



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 7 • número 1 • p 93-102

Utilização do gastrópode aquático *Physa acuta* em ensaios *in situ*

Os ensaios *in situ* constituem uma ferramenta efetiva e ambientalmente relevante de avaliação de efeitos ecotoxicológicos, permitindo estabelecer relações causa-efeito em ambientes aquáticos sujeitos a vários agentes de stress. Entre as várias espécies aquáticas utilizadas neste tipo de testes, o gastrópode *Physa acuta* assume-se como um potencial organismo teste, permitindo, para além da avaliação de efeitos letais, a avaliação de parâmetros sub-letais ao nível reprodutivo (p.ex. número de ovos, número de massas de ovos, número de ovos em cada conjunto de massas de ovos e desenvolvimento embrionário) num curto espaço de tempo. Além disso, os requisitos materiais necessários à implementação de ensaios com *P. acuta* são de rápida e fácil execução e de baixo custo. Deste modo, o presente artigo pretende reunir informação necessária à realização de ensaios *in situ* com *P. acuta*, incluindo a descrição da espécie e suas vantagens enquanto modelo experimental, assim como os procedimentos prévios, durante e após a execução dos ensaios.

Palavras-chave

Physa acuta
ensaios *in situ*
procedimentos

Maria J. Saraiva¹

João R. Puga¹

Ana Ré²

Isabel Campos¹

Fernando Gonçalves²

Jan Jacob Keizer¹

Nelson Abrantes^{1*}

¹ Departamento de Ambiente e Ordenamento & CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

² Departamento de Biologia & CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

* njabrant@ua.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

Sendo uma ciência integrativa, a ecotoxicologia permite estudar o comportamento e efeito tóxico das substâncias naturais ou artificiais em organismos vivos (Butler, 1978). Embora os ensaios ecotoxicológicos em laboratório sejam comumente utilizados para avaliar a toxicidade de compostos, não reproduzem fielmente as condições que ocorrem no ambiente aquático, uma vez que se desenrolam em ambiente controlado, onde as condições abióticas são constantes. Por exemplo, fatores como o substrato, a corrente, o fotoperíodo, a presença de alimento, temperatura da água e as variações das características químicas da água (dureza, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) são fatores que afetam a sensibilidade dos invertebrados aquáticos (Maciorowski e Clarke, 1980). Neste sentido, os ensaios *in situ* apresentam-se como ensaios ecologicamente mais relevantes pois permitem avaliar o efeito combinado destas variações naturais com um mínimo de manipulação (Chappie e Burton, 1997; Moreira-Santos et al., 2004). A utilização de invertebrados aquáticos em ensaios ecotoxicológicos é cada vez mais uma opção em detrimento da ictiofauna, apresentando múltiplas vantagens. Para além de ser um grupo morfologicamente, fisiologicamente e ecologicamente diverso, permitindo um leque variado de respostas a um tóxico (Hart e Fuller, 1974), também possui outras vantagens práticas como o reduzido tamanho e ciclos de vida e tempos de reprodução geralmente curtos. Se, por um lado, o diminuto tamanho permite reduzir o espaço de manutenção e a quantidade de composto/amostra a testar, ambos os fatores permitem também diminuir os custos com equipamento, materiais e meios de cultura (Greenwood et al., 2008). Entre as demais espécies aquáticas utilizadas em ecotoxicologia, o gastrópode aquático *Physa acuta* tem sido recentemente utilizado em ensaios ecotoxicológicos em laboratório para avaliação do efeito de vários xenobióticos (Sánchez-Argüello et al., 2009; Lance et al., 2010; Musee et al., 2010; De Castro-Català et al., 2013). Contudo, os registos da sua utilização em ensaios *in situ* são praticamente inexistentes.

Descrição da espécie *Physa acuta*

P. acuta é uma espécie invasora cuja introdução acidental na Europa se julga ter ocorrido durante a troca de algodão entre os Estados Unidos da América e a França (Anderson, 2003). Trata-se de um gastrópode aquático pequeno, pulmonado. Segundo Paraense e Pointier (2003) a concha de *P. acuta* apresenta as seguintes características: a) fina, lisa, brilhante e moderadamente translúcida com coloração castanha clara; b) linhas espirais não-percetíveis; c) protoconcha (concha embrionária ou primeira volta) distinta, arredondada e projetada; d) formada por 4 ou 5 voltas, que crescem rapidamente, de forma regular e proporcional desde a primeira até à última volta, que é muito grande e com forma arredondada; e) espira curta; f) suturas ligeiramente marcadas; g) abertura grande, em forma de orelha e com cerca de $\frac{3}{4}$ do comprimento total da concha; h) lábio externo fino e afiado, e lábio interno localizado imediatamente junto à região columelar, fechando completamente a região umbilical; i) dobras da columela um pouco torcidas (não visível na Figura 1); j) calo parietal (saliência do bordo interior da abertura) amplo e ausência de opérculo (Figura 1).



Vantagens do uso de *Physa acuta* em ensaios *in situ*

As vantagens da utilização desta espécie em ensaios ecotoxicológicos e, em especial, em ensaios *in situ* são variadas. *P. acuta* é uma espécie invasora com ampla distribuição na Europa e em Portugal (Van Damme et al., 2012), desempenhando um papel importante nos sistemas aquáticos, pois faz parte da dieta alimentar de vários peixes e algumas aves aquáticas, como patos e gansos (Gomot, 1998). É uma espécie hermafrodita com capacidade de auto-fecundação e cujas taxas de reprodução são elevadas: em laboratório, cada adulto pode colocar entre 50 a 100 ovos sob a forma de massas de ovos, semanalmente durante um ano (Wethington e Dillon, 1993); o desenvolvimento embrionário ocorre em aproximadamente uma semana (Li et al., 2014), o que possibilita a avaliação de parâmetros sub-letais como a reprodução em ensaios de curta duração. A maturação sexual ocorre entre 6 a 8 semanas (Wethington e Dillon, 1993). O desenvolvimento embrionário pode ser facilmente observado ao microscópio, já que as suas massas de ovos e o córion são transparentes. Possui também uma ampla tolerância a variações de temperatura da água, apresentando grande resiliência a perturbações (Seeland et al., 2013), no entanto é sensível à exposição a tóxicos e, por isso, apropriada para ensaios ecotoxicológicos (Evans-White e Lamberti, 2009; Sánchez-Argüello et al., 2009; Lance et al., 2010; Musee et al., 2010; Li et al., 2014). Por último, a sua locomoção no substrato e hábitos alimentares detritívoros torna esta espécie ideal para ensaios envolvendo poluentes presentes nos sedimentos (Musee et al., 2010). Face a isto, esta espécie apresenta características que a tornam um potencial organismo para a determinação não só de efeitos letais como efeitos sub-letais. Assim, de entre os vários parâmetros, podemos estudar a mortalidade, número de ovos, número de massas de ovos, número de ovos em cada conjunto de massas de ovos e desenvolvimento embrionário. Atendendo a que se trata de uma espécie invasora, e apesar de amplamente distribuída na Península Ibérica, existe o risco da sua introdução em cursos de água onde esta ainda não esteja presente. Assim, as estruturas de suporte devem ser cuidadosamente construídas para ser evitado o risco de dispersão. Não obstante, é aconselhada a sua utilização em ensaios *in situ* somente em massas de água onde a espécie ocorra.



PROCEDIMENTOS

Os procedimentos para a execução dos ensaios *in situ*, envolvendo a espécie *P. acuta*, podem dividir-se em três etapas: fase preparatória - a que antecede o ensaio e consiste na aclimação ou manutenção da cultura e na execução das câmaras que vão alojar os organismos *in situ*; fase da exposição do ensaio em campo; e por último a fase de finalização do ensaio, com a determinação dos parâmetros, quer ainda em campo, quer em laboratório. A listagem de materiais, soluções usadas para preparação do meio de cultura e alimento estão reportadas na Tabela I.

1. Fase Preparatória

1.1. Cultura de *Physa acuta*

Previamente à execução dos ensaios *in situ* deve estabelecer-se uma cultura de *P. acuta* em laboratório. Como já referido, dada a sua larga distribuição, esta espécie é facilmente encontrada em diversos sistemas aquáticos (rios, ribeiros, lagos). Os organismos, em número suficiente de acordo com o desenho experimental definido, devem ser recolhidos num curso de água de qualidade comprovadamente elevada e,

em laboratório, deve-se proceder à confirmação da espécie. Deve ser efectuada uma triagem e calibração dos organismos, colocando aqueles com o mesmo intervalo de tamanho em aquários com capacidade de 4L, num máximo de 50 organismos por aquário. Ao longo de 15 dias deve ser efectuada uma aclimação ao meio de cultura, passando de forma gradual de água de campo (recolhida no local onde se recolheram os organismos) para meio de cultura artificial (Artificial Pond Water – APW; Naylor et al., 1989; Tabela II e Figura 2). Os animais devem ser mantidos em laboratório à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro com arejamento. Como alimento recomenda-se TetraMin®, que deve ser oferecido de 2 em 2 dias. Pode-se também optar por manter os organismos em laboratório usando água do local até ao início da experiência, sendo igualmente arejados e alimentados com TetraMin®, de 2 em 2 dias.

TABELA I: Listagem de materiais, soluções e alimento, e respetivas quantidades, requeridos para cada uma das 3 fases dos ensaios *in situ*. As quantidades são apresentadas por local.

	Preparação	Instalação	Término
Frascos de plástico de 100 ml (coletor de fluídos biológicos)	5		
Molde em cartão 4 x 3 cm	1		
Retângulos de rede mosquiteira de 5 x 4 cm	10		
Pistola de cola quente e recargas	1		
Placa de poliestireno de 2 x 30 x50 cm	1		
X-ato	1		
Lamparina ou isqueiro	1		
Craveira	1		
Meio APW ou água do local	5 L	1L	
Indivíduos de <i>Physa acuta</i>		20 (+10 extra)	
Abraçadeiras grandes (50 cm)		8	
Gelatina neutra em pó		10 g	
Água quente		200 ml	
Água fria		100 ml	
TetraMin® (tropical fish food flakes) macerado		200 mg	
Cuvetes para gelo		1	
Cabo/corda de nylon para fixar a estrutura à margem		10 m	
Botas de borracha		1 par	
Baldes plásticos com capacidade para 1L		1	
Pinça de pontas grossas		1	1
Etiquetas de papel vegetal			7
Caixa plástica			1
Etanol a 70%			1.5 L
Caixa de petri			7
Microscópio			1

TABELA II: Soluções stock que compõem a APW, respetiva fórmula, *Chemical Abstract Service* (CAS), um número de registo único identificador de cada produto químico descrito na literatura, massa e volume de água destilada necessária para a preparação de cada solução stock.

Solução stock	Fórmula	CAS	Massa (g)	Água destilada (L)
Cloreto cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10035-04-8	58,8	1
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10034-99-8	24,65	1
Carbonato de sódio	NaHCO_3	144-55-8	12,95	1
Cloreto de potássio	KCl	7447-40-7	1,15	1

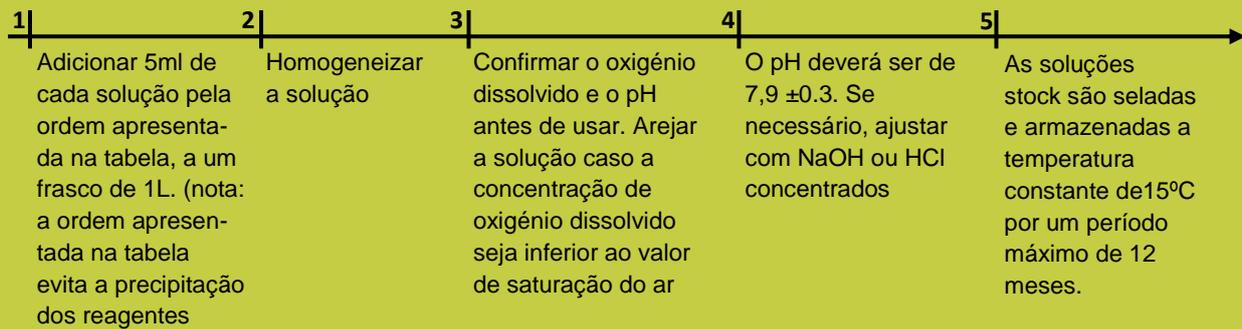


FIGURA 2: Procedimento de preparação do meio de cultura APW.

1.2. Definição do procedimento experimental

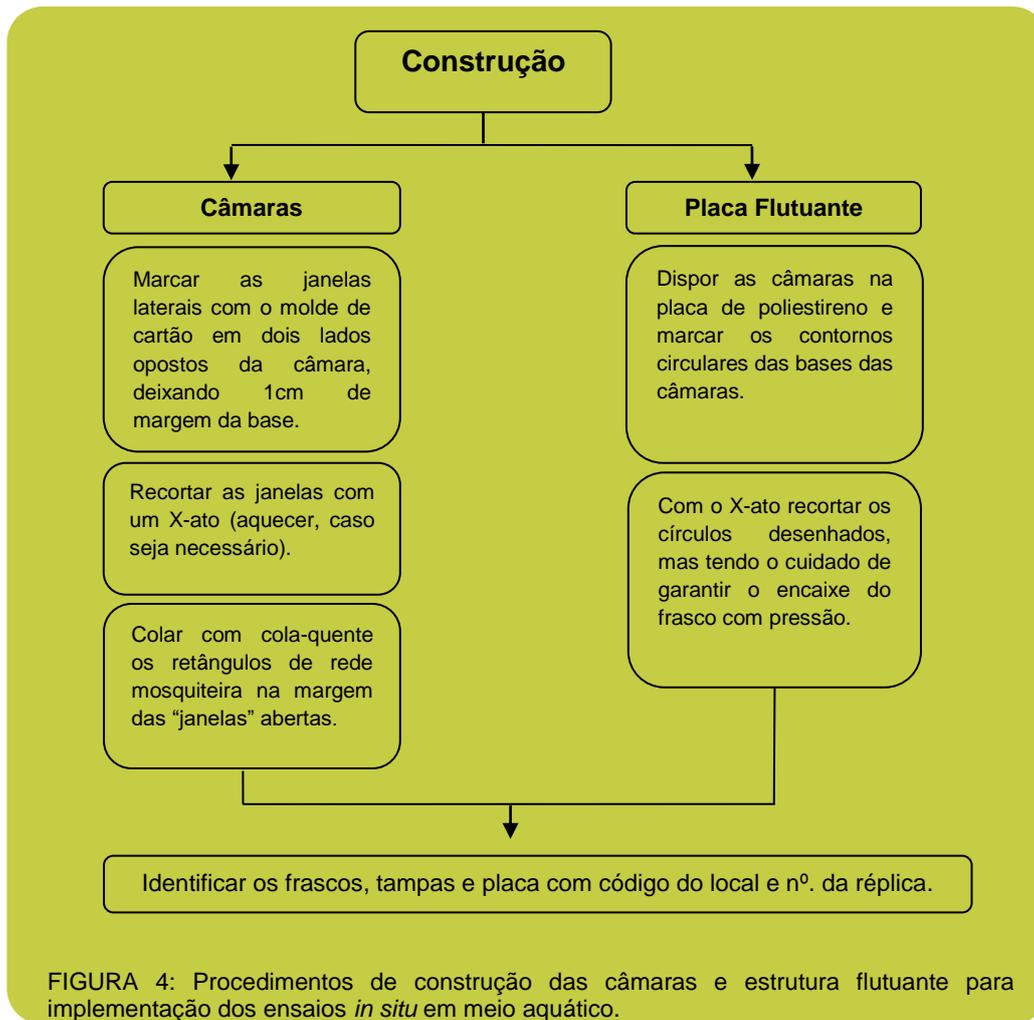
O desenho experimental é determinado com base nas questões científicas definidas em cada estudo. Entre as demais características, o desenho experimental deve ser robusto, permitindo uma análise sólida dos dados obtidos. Sugere-se um mínimo de 5 réplicas por local, com 4 organismos por réplica. Igualmente, o número de locais no sistema aquático em estudo para implementação dos ensaios deve ter em atenção a localização das fontes de contaminação e, deste modo, devem ser selecionados locais sob a influência direta da fonte, assim como locais a jusante e a montante, estabelecendo-se um gradiente de exposição. É também necessário considerar que, caso se opte por realizar análises complementares, como por exemplo análises de biomarcadores de atividade enzimática, será necessário um maior número de organismos de acordo com a biomassa requerida.

1.3. Construção das câmaras

A Figura 3 ilustra as câmaras específicas desenvolvidas para albergar *P. acuta* durante o ensaio *in situ*. A sua idealização e construção teve em atenção a fluutuabilidade necessária para a sobrevivência desta espécie pulmonada, garantida através de uma placa de poliestireno e a necessidade de circulação de água, proporcionada pela presença de duas aberturas laterais em rede mosquiteira. Na sua construção optou-se por materiais simples (Tabela I) e de fácil aquisição, permitindo a sua fácil e rápida replicação. A figura 4 esquematiza a preparação das câmaras.

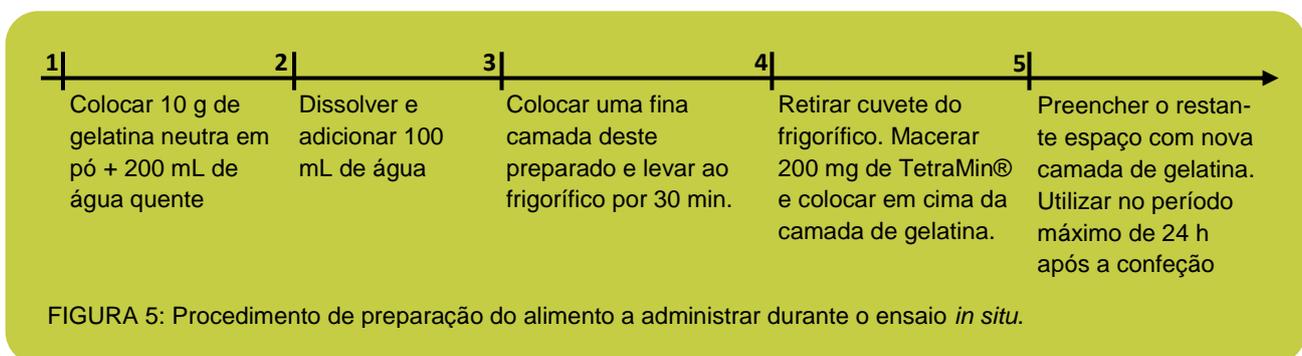


FIGURA 3: Câmaras desenvolvidas para ensaios *in situ* com *Physa acuta*. Salienta-se o pormenor das duas aberturas laterais em rede mosquiteira, permitindo a passagem da água e a placa de poliestireno usada para garantir a fluutuabilidade das câmaras.



1.4. Preparação do alimento

Com o objetivo de tornar o alimento de *P. acuta* mais resistente à dissolução na água (em campo, verifica-se uma maior turbulência e corrente), recomenda-se a incorporação do alimento TetraMin® macerado em gelatina (Figura 5). Esta mistura tem uma durabilidade de pelo menos 4 dias, sendo aconselhado reforçar a dose ao final do quarto dia de ensaios. A dose recomendada por câmara/conjunto de quatro indivíduos é de ¼ de cubo de gelatina, correspondendo a aproximadamente 50 g.



2. Preparação da instalação, instalação no campo e término do ensaio

Assim que se prevejam condições ideais para o início dos ensaios *in situ* é necessário calibrar os organismos e colocá-los em recipientes adequados para o seu transporte até ao local dos ensaios (FIGURA 6). No dia do ensaio, transferem-se os organismos para as respetivas câmaras (que já estarão inseridas na placa de polietileno). Fecham-se as câmaras com as tampas e abraça-se a placa ao fio preso à margem do rio, que impede que o ensaio seja levado pela corrente mesmo num aumento súbito do caudal (FIGURA 7 E 8).

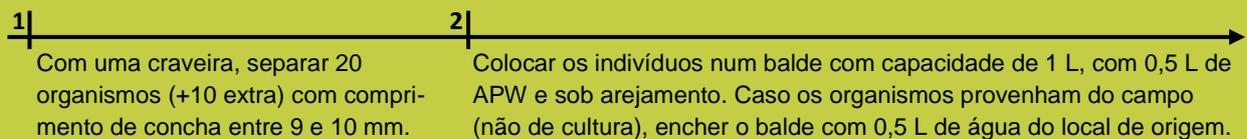


FIGURA 6: Procedimento a adotar no dia ou dias anteriores à instalação do ensaio em campo.



FIGURA 7: A e B - Placa de poliestireno com as câmaras de ensaio; C- Estrutura instalada no rio e presa à margem com cabo de nylon.

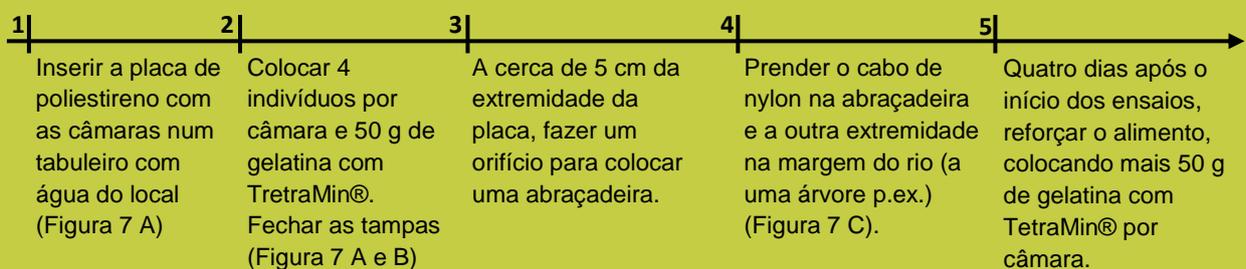


FIGURA 8: Procedimento de instalação dos ensaios em campo.

3. Término dos Testes

No último dia do ensaio, a placa de esferovite é removida do meio aquático e os organismos são retirados das respectivas câmaras. Contabiliza-se o número de indivíduos vivos, de massas de ovos e descartam-se e contabilizam-se os indivíduos mortos. Colocam-se os indivíduos vivos em água do local caso se opte por realizar ensaio de biomarcadores com os mesmos. Estas etapas encontram-se sumariadas na Figura 8. No prazo máximo de 24 h após o fim do ensaio identificam-se ao microscópio as fases embrionárias, que se encontram ilustradas na Figura 9.

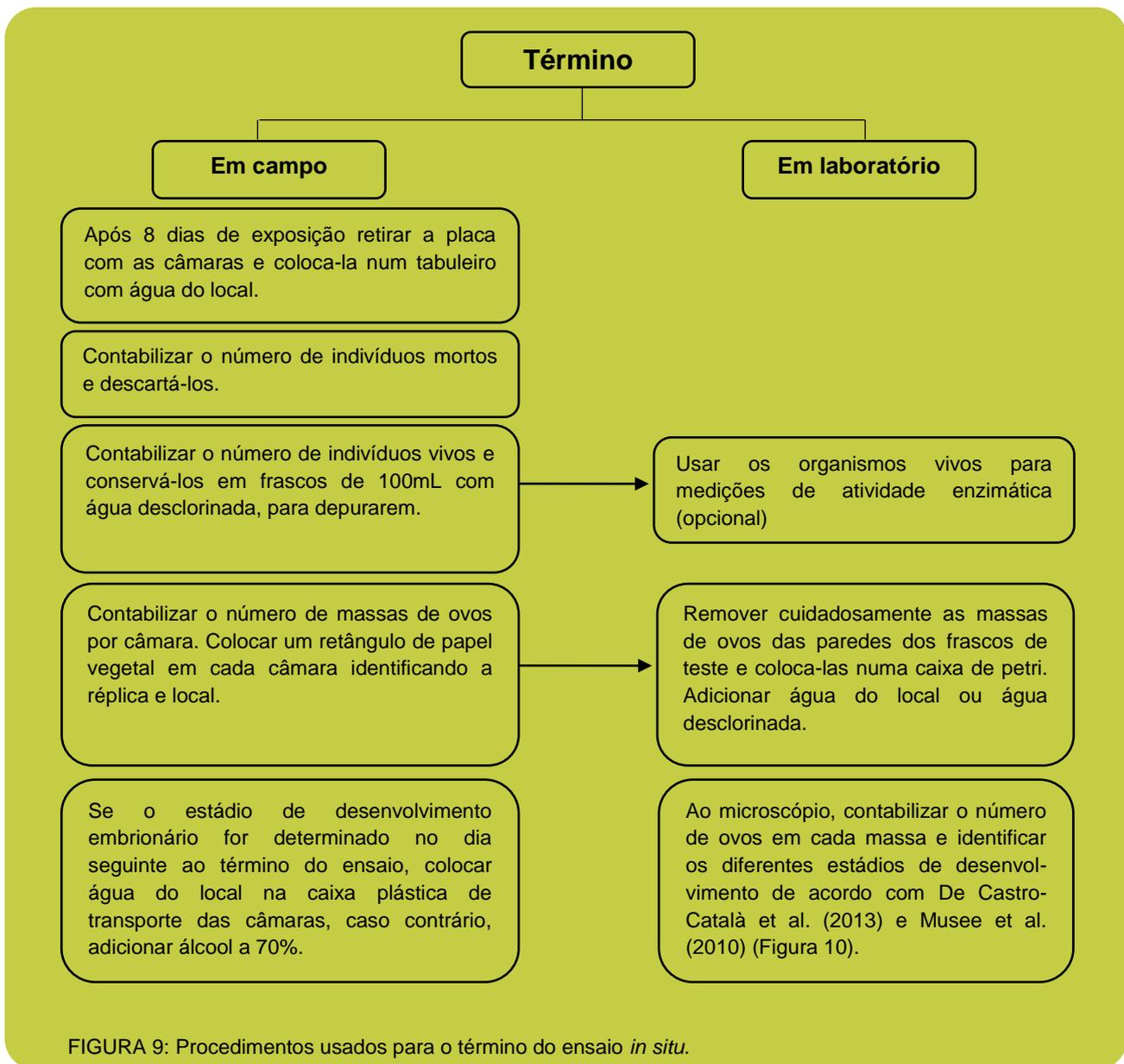
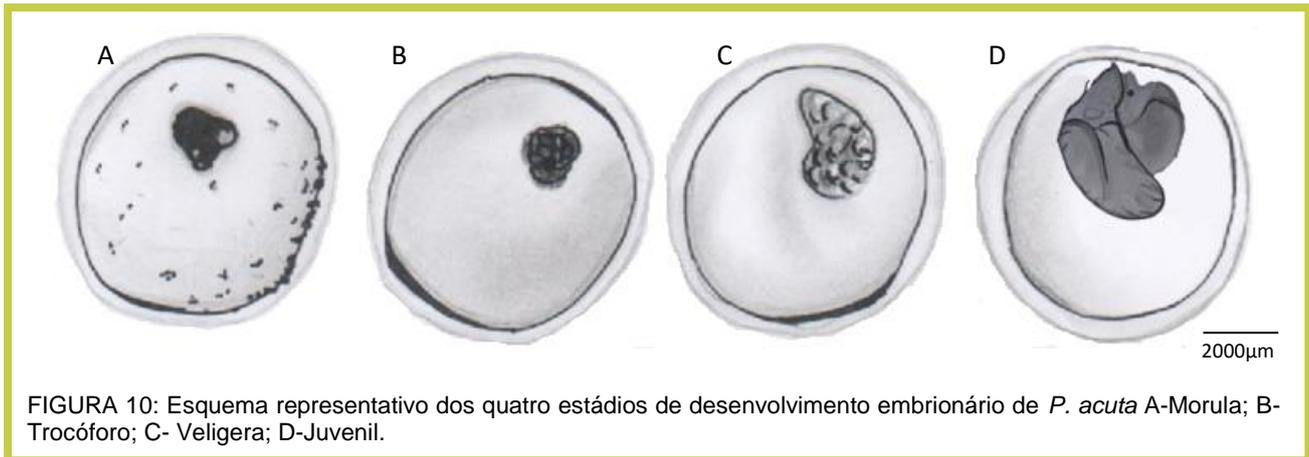


FIGURA 9: Procedimentos usados para o término do ensaio *in situ*.



CONCLUSÃO

A utilização da espécie *P. acuta* revela ter um elevado potencial para uso em avaliações de cariz ecotoxicológico *in situ*. Entre as demais vantagens destacam-se a fácil cultura de *P. acuta*, as suas características intrínsecas, que permitem num curto tempo de exposição a obtenção de parâmetros reprodutivos, e a fácil e prática execução das infraestruturas, recorrendo a materiais de simples aquisição. Não obstante o fácil desenvolvimento e execução do ensaio, recomenda-se o treino prévio na identificação dos vários estádios de desenvolvimento embrionário de *P. acuta*.

agradecimentos • Este trabalho foi financiado por fundos europeus através do programa COMPETE e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) no âmbito dos projetos "FIRETOX - Efeitos tóxicos dos incêndios florestais nos sistemas aquáticos (PTDC/AAG-GLO/4176/2012) e RECARE – Preventing and Remediating degradation of soils in Europe through Land Care (EU-FP7 ENV.2013.6.2-4). Agradecimentos são ainda devidos ao suporte financeiro atribuído ao CESAM (UID/AMB/50017) por fundos nacionais e pelo co-financiamento FEDER dentro do acordo de parceria PT2020 e do programa COMPETE 2020.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson R (2003). *Physella* (Costatella) *acuta* Draparnaud in Britain and Ireland, its taxonomy, origins and relationship to other introduced Physidae. *Journal of Conchology* 38: 7-21.
- Butler GC (1978). Principles of ecotoxicology. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Chappie DJ, Burton GA (1997). Optimization of in situ bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 559-564.

- De Castro-Català N, López-Doval J, Gorga M, Petrovic M, Muñoz I (2013). Is reproduction of the snail *Physella acuta* affected by endocrine disrupting compounds? An in situ bioassay in three Iberian basins. *Journal of Hazardous Materials* 263: 248-255.
- Evans-White MA, Lamberti GA (2009). Direct and indirect effects of a potential aquatic contaminant on grazer–algae interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 418-426.
- Gomot A (1998). Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 288-297.
- Greenwood R, Mills GA, Allan IJ (2008). Emerging Methods for Water Monitoring in the Context of the WFD. In: UB Philippe Quevauviller, Clive Thompson, Tristan Simonart (ed.), *The Water Framework Directive: Ecological and Chemical Status Monitoring*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom.
- Hart CWJ, Fuller SLH (1974). *Pollution and Ecology of Freshwater Invertebrates*. In: Academic Press, New York.
- Lance E, Brient L, Carpentier A, Acou A, Marion L, Bormans M, Gerard C (2010). Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to *Physa* (= *Physella*) *acuta*. *Science of The Total Environment* 408: 3560-3568.
- Li X-Y, Dong X-Y, Bai X, Liu L, Wang J-J (2014). The embryonic and postembryonic developmental toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Physa acuta*. *Environmental Toxicology* 29: 697-704.
- Maciorowski HD, Clarke RM (1980). Advantages and Disadvantages of Using Invertebrates in Toxicity testing. In: ALJ Buikman, JJ Cairns (eds.), *Aquatic Invertebrate Bioassays*, ASTM STP 715, American Society for Testing and Materials, pp. 36-47.
- Moreira-Santos M, Soares A M, Ribeiro R (2004). An *in situ* bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 164-173.
- Musee N, Oberholster PJ, Sikhwivhilu L, Botha AM (2010). The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere* 81: 1196-1203.
- Naylor C, Maltby L, Calow P (1989). Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia* 188: 517-523.
- Paraense WL, Pointier J-P (2003). *Physa acuta* Draparnaud, 1805 (Gastropoda: Physidae): a study of topotypic specimens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 513-517.
- Sánchez-Argüello P, Fernández C, Tarazona JV (2009). Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water–sediment test. *Science of The Total Environment* 407: 1937-1946.
- Seeland A, Albrand J, Oehlmann J, Müller R (2013). Life stage-specific effects of the fungicide pyrimethanil and temperature on the snail *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) disclose the pitfalls for the aquatic risk assessment under global climate change. *Environmental Pollution* 174: 1-9.
- Van Damme D, Ghamizi M, Seddon M, Kristensen TK, Stensgaard A-S, Budha PB, Dutta J (2012). *Haitia acuta*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Wethington AR, Dillon RTJ (1993). Reproductive development in the hermaphroditic freshwater snail, *Physa*, monitored with complementing albino lines. *Proceedings of the Royal Society of London B* 252: 109-114.