B; anos de 1984 e 2011.

Chumbo e cádmio. As concentrações de chumbo e cádmio, na parte edível das amêijoas colhidas nos viveiros A, B e C, entre Novembro de 2010 e Outubro de 2011, foram inferiores aos valores recomendados para o consumo humano (EU 2006). Estes dados foram também comparados com valores registados em amêijoas recolhidas nos mesmos locais em 1984 (Fig. 15). Esta comparação mostra que, em 1984, a acumulação era superior à existente actualmente. Os valores deverão reflectir uma variação da disponibilidade ambiental destes elementos na Ria. Os valores actuais mais baixos são atribuídos a uma redução da descarga para a Ria. O tratamento mais eficaz dos efluentes urbanos, as alterações nos processos industriais incorporando preocupações ambientais, a eliminação da gasolina com aditivos de chumbo, e o eventual fecho de algumas actividades industriais na zona, são alguns dos

factores que podem ter contribuído para estas alterações. As diferenças de chumbo entre os dois anos foram mais acentuadas no viveiro A, dada a sua proximidade da cidade de Faro.

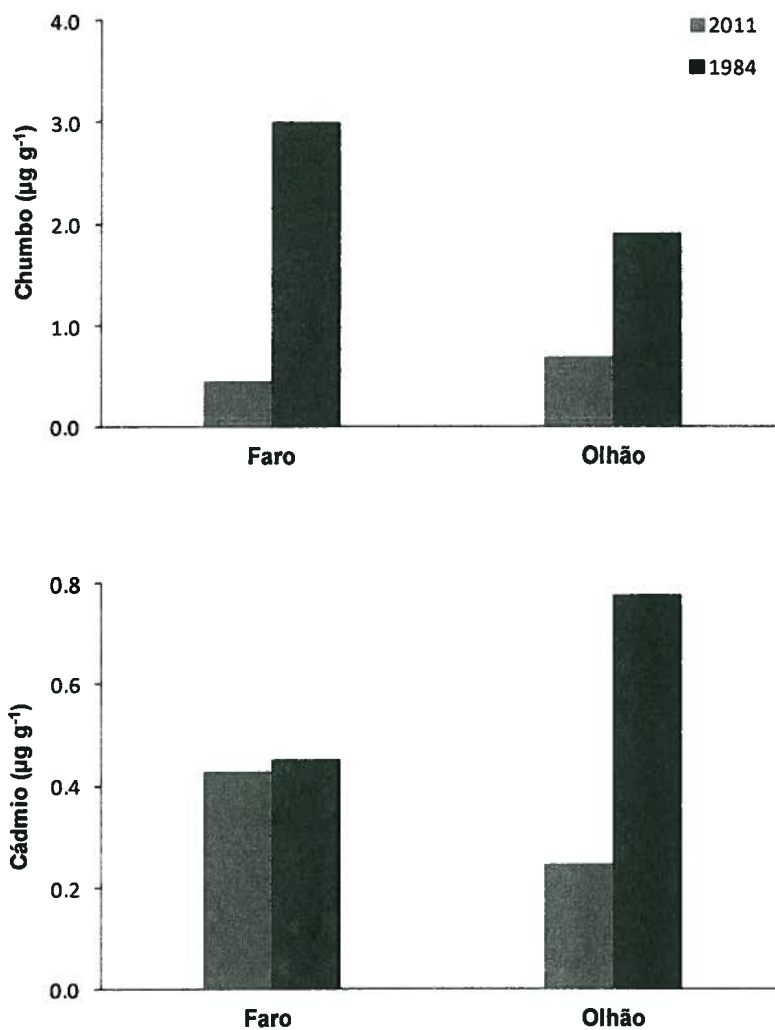


Figura 15. Níveis de chumbo e cádmio (μg por g tecido) na parte edível de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) colhidas nos viveiros A e B; anos de 1984 e 2011.

3.8. Sobrevivência de amêijoas em viveiros: dados experimentais

Esta secção apresenta os resultados relativos à sobrevivência das amêijoas transplantadas para os viveiros A, B e C durante o período de estudo. Os valores de sobrevivência obtidos nos três viveiros ao longo de um ano de amostragem encontram-se representados na figura 16. Nos viveiros A e B observou-se um decréscimo gradual dos valores ao longo do tempo, registando-

se sobrevivências de aproximadamente 20% no final do período experimental. No viveiro C, perto da barra, encontrou-se sobrevivência elevada no Inverno e Primavera (90-100%), seguido de um decréscimo acentuado apenas nos meses de Junho e Julho. No final da experiência registou-se uma sobrevivência próxima dos 40% dos valores iniciais.

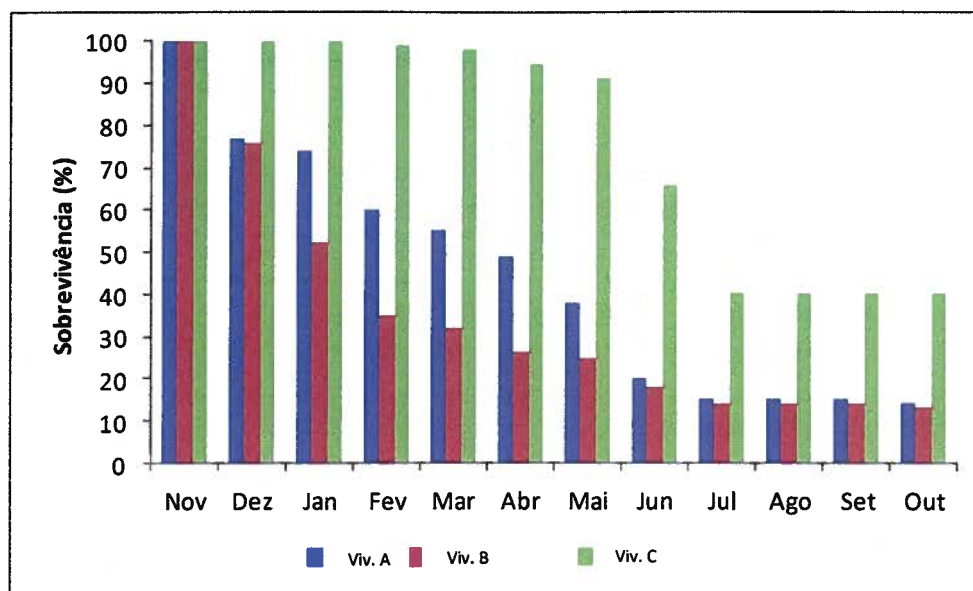


Figura 16. Percentagem de sobrevivência de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) transplantada para os viveiros A, B e C.

3.9. Sobrevivência de amêijoas em viveiros: comparação com dados históricos

Com vista a examinar se os níveis de sobrevivência registada durante os ensaios foram invulgares, compararam-se os valores de 2011 com os observados em 1997 e 1987 no viveiro B (Marim) durante períodos anuais (Fig. 17). Esta figura permite evidenciar a existência de um decréscimo acentuado nos valores de sobrevivência em 2011 (máx. 40%) relativamente aos dois anos usados como comparação, que apresentam sobrevivências máximas de 80% (1987) e 50% (1997).

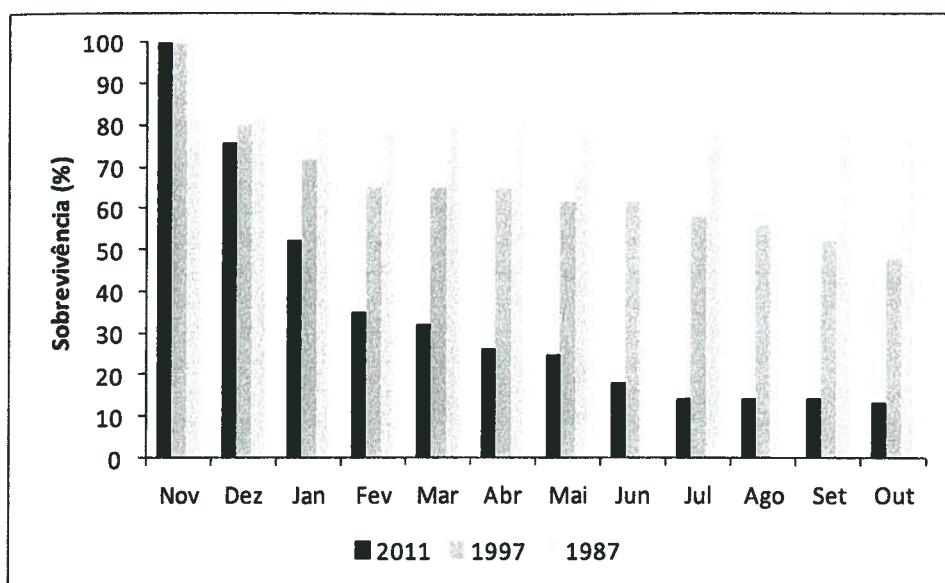


Figura 17. Comparação da percentagem de sobrevivência de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) em 2011, 1997, 1987 no viveiro B.

3.10. Factores explicativos para a mortalidade anormal das amêijoas

Os episódios de mortalidade de amêijoas na Ria Formosa são recorrente, embora a intensidade seja variável de ano para ano, provavelmente a conjugação de diversos factores de carácter biológico e ambiental.

Diminuição das reservas energéticas. O ciclo reprodutivo das amêijoas é caracterizado por um período de acumulação de reservas energéticas (glicogénio e lipídios) no Inverno utilizadas para o desenvolvimento dos gâmetas na Primavera (Banha, 1984). Durante o período de Verão ocorre a desova levando os organismos a uma debilidade fisiológica devido à diminuição das reservas energéticas. A figura 18 ilustra os períodos de desenvolvimento, desova e pós-desova nas amêijoas transplantadas para o viveiro C em estudo.

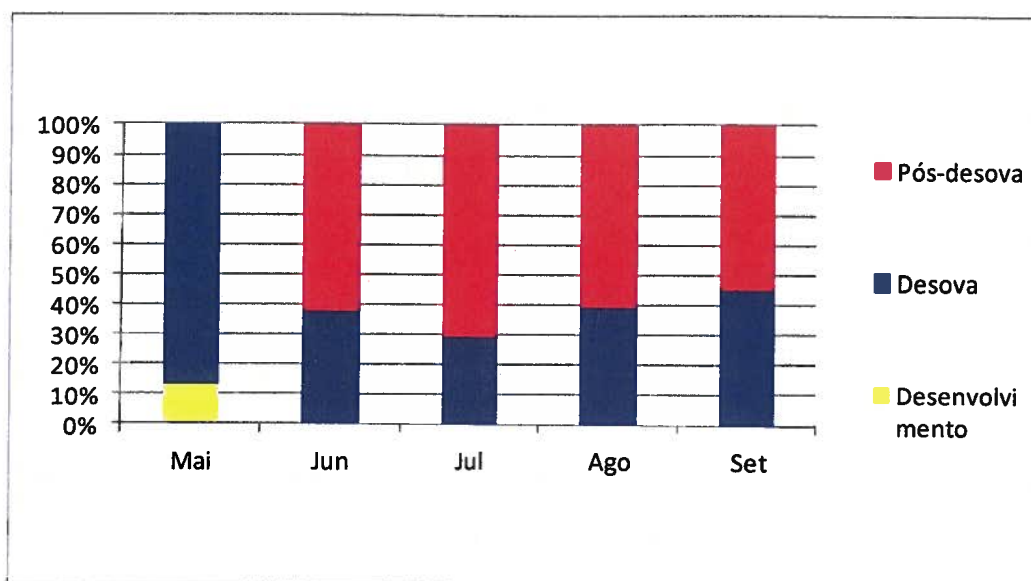


Figura 18. Percentagem de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) na fase de desova e pós-desova após transplantação para o viveiro C.

Patologias. A produção de amêijoas na Ria Formosa decresceu consideravelmente nas últimas duas décadas (Matias, 2007). Tem sido observado a partir dos anos 80 uma infestação crescente das amêijoas pelo protozoário parasita *Perkinsus atlanticus*. A infecção pelo parasita é caracterizada pela formação de nódulos nas brânquias das amêijoas, como se ilustra na figura 19, levando a uma diminuição da capacidade respiratória. A presença deste parasita tem sido relacionada com os surtos de mortalidade. O estudo desenvolvido no âmbito do projecto “AMBIPERK - Efeito dos Factores Ambientais na Infestação pelo Parasita *Perkinsus atlanticus* da Amêijoia *Ruditapes decussatus*” (Universidade do Algarve/CCMAR e IPIMAR) aponta para que factores ambientais como temperatura, salinidade e ferro, podem influenciar a taxa de crescimento e/ou de virulência do parasita, assim como a resistência da amêijoia à infecção. Em particular, através de uma experiência laboratorial verificou-se um maior grau de infecção para temperaturas da água de 15 e 20 °C do que a 25°C (Fig. 20). Estes resultados sugerem que existem condições de temperatura na Ria Formosa mais favoráveis para o desenvolvimento do parasita no final do inverno e Primavera.

Conjugação de factores para a mortalidade anormal. Efectivamente no Verão 2011 foi detectada uma mortalidade anormal e abrupta em diversos viveiros na Ria Formosa, incluindo o viveiro C na Fortaleza. Foi realizado no IPIMAR o rastreio do parasita *Perkinsus*, tendo sido registados níveis de infecção elevadíssimos. Cerca de 70% das amêijoas encontravam-se no

nível 4-5, numa escala de 0 a 5. Estes resultados sugerem uma relação entre a mortalidade anormal no viveiro C no mês de Junho e Julho e a presença deste parasita. Não é de excluir a conjugação de outros factores concorrentes para a mortalidade. Por exemplo, a menor oxigenação da água verificada durante o Verão, em particular nas marés mortas, leva a um dispêndio adicional de energia por parte do organismo através do aumento da taxa de filtração para a realização da respiração. Esta situação verifica-se num período de debilidade das amêijoas em termos fisiológicos devido ao esforço reprodutivo. Salienta-se que a mortalidade incidiu sobre a amêijo-boia e não em outros organismos bentónicos de forma significativa. Este facto evidencia a apetência desta espécie para desenvolver níveis elevados de infestação por *Perkinsus* perante a conjugação dos factores supra-mencionados.



Figura 19. Fotografia de uma brânquia de amêijoia (*Ruditapes decussatus*), onde se podem observar os nódulos do parasita *Perkinsus atlanticus*. (Projecto AMBIPERK).

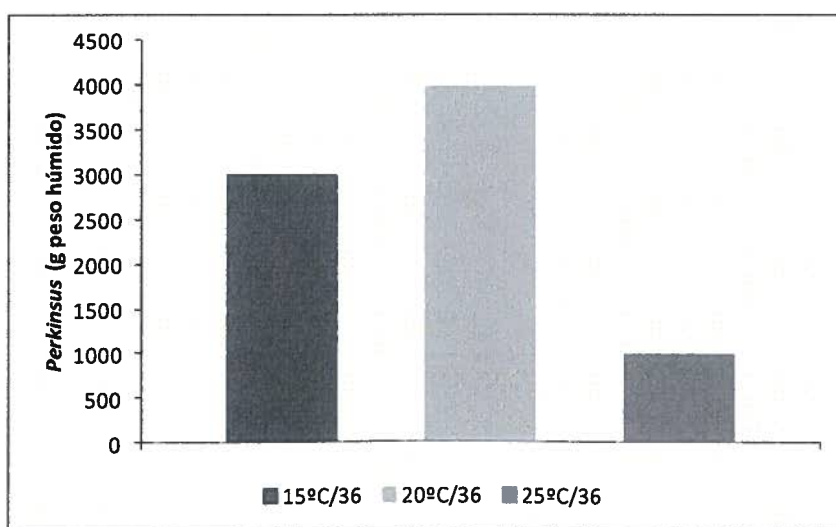


Figura 20. Efeito da temperatura no grau de infecção pelo parasita *Perkinsus atlanticus* em amêijoia (*Ruditapes decussatus*).

4. Considerações finais

As condições ambientais da Ria Formosa parecem ter melhorado relativamente a anos anteriores. Esta melhoria está em concordância com as medidas tomadas pelas autoridades competentes para a redução das pressões antropogénicas. Contudo, no ano de 2011, ocorreu mais uma vez uma mortalidade anormal de amêijoas nos viveiros da Ria Formosa. Provavelmente diversos factores actuaram em conjugação como sejam, o nível elevado de infestação por *Perkinsus*, a debilidade das amêijoas em termos fisiológicos devido ao esforço reprodutivo, e a elevada temperatura da água, potenciando uma menor oxigenação com um aumento do dispêndio energético das amêijoas para a respiração.

Com vista a minorar futuros episódios de mortalidade súbita de amêijoas em viveiros será importante o desenvolvimento de um sistema de alerta, que deverá contemplar a monitorização da temperatura da água, do nível de infestação por *Perkinsus* e do estado de maturação dos bivalves. No caso de haver uma conjugação de debilidade fisiológica, elevada infestação e temperatura elevada em períodos de maré morta, deverá ser divulgado o alerta junto dos viveiristas. A realização de dragagens nas áreas da Ria com maior assoreamento evitará a ocorrência de períodos de menor oxigenação das águas.

Referências

- Almeida, C., Soares, F., 2012. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): A 20 years of sanitary survey. *Marine Pollution Bulletin*, 64, Issue 2, 252-262.
- 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.
- 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.
- Cachola, R.A., Campos, C.J.A., 2006. Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do Algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. Relatórios Científicos e Técnicos, Série Digital, IPIMAR, Lisboa, 37p.
- 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, 188-196.
- European Commission 2004. Regulation (EC) no. 853/2004 of the European Parliament of the Council of 29 April 2004. Off. J. Europe Communities L226, 22–82.
- European Commission 2006. Regulation (EC) no. 1881/2006 of the European Parliament of the Council of 19 December 2006. Off. J. Europe Communities L364, 5-24.
- Falcão, M., 1997. Dinâmica dos nutrientes na Ria Formosa: efeitos da interacção 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.
- Ferreira, A.; Micaelo, C. e Vale, C., 1997. Levels of metals and PCB congeners in living resources from the Tagus Estuary and adjoining coastal area. In: Actas do 2º Simpósio sobre a Margem Continental Ibérico Atlântica, Cadiz, 349 p.
- 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.

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, 96 p.

Matias D., Joaquim S., Leitão A., Massapina C., 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International* 17, 257-271.

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.

Raimundo, J., Pereira, P., Caetano, M., Cabrita, M.T., Vale, C., 2011. Decrease of Zn, Cd and Pb concentrations in marine fish species over a decade as response to reduction of anthropogenic inputs: the example of Tagus estuary. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2854-2858.

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.

Nutrientes. As amostras de água foram filtradas através de membranas Nuclepore (MSI) com 0.45 µm de porosidade e conservadas no frio. Os nutrientes dissolvidos foram determinados por colorimetria num autoanalisador: amónia, nitrito e nitrato, com limite de detecção de 0.001 mg L⁻¹ e silicato e fosfato, com um limite de detecção de 0.003 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, as amostras 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 µm, 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).

2. Parâmetros ligados à produção de bivalves

Sobrevivência. Antes de se proceder à montagem do ensaio e atendendo que se pretendia efectuar uma cultura com uma densidade de juvenis de amêijoas de 1Kg.m^{-2} , 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 $1\text{x}1\text{m}$ 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.

Estado de maturação. Para a avaliação do estado de maturação, as amêijoas foram abertas por incisão dos músculos adutores, retiradas as brânquias, sifões e manto e introduzidas no fixador (San Felice) por um período de 24 horas. Posteriormente as amostras ficaram a lavar, em água corrente por um período de 3 dias. A técnica utilizada para a elaboração dos cortes histológicos constou, resumidamente, do seguinte: 1) Desidratação pela série ascendente de alcoóis; 2) Impregnação por um dissolvente de parafina – xilol; 3) Impregnação em parafina; 4) Inclusão definitiva; 5) Cortes no micrótimo com $5\text{-}6\text{ }\mu\text{m}$ de espessura; 6) Coloração hematoxilina-eosina; 7) Montagem em DPX. As preparações foram observadas ao microscópio e os estados de maturação determinados de acordo com Matias et al (2009).

3. Parâmetros ligados à qualidade de bivalves

E. coli e coliformes totais. A análise microbiológica dos bivalves é efectuada no dia da recolha das amostras. É utilizado o número suficiente de bivalves 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^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} 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 a 44°C e as com meio CHR a 36°C, 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.

Toxinas 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 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 (2010a) 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.

Metais. Pesou-se rigorosamente cerca de 200 mg de amostra liofilizada de bivalve, adicionou-se 4 cm³ de HNO₃ (sp, 65% v/v) numa autoclave de teflon de acordo com o método descrito por Ferreira et al (1997). A autoclave foi sujeita a uma temperatura de 60°C durante doze horas, aumentando-se para 100 °C durante uma hora. Em seguida, deixou-se arrefecer até temperatura ambiente e adicionou-se 2 cm³ de H₂O₂ (sp, 30% v/v). A autoclave aberta foi sujeita a uma temperatura de 80°C durante uma hora. A solução final foi aferida a 50 cm³ com água ultra-pura e guardada em frascos de polipropileno para posterior análise de cobre (Cu), zinco (Zn), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) por espectrometria de massa com plasma induzido (ICP-MS). Os limites de detecção para os diferentes elementos determinados em bivalves foram os seguintes: 0.0015 µg g⁻¹ para Cu; 0.0032 µg g⁻¹ para Zn; 0.00074 µg g⁻¹ para Cd e 0.0088 µg g⁻¹ para Pb.