



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 4 • número 1 • p 92-112

## **Monitorização e controlo da amêijoia invasora *Corbicula fluminea* em indústrias hidro-dependentes**

A amêijoia asiática *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é um bivalve conhecido por causar problemas de incrustação (atividade geralmente designada de *biofouling*) nas indústrias consumidoras de água doce, quer como matéria-prima quer como utilidade, no apoio ao processo industrial (indústrias hidro-dependentes). É uma das principais espécies invasoras *biofoulers* presentes em Portugal. O presente artigo tem como objetivo geral expor os principais problemas provocados por esta espécie em indústrias hidro-dependentes, bem como os métodos de monitorização e as estratégias de controlo atualmente disponíveis em contexto industrial e aplicáveis a infestações ou zonas em perigo de infestação por este bivalve. De uma forma mais específica, pretende-se também veicular a importância da monitorização da dispersão de espécies invasoras e sensibilizar para a necessidade de registar e comunicar devidamente avistamentos das mesmas, utilizando como exemplo o caso da amêijoia asiática em Portugal. Por fim, pretende-se dar a conhecer a metodologia básica utilizada na procura de soluções químicas para o controlo de bivalves invasores em instalações industriais. Neste contexto, são sugeridas duas atividades práticas que poderão ser integradas, por exemplo, no âmbito das aulas de Ciências Naturais e Biologia ao nível do 3º Ciclo do Ensino Básico e Secundário ou no âmbito de projetos não-curriculares: uma sobre a monitorização de populações de amêijoia asiática e outra sobre a avaliação do potencial de um composto químico como agente de controlo da mesma.

### **Palavras-chave**

*Corbicula fluminea*  
monitorização  
controlo  
biocidas

Rita Garrido Gabriel <sup>1</sup>

Ana Ré <sup>2</sup>

Fernando Gonçalves <sup>2</sup>

Raquel Costa <sup>1</sup>

Joana Luísa Pereira <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> CIEPQPF, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, Portugal.

\* jpereira@ua.pt

ISSN 1647-323X

## INTRODUÇÃO

*Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é um bivalve de água doce pertencente ao filo Mollusca. É uma espécie nativa da Ásia, Oceânia e África, sendo também conhecido por amêijoia asiática. Devido à sua grande capacidade adaptativa a diferentes *habitats*, elevada tolerância a uma larga gama de condições ambientais, grande potencial reprodutivo, crescimento rápido, maturidade sexual precoce e grande capacidade de dispersão, este bivalve é considerado como uma das cem piores espécies invasoras (DAISIE, 2008). A amêijoia asiática coloniza preferencialmente ecossistemas de água doce e está disseminada um pouco por toda a Europa e América, encontrando-se ainda em expansão a sua distribuição fora da área nativa. Os primeiros registos da presença da espécie fora da sua área nativa indicam que terá sido introduzida intencionalmente na América do Norte em 1924 (Beran, 2006) e terá chegado à Europa (França e Portugal) no início dos anos 80 do século XX (Mouthon, 1981). Atualmente, em Portugal, está presente no rio Douro (Nagel 1989), no rio Lima (Sousa et al., 2006), no rio Mondego (Chainho et al., 2006), no rio Minho (Sousa et al., 2008a), no rio Sado e Guadiana (Morais et al., 2009), na barragem de Santa Clara, no rio Mira, em Mira (Figueira-da-Foz), e na barragem da Bravura, no Algarve (Rosa et al., 2011a). Trata-se de um bivalve de concha brilhante com estrias salientes e uniformemente espaçadas (Figura 1), facilmente distinguível de outras espécies de bivalves que podem ser encontradas nos sistemas dulçaquícolas portugueses. Mais detalhes sobre a morfologia externa desta espécie podem ser consultados em Rosa et al. (2011b).



FIGURA 1: Aspeto exterior da amêijoia asiática

Quando estabelecida num novo local, esta espécie tem impactos negativos tanto no ecossistema invadido (para mais informação consultar Rosa et al., 2011b) como em indústrias dependentes de água captada superficialmente nesse local, onde atua como *biofouler*<sup>1</sup> (Claudi e Mackie, 1994; Minchin et al., 2002; Pimentel et al., 2005; Vitousek et al., 1996). Devido às suas dimensões reduzidas, as pedivelígeras<sup>2</sup> e os juvenis entram na instalação industrial através dos sistemas de captação de água, passam através de crivos e acumulam-se em zonas com caudais inferiores a  $1,2-1,5 \text{ m s}^{-1}$  (Eng, 1979; Neitzel et al., 1984; Page et al., 1986). Os bivalves captados crescem rapidamente e estabelecem densas populações em estruturas submersas e equipamentos, acabando por dificultar ou até mesmo impossibilitar a passagem da água. As indústrias que, em geral, estão mais vulneráveis a infestações pela amêijoia asiática são as estações de tratamento de água para consumo humano (ETA's), cimenteiras, indústria de pasta e papel, centrais termo e hidroelétricas e os sistemas de irrigação mecânica. Neste contexto, os principais problemas causados pelo *biofouling* por *C. fluminea* são, em alguma extensão, semelhantes aos problemas causados por outros bivalves muito conhecidos, como o mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*) e geralmente incluem (McMahon, 1977; Isom, 1986; Johnson et al., 1986; Page et al., 1986; Potter e Liden, 1986; Smithson, 1986; Rosa et al., 2011a): bloqueio das tubagens/canos; redução da eficácia dos sistemas

<sup>1</sup> Organismo capaz de exercer atividade de *biofouling*, ou seja, de se acumular, de forma indesejada em estruturas submersas ou húmidas.

<sup>2</sup> Estádio juvenil autónomo do ciclo de vida de alguns bivalves, incluindo *Corbicula fluminea*. A estrutura geral de uma pedivelígera inclui uma concha que envolve e protege a massa visceral do organismo, um velum que se estende à volta da concha - órgão com funções na natação e na alimentação, de forma anelar, contrátil e ciliado - e um pé que apoia a locomoção no sedimento. As pedivelígeras da amêijoia asiática possuem tamanhos entre 250 e 500  $\mu\text{m}$ .

de arrefecimento de água; distúrbios no funcionamento normal da instalação para a retirada de conchas e material biológico; aumento da corrosão de estruturas metálicas; destruição ou danificação de equipamentos (condensadores, bombas); risco de falhas nos sistemas de proteção contra incêndios. Todos estes problemas envolvem custos que, só nos Estados Unidos, rondam os mil milhões de dólares por ano (Pimentel et al., 2005). Apesar de a espécie estar em Portugal há já alguns anos, não existe um número significativo de locais afetados e, até à data, os danos causados em indústrias nacionais são moderados (Rosa et al., 2011a). Esta discrepância pode ser justificada com o fenómeno de mortalidade em massa que as populações de amêijoas asiáticas enfrentam com alguma frequência (Sousa, 2008b) e/ou com a progressão natural das invasões biológicas – entre a introdução da espécie no novo *habitat* e o estabelecimento total, a população invasora passa por uma fase de adaptação durante a qual persiste em zonas restritas e com baixa densidade populacional – “fase de latência” (Davis, 2010). Esta fase pode durar semanas, meses ou até mesmo várias décadas. As medidas de minimização de dispersão de espécies invasoras, ecologicamente mais viáveis, passam pela prevenção (contando com a consciencialização do público), legislação e monitorização (Finnoff et al., 2007). No entanto, e apesar da prevenção envolver menos custos do que o controlo da espécie estabelecida, muitas vezes, esta é detetada tarde demais e o recurso a metodologias de controlo é inevitável. Estas linhas orientadoras aplicam-se no geral às invasões biológicas em contexto natural, mas regem também o enquadramento que sustenta o desenvolvimento de estratégias de controlo de infestações industriais.

Este trabalho tem como objetivo fornecer informação em duas áreas essenciais da gestão de infestações pelo bivalve invasor *Corbicula fluminea* em contexto industrial: monitorização e controlo. É ainda apresentada a metodologia subjacente a duas atividades que podem ser desenvolvidas no contexto do Ensino Básico e Secundário (ou noutros contextos educativos formais e não-formais) e que se enquadram, de uma forma geral, em cada uma das áreas acima referidas.



## MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE AMÊIJOA ASIÁTICA

A gestão de invasões pela amêijoas asiáticas requer a identificação dos vetores de introdução, o reconhecimento das características que fazem dela uma invasora bem-sucedida e o uso de metodologias adequadas para a prevenção, erradicação ou controlo das populações estabelecidas. A prevenção de introduções será sempre a ferramenta ambiental e economicamente mais eficaz para combater os impactos de *C. fluminea*. Como complemento integrado das estratégias de prevenção, a monitorização com o objetivo de detetar o primeiro aparecimento de pedivelígeras, juvenis e adultos, e registar o seu crescimento e abundância, é extremamente importante na escolha das ferramentas de mitigação/controlo mais eficazes a utilizar no caso do estabelecimento da população invasora se tornar um problema a resolver. Também importante a este nível é a identificação de barreiras de dispersão e nichos ecológicos onde *C. fluminea* não consegue sobreviver ou causar danos (Francis, 2012). Os programas generalistas de monitorização da qualidade ecológica da água, que, em geral, são estabelecidos no seguimento da implementação da

Diretiva-quadro da Água<sup>3</sup>, ao requererem um grande esforço de amostragem, podem constituir uma preciosa e profícua fonte de informação sobre a dispersão e o estabelecimento de espécies invasoras aquáticas como a amêijoia asiática, com enfoque nas condições ecológicas que sustentam a sua progressão. Tais programas podem portanto constituir um apoio fundamental à monitorização de espécies invasoras e assim facilitar a implementação de estratégias mais eficazes de gestão das invasões.

Apesar de algumas indústrias usarem a água da rede ou de furos subterrâneos para as suas atividades e, por isso, não necessitarem de estar particularmente alerta para o aparecimento de bivalves invasores, há um grande número de indústrias que, ou devido às grandes quantidades de água de que necessitam, ou por uma questão económica e/ou de comodidade, têm que fazer captação própria em rios, lagos ou albufeiras. Este é o caso das indústrias termoelétricas, que usam grandes quantidades de água para o arrefecimento de equipamentos; das estações de tratamento de água que utilizam grandes quantidades de água para torná-la própria para consumo humano; e, destas e outras indústrias que usam a água nos seus sistemas de arrefecimento e de prevenção contra incêndio. Devido aos prejuízos económicos avultados causados pelas infestações por bivalves invasores, estas indústrias procuram metodologias de monitorização que lhes permitam lidar de forma mais eficaz com estas espécies.

Nem todas as massas de água terão as características necessárias para que haja estabelecimento de populações invasoras de *C.fluminea*. Por isto, antes de iniciar um programa de monitorização, é necessário proceder a uma avaliação do risco de invasão e à identificação das estruturas mais suscetíveis à acumulação dos bivalves (a avaliação do risco de invasão tem como base as características biológicas da espécie invasora e da massa de água - mais informação poderá ser encontrada em Mackie e Claudi, 2010). Outra consideração importante antes do desenvolvimento de um programa de monitorização é o nível de sensibilidade da instalação. As instalações que possuem componentes considerados extremamente sensíveis à interrupção do funcionamento ou a dano por *biofouling* (tais como as estações de tratamento de água para consumo humano, onde a paragem do funcionamento para limpeza dos bivalves acumulados põe em causa o abastecimento de água às populações, e permutadores de calor em indústrias em que o arrefecimento de equipamentos é fundamental para garantir a segurança da instalação) precisarão de monitorização das primeiras fases de vida da amêijoia (pedivelígeras) regularmente. Por outro lado, as indústrias que até podem suportar o estabelecimento de populações de bivalves com densidades relativamente baixas (indústrias com condutas de diâmetro superior a 180 cm, onde tipicamente o caudal de água é superior a 2 ms<sup>-1</sup>) não terão necessidade de manter um nível de alerta tão elevado, sendo que poderão concentrar-se na menos exigente monitorização de bivalves juvenis e adultos. Em ambos os casos, a informação recolhida nos programas de monitorização implementados é fundamental para avaliar a necessidade de adoção de metodologias de controlo no futuro.

Para além da monitorização da massa de água onde é feita a captação, é importante que as indústrias suscetíveis monitorem também as suas instalações. Mackie e Claudi (2010) definem dois tipos de monitorização de bivalves invasores em contexto industrial: a monitorização da fonte de água primária, que pode ser um lago natural ou artificial (p. ex. uma albufeira), um canal ou um rio, commumente designada

<sup>3</sup> A Diretiva Quadro da Água (Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000) estabelece um quadro de ação comunitária para a proteção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas. O documento resultante da transposição desta Diretiva para a legislação portuguesa pode ser encontrado em <http://www.dre.pt/pdf1sdip/2005/12/249A00/72807310.PDF>

de monitorização da corrente principal; e a monitorização de um sistema onde circula água proveniente da fonte primária e onde são simuladas as condições a que as condutas da instalação estão sujeitas, que se designa geralmente monitorização paralela. De uma forma geral, deverá usar-se a monitorização da corrente principal se ainda não existirem amêijoas na massa de água. No entanto, é recomendável o uso dos dois tipos de monitorização em simultâneo; desta forma é possível, não só detetar precocemente o estabelecimento de populações de bivalves na massa de água, como também sinalizar eficazmente a entrada dos primeiros bivalves na instalação antes que haja possibilidade de aí se estabelecerem; e, em última instância, quando a indústria já está afetada e já estão a ser aplicadas métodos de controlo, avaliar a eficácia desses mesmos métodos.

Cada indústria terá as suas especificidades e as metodologias de monitorização deverão ser ajustadas de acordo com cada realidade, mas existem orientações metodológicas básicas que deverão ser seguidas (Figura 2), bem como técnicas de amostragem que se ajustam a programas de inspeção inicial (i) e/ou a programas de monitorização de longo-termo (ii).

#### (i) Inspeção inicial

A inspeção inicial é um programa de monitorização que visa a deteção da presença de uma espécie invasora, no caso da amêijoa asiática, nas massas de água próximas ou dentro de instalações industriais suscetíveis. Seguindo as orientações gerais patentes na Figura 2, o estabelecimento de um programa de monitorização deste tipo deverá ter em conta as seguintes indicações:

- **OBJETIVO:** A inspeção inicial de um local ou instalação tem como objetivo determinar se a amêijoa asiática está presente na massa de água que alimenta a instalação industrial e nos locais da instalação onde se poderá acumular preferencialmente – reservatórios de água com tempos de retenção significativos, zonas de baixo caudal (inferior a  $2 \text{ ms}^{-1}$ ), filtros fixos, bem como se a densidade das populações estabelecidas requer a adoção de medidas de controlo (populações com densidades superiores a  $1500 \text{ amêijoas m}^{-2}$ , valor a partir do qual se classifica uma infestação de intensidade moderada).
- **TIPO E LOCAL DE AMOSTRAGEM:** Tendo em conta o objetivo deste tipo particular de monitorização, é necessário desenhar o programa de amostragem considerando as diferentes fases do ciclo de vida do organismo (pedivelgeras, juvenis e adultos), o que na prática e para o efeito pretendido significa procurar abranger toda a gama de tamanhos corporais, em várias zonas da massa de água e da instalação



FIGURA 2: Diagrama com as etapas que devem ser cumpridas para o desenho de um programa de monitorização antes da sua aplicação.

industrial. As pedivelígeras e juvenis podem estar presentes na coluna de água, por ação das correntes e/ou de mecanismos fisiológicos que apoiam a flutuação (produção de uma substância mucosa em células especializadas das demibrânquias, que assiste a impulsão do organismo para ficar suspenso na coluna de água e assim iniciar a dispersão com as correntes), mas apenas por breves períodos e durante ou logo após a época de reprodução. Esta fase do ciclo de vida de *C. fluminea* é muito curta e as pedivelígeras e os juvenis mais pequenos não são facilmente identificáveis a olho nu. Tendo em conta estas particularidades, a amostragem de plâncton para deteção da presença de pedivelígeras no sistema é muito pouco fidedigna. Assim, a maneira mais eficaz de avaliar diretamente a presença da espécie é a procura de bivalves em fases juvenis avançadas e adultos. Nestas fases as amêijoas vivem enterradas no sedimento. A bibliografia indica que *C. fluminea* têm preferência por substrato arenoso, privilegiando substratos heterogêneos com uma mistura de areia, pedras e rochas (Strayer, 1999; Reis, 2006), pelo que devem ser procuradas com particular empenho em locais com estas características. No entanto, uma vez que há registo de populações extensas de amêijoa asiática em substratos de outros tipos, devem também ser amostradas zonas com características diferentes, em particular zonas lodosas e zonas com seixos, cascalho, areia, argila, etc. A verificação da presença de amêijoa dentro da instalação industrial pode ser feita recorrendo à inspeção visual de zonas acessíveis como condutas, valas e filtros ou à inspeção de amostradores associados à monitorização paralela como a *biobox* (detalhes sobre estes amostradores são apresentados a seguir).

- **TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM:** O método de amostragem aplicado para a deteção inicial da presença de amêijoa num determinado sistema aquático não precisa de ser quantitativo. Rosa et al. (2011b) propuseram um método de amostragem qualitativa simples que consiste na recolha do sedimento com uma pá e posterior despejo do conteúdo da pá para um saco de rede com malha larga (0,5 – 1 cm; por exemplo, um saco de batatas serve este propósito). O saco deve ser bem agitado dentro de água de modo a fazer uma crivagem grosseira do sedimento e, depois desta lavagem, é despejado para um tabuleiro onde se verifica a presença de amêijoas. No contexto da monitorização paralela, a metodologia mais popular de inspeção inicial qualitativa passa pelo uso de monitores em forma de caixa (p.ex. de material acrílico ou adaptando aquários), conhecidos por *bioboxes*. Esta metodologia foi desenvolvida para a monitorização do mexilhão-zebra e faz uso da sua capacidade de se fixar em substratos sólidos através do bisso, pelo que, dentro da caixa, são colocadas placas (p.ex. de material acrílico) com diversas configurações, de tal forma que apenas é deixado um espaço (na zona superior, lateral ou na superfície da placa através de um buraco) para que a água possa circular e os bivalves possam avançar no sistema (Figura 3). Uma vez que a amêijoa asiática não possui a capacidade de se fixar, neste caso as placas funcionarão apenas como barreira física à progressão das mesmas ao longo da caixa, podendo ser ajustadas à configuração particular das estruturas submersas de cada instalação industrial. A deteção de juvenis e adultos na *biobox* não requer a aplicação de um procedimento de amostragem porque a área a analisar é muito limitada, podendo efetuar-se a simples observação da caixa para verificar a presença de amêijoas. Em sistemas particularmente sensíveis poderá investir-se na deteção da presença de pedivelígeras na *biobox*. Para o efeito é necessário fazer passar toda a água contida na caixa (cerca de 20L) por um filtro (rede) de malha muito fina – uma malha de 65 µm é o mais indicado para evitar que se percam pedivelígeras que passem através da rede posicionadas em ângulos que não o do comprimento antero-posterior; no entanto, uma malha tão fina pode resultar na colmatação rápida da rede e, nestes casos, deve proceder-se à substituição da mesma no sistema de filtração tantas vezes quantas seja necessário. O material retido na(s) rede(s)

deverá ser analisado ao microscópio (o contraste de fase ou a luz polarizada, se disponíveis no microscópio a usar, podem facilitar em alguns casos a visualização da amostra).

• **REGISTOS E ANÁLISE DE DADOS:** De acordo com os objetivos previamente estabelecidos, deve ser registada a localização e características gerais dos locais amostrados, uma indicação da presença/ausência de amêijoas nas amostras recolhidas, uma indicação geral acerca da sua abundância<sup>4</sup> e estágios de vida encontrados<sup>5</sup> e, se possível, danos verificados. Se se confirmar a presença da amêijoia na massa de água deve fazer-se o registo do avistamento em plataformas que possam existir para o efeito - uma plataforma deste género na internet estará brevemente disponível, associada ao projeto Controlclam (vide secção de agradecimentos deste artigo).

**ii) Monitorização de longo-termo**

Uma vez detetada a presença do bivalve invasor nas imediações de uma indústria que poderá vir a ser afetada, ou quando se constata que uma determinada instalação já se encontra infestada e se pretende conhecer em maior detalhe a potencial progressão da espécie, deve estabelecer-se um programa de monitorização de longo-termo. Seguindo a metodologia proposta na Figura 2, o estabelecimento de um programa deste tipo deve considerar as seguintes indicações:

- **OBJETIVO:** No contexto desta abordagem de monitorização, têm-se como objetivo caracterizar temporal e espacialmente a dispersão de uma população de amêijoia asiática já estabelecida na massa de água que alimenta a instalação.
- **TIPO E LOCAL DE AMOSTRAGEM:** Para a caracterização da população estabelecida é fundamental aplicar métodos que permitam sinalizar as épocas de reprodução daquela população específica, bem como implica quantificar as amêijoas juvenis e adultas ao longo do ano, para isso estabelecendo uma rotina de amostragem com uma periodicidade relativamente apertada (p.ex. mensal). Durante a época de reprodução, os progenitores libertam as pedivelígeras para a coluna de água através dos sifões; como já foi

<sup>4</sup>p.ex. numa escala de 1 a 5 sendo 1 menos de 100 amêijoas m<sup>-2</sup> e 5 mais de 5000 amêijoas m<sup>-2</sup>

<sup>5</sup>p.ex. registar a presença/ausência de amêijoas juvenis (até 14 mm de comprimento, inclusive) e a presença/ausência de amêijoas adultas (> 14 mm)

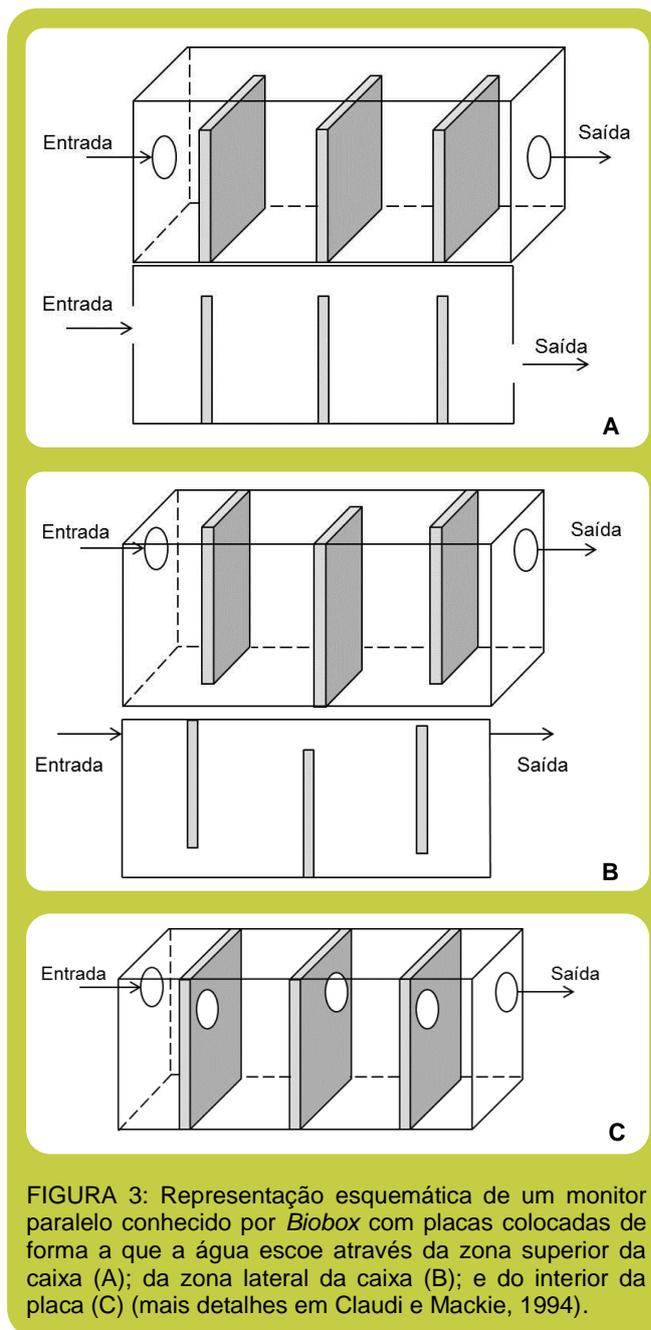


FIGURA 3: Representação esquemática de um monitor paralelo conhecido por *Biobox* com placas colocadas de forma a que a água escoe através da zona superior da caixa (A); da zona lateral da caixa (B); e do interior da placa (C) (mais detalhes em Claudi e Mackie, 1994).

acima detalhado, a amostragem das mesmas na coluna de água é pouco fidedigna e, no que diz respeito à monitorização de massas de água, alternativamente, deve focar-se a amostragem nas fases juvenil e adulta, podendo adicionalmente capturar-se amêijoas adultas de forma a verificar a presença de descendência em incubação (o que sinaliza eventos reprodutivos eminentes). Devem ser amostrados locais da massa de água com populações estabelecidas e as suas imediações. Dentro da instalação, a *biobox* pode funcionar como um amostrador quantitativo (ver detalhes abaixo).

• **TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM:** Nos planos de monitorização de longo-termo pretende-se geralmente avaliar a variação na densidade das populações amostradas, pelo que é necessário recorrer a instrumentos que permitam determinar o volume de sedimento recolhido ou área amostrada (amostragem quantitativa). Existem vários equipamentos disponíveis que servem este propósito (tais como dragas e *corers*), sendo que se podem utilizar equipamentos simples como o proposto por Britton e Morton (1982), referido por Rosa et al. 2011b: cilindro aberto com duas pegas, em que uma das extremidades do cilindro tem o bordo cerrado para facilitar a penetração deste no sedimento; o cilindro é empurrado para o substrato até ficar fixo e o material retido é recolhido com uma pá; após a passagem do sedimento por um saco de rede coloca-se o material crivado num tabuleiro e seleccionam-se e quantificam-se os tamanhos de interesse. Num trabalho rigoroso, recomenda-se a realização de pelo menos 3 amostragens deste tipo que funcionarão como réplicas. Usando o mesmo princípio e de forma igualmente simples, podem usar-se estruturas (quadrados ou cilindros de vários tamanhos que podem ser feitos de PVC, ferro, aço inoxidável, madeira) que delimitam uma área sobre o substrato a amostrar (Figura 4). O material que ficar dentro do delimitador é removido com uma pá para um saco de rede e procede-se como descrito em cima.



FIGURA 4: Delimitadores no formato quadrado (ao fundo) e circular (à frente). Foto de D. Pereira e J.O. Arruda (Mansur et al., 2012); publicação simpaticamente autorizada pelos autores.

A verificação da presença de descendência em incubação em amêijoas adultas pode ser feita de acordo com a metodologia proposta por Mansur et al. (2012). Os autores propõem recolher os organismos, enrolá-los em algodão ou gaze humedecida (permite manter a integridade das estruturas biológicas fora de água<sup>6</sup>, evitando a sua dessecação) e acondicioná-los em recipientes de plástico, que são posteriormente colocados em caixas de esferovite com gelo (o arrefecimento fomenta a diminuição das taxas metabólicas do organismo, evitando a acumulação de metabolitos tóxicos que o animal não pode excretar por estar fora de água). Quando o animal é desembalado e colocado num tabuleiro com água e alimento, a descendência que esteja a ser incubada é libertada logo de seguida. Através da visualização da amostra de água do tabuleiro ao microscópio (as opções de contraste de fase ou a luz polarizada podem facilitar a visualização da amostra), as pedivelígeras podem ser facilmente identificadas e contabilizadas.

<sup>6</sup> O transporte de organismos em água para os fins definidos apresenta um problema associado: uma das estratégias que estes organismos empregam para fazer face à atuação de agentes de *stress* é a libertação da descendência que se encontra em desenvolvimento; desta forma aumentam as probabilidades de garantir a sobrevivência da população (se alguns dos descendentes se conseguirem desenvolver para dar continuidade à população quando as condições ambientais voltarem a ser favoráveis). Como o interesse neste caso é a verificação da existência de descendência em incubação, é de evitar o transporte em água que potenciará o fenómeno descrito. Quando estão fora de água as amêijoas tendem a proteger-se mantendo as valvas fechadas, metabolizando em níveis mínimos e em condições de anóxia, mesmo por períodos relativamente grandes de tempo.

Se mantido por longos períodos dentro da instalação, a *biobox* pode funcionar como um amostrador quantitativo (conhecida a área da face inferior (fundo) e/ou volume de água que contém) que permite, não só quantificar amêijoas juvenis e adultas, como também pedivelígeras.

- **REGISTOS E ANÁLISE DE DADOS:** Qualquer das técnicas de amostragem quantitativas sugeridas permite obter valores de densidade de amêijoas no local amostrado. No caso dos métodos que utilizam cilindros, quadrados de amostragem, dragas, *corers*, etc, a densidade de amêijoas é facilmente calculada conhecendo a área de amostragem de cada um dos instrumentos (naturalmente que a quantificação da amostra envolve um passo adicional de extrapolação para uma determinada medida de área normalizada, geralmente 1 m<sup>2</sup>). Seguindo o mesmo princípio, a densidade de amêijoas juvenis e adultas na *biobox* pode ser obtida através da contagem de todos os indivíduos contidos na caixa no momento da amostragem e dividindo o número obtido pela área da mesma (nº indivíduos m<sup>-2</sup>). A densidade de pedivelígeras também pode ser obtida através da divisão do número de pedivelígeras contabilizadas pelo volume de água que passa pelos crivos de rede (ver acima metodologia de inspeção da *biobox* para observação de pedivelígeras). Uma das formas mais simples de integrar dados de densidade populacional registados ao longo do tempo, e elucidativas das variações nas populações analisadas, é a construção de histogramas de frequência de classes de tamanho. A comparação dos histogramas ao longo do tempo permite concluir acerca das variações da população no local estudado, nomeadamente crescimento/regressão, tempo médio de vida da população, fase de recrutamento de juvenis, etc. A figura 5 evidencia este tipo de análise.

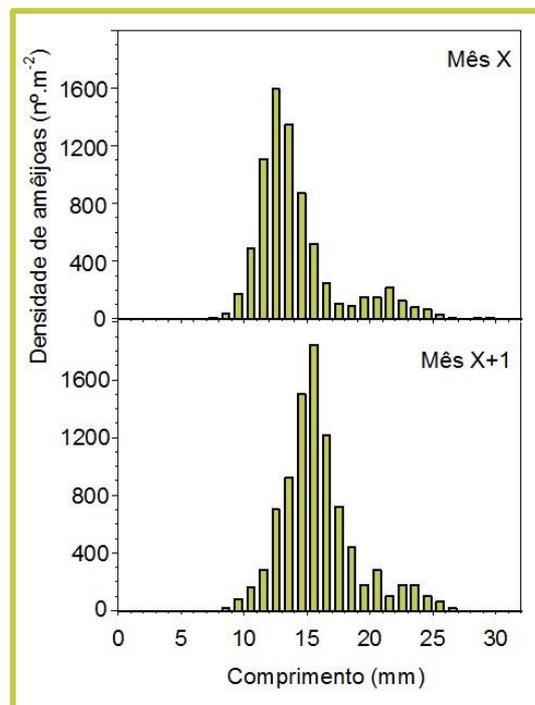


FIGURA 5: Histogramas de frequência de tamanhos, construídos com base em medições feitas numa população de amêijoas asiática em dois meses consecutivos. Apesar de só estarem identificados juvenis >8mm, o período reprodutivo é identificado pelo avanço das barras (identifica o crescimento dos indivíduos ao longo do tempo). Dados simpaticamente fornecidos por Inês Rosa.



## MÉTODOS DE CONTROLO DE BIVALVES DE ÁGUA DOCE EM CONTEXTO INDUSTRIAL

Estão disponíveis várias opções para controlo de bivalves invasores em contexto industrial e o desafio passa pela escolha e aplicação de uma metodologia com uma razão custo-eficiência favorável. Nem sempre as indústrias sentirão necessidade de implementar metodologias de controlo. Por vezes a espécie invasora de interesse estabelece-se na massa de água que alimenta a instalação industrial com densidades baixas, não representando uma ameaça; noutras situações pode ocorrer infestação da instalação, mas a densidade de bivalves que se acumulam até cada paragem periódica ordinária para limpeza não justifica recorrer a métodos de controlo adicionais para além da remoção física. Torna-se assim importante fazer uma pré-avaliação dos danos causados, bem como conhecer em pormenor a dinâmica específica da população que potencialmente afetará a instalação (através de planos de monitorização). Após constatar que a espécie irá causar danos significativos na instalação industrial, que causarão prejuízos significativos,

deverá ser feita uma avaliação individual das estruturas vulneráveis, das estratégias de controlo/mitigação que melhor se aplicam e da capacidade de tratar eventuais efluentes<sup>7</sup> resultantes da aplicação dos métodos de controlo/mitigação selecionados.

As medidas de controlo de bivalves invasores neste contexto podem ser classificadas de reativas ou proactivas. As medidas reativas são usadas quando é possível tolerar algum grau de *biofouling* sem comprometer a eficácia e/ou segurança do processo/sistema. Estas medidas têm como objetivo impedir que os bivalves se estabeleçam e têm como alvo principal os organismos adultos. Podem ser químicas (dosagem de químicos periodicamente ou no final da época de reprodução) ou não-químicas (choque térmico, dessecação, etc.) e, normalmente, são a primeira escolha quando se encontra uma infestação significativa pela primeira vez. Os métodos de controlo proactivos são usados para prevenir a acumulação de bivalves num dado local e são indicados para atuar sobre as primeiras fases de vida da espécie. As estratégias proativas são geralmente químicas, envolvendo a dosagem de químicos de forma intermitente, semi-contínua ou contínua.

A estratégia central na maioria dos programas de controlo proactivo e reativo de bivalves *biofoulers* em instalações industriais é o tratamento com cloro. Dado haver alguns inconvenientes associados à administração desta substância, nomeadamente a formação de compostos carcinogénicos (Morris et al., 1992), e o conseqüente aumento das limitações legais associadas, têm-se procurado soluções alternativas. Assim, tem vindo a ser avaliado o potencial do tratamento com doses letais de químicos tóxicos, de que são exemplos: o polímero catiónico polyDADMAC, que se crê que, à semelhança de outros polímeros surfatantes, atue sobre a osmorregulação das células, prejudicando, em primeira instância, a normal filtração do organismo, e induzindo a morte por asfixia (Post et al., 1996); o ião potássio (geralmente utilizando o sal KCl na dosagem) que, à semelhança do verificado no mexilhão-zebra, crê-se que provoque a despolarização das membranas, comprometendo a sua função (Fisher et al., 1991); o agente moluscicida niclosamida, que, à semelhança do verificado no molusco de água doce *Biomphalaria alexandrina*, crê-se que interfira na respiração celular (Ishak et al., 1970).

As estratégias de controlo de natureza química têm tendência a ser mais eficientes, económicas e versáteis relativamente a outros tipos de métodos de controlo de *biofouling*, podendo ser facilmente aplicadas em indústrias (particularmente naquelas cujo sistema de circulação de água é fechado ou semi-fechado e/ou há tratamento das águas residuais antes da descarga no ambiente) e permitindo a proteção completa do sistema contra uma grande variedade de *biofoulers*, incluindo bivalves invasores. Apesar das vantagens deste tipo de tratamento, os biocidas disponíveis até à data possuem uma relação custo-eficiência desfavorável e/ou causam impactos negativos significativos em organismos não-alvo, o que condiciona a sua aplicação à possibilidade de tratamento dos resíduos gerados antes da sua descarga a jusante da instalação. As estratégias de controlo não-químicas consideram desde técnicas de carácter tipicamente proactivo, como galerias de infiltração e filtros de areia<sup>8</sup>, até às técnicas geralmente classificadas como

<sup>7</sup> Líquido ou gás resultante de uma atividade humana e que é lançado para o ambiente

<sup>8</sup> Estas metodologias têm como base a construção de reservatórios geralmente subterrâneos. As paredes destes são permeáveis de forma a permitir a filtração da água. Para mais informações acerca desta metodologia consultar Mackie e Claudi (2010)

reativas, como a limpeza mecânica, a mitigação por dessecação<sup>9</sup> ou a utilização de agentes biológicos de controlo.

Não existe nenhuma metodologia de controlo de bivalves invasores completamente eficaz e ambientalmente segura, por isso têm sido procuradas novas metodologias, mais eficientes e com menor impacto negativo em organismos não-alvo. Algum do trabalho que tem sido feito neste sentido passa pela avaliação do potencial biocida de substâncias naturais como óleos essenciais de plantas; de combinações de dois ou mais compostos tóxicos que produzam o efeito pretendido com doses mais reduzidas de cada composto envolvido (e.g. Costa et al., 2011); de toxinas altamente específicas - por exemplo, foi já desenvolvido e testado, com algum sucesso, um biocida específico para o mexilhão-zebra composto por toxinas produzidas pelas bactérias *Pseudomonas fluorescens* (estirpe CL145A) que afetam negativamente o bivalve sem afetar organismos não-alvo, comercializado sob o nome Zequanox<sup>®10</sup> (Marrone Bio Innovations, Inc.); de químicos encapsulados (BioBullets<sup>11</sup>), permitindo uma administração direta e mais concentrada do agente biocida nos organismos-alvo. A viabilidade prática do controlo biológico direto e indireto também tem sido analisada recorrendo a espécies potencialmente predadoras de *C. fluminea* tais como o peixe-gato, *Pterodoras granulosus* (Garcia & Montalto 2006), o barbo, *Barbus sp.*, a carpa, *Cyprinus carpio*, e a perca-sol, *Lepomis gibbosus* (French 1993).

A tabela 1 resume as principais medidas de controlo de bivalves invasores, incluindo a amêijoia asiática, que são aplicadas/aplicáveis em contexto industrial ou que têm vindo a ser desenvolvidas com essa finalidade.

TABELA 1: Resumo dos métodos disponíveis ou em desenvolvimento para controlar bivalves invasores na indústria (baseado em Sousa et al., *in press*)

Tipo de Controlo	Método
Químico	Químicos oxidantes cloro, dióxido de cloro, cloroaminas, ozono, bromo, peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio
	Químicos não oxidantes aminas quaternárias, niclosamida, formulações encapsuladas (BioBullets), nitrato de amónio, ião cobre, ião potássio, metabisulfito de sódio, coagulantes, floculantes, variações extremas de salinidade, agentes de ajuste de pH
	Limpeza química <sup>(a)</sup>
Não Químico	filtros de areia, galerias de infiltração, filtração mecânica, luz ultravioleta, corrente elétrica, agitadores de alta velocidade, aumento de caudal, campo magnético, choque térmico, privação de oxigénio, limpeza mecânica.
Biológico	agentes predadores biocida de base bacteriológica (Zequanox <sup>®</sup> ) extratos ou exudados de plantas

<sup>(a)</sup> Consiste na aplicação de misturas inorgânicas de ácidos (p.ex. misturas de ácido fosfórico) que dissolvem as conchas dos bivalves e outros produtos derivados da corrosão sem danificar as tubagens. Esta metodologia é usada quando o diâmetro das tubagens é pequeno e é muito difícil ou até mesmo impossível limpar mecanicamente.

<sup>9</sup>Processo de secagem extrema. A utilização deste processo, como forma de controlo, envolve a drenagem da água das tubagens e pode requerer a paragem do processo durante um período de tempo prolongado.

<sup>10</sup>Mais informação acerca do produto em <http://www.marronebioinnovations.com/products/brand/zequanox/>

<sup>11</sup>Mais informação acerca do produto em Aldridge et al., 2006 e Costa et al., 2011

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE QUÍMICOS PARA O CONTROLO DE *C. fluminea***

Apesar de existir um grande número de compostos químicos capazes de provocar a morte da amêijoia asiática, o seu uso em programas de controlo está muitas vezes restringido pela relação custo-eficiência, pelos impactos provocados quando libertados para o ambiente e pelo custo do tratamento necessário para a desativação ou remoção do efluente. Torna-se assim necessário encontrar estratégias que permitam otimizar o tratamento químico, minimizando os impactos em organismos não-alvo embora mantendo ou melhorando a sua eficiência. Estas estratégias podem passar pela descoberta de novos biocidas ou pela conceção de métodos de aplicação mais adequados de agentes de controlo químico já existentes.

Grande parte da metodologia de desenvolvimento de novos métodos de controlo passa pela realização de testes de toxicidade, cujo princípio fundamental é o reconhecimento de que a resposta de organismos vivos à presença de um agente tóxico (exposição) é dependente da dose (nível de exposição) desse mesmo agente. Usando este princípio, os testes de toxicologia aquática permitem descrever a relação entre quantidades de contaminante e a natureza e grau de efeitos nocivos (tóxicos) que provocam em organismos aquáticos expostos – relação dose-resposta. Estes bioensaios podem ser agudos, em que tipicamente são aplicadas doses elevadas do agente testado e os efeitos (geralmente letais) são avaliados após um curto período de tempo (ensaios de curta-duração); ou crónicos, em que as doses aplicadas são mais moderadas e os efeitos são avaliados após, ou ao longo de um período de tempo mais extenso (longa duração).

### **• Testes de toxicidade aguda com *C. fluminea* para avaliar a eficiência de químicos para o controlo de populações infestantes**

No caso dos testes agudos com *C. fluminea*, os organismos-teste são expostos a concentrações elevadas de agente tóxico, geralmente por um período de 72 h a 96 h. Durante o ensaio, uma vez por dia ou uma vez de dois em dois dias, é feito o registo da mortalidade dos organismos. Ao contrário de alguns bivalves que, ao morrer, relaxam os músculos adutores e as valvas ficam abertas, no caso da amêijoia asiática nem sempre isso acontece. Assim, é necessário verificar sempre se os organismos que se encontram com as valvas fechadas estão ou não vivos. Para isso, força-se cuidadosamente a entrada de uma agulha de disseção entre as duas valvas, na zona oposta aos sífões (lado anterior; ver Rosa et al. 2001b); se o organismo oferecer resistência à abertura das valvas está vivo, enquanto se não se sentir essa resistência o organismo está morto (Figura 6).



FIGURA 6: Avaliação da mortalidade por introdução de uma agulha entre as valvas.

Normalmente a mortalidade, para cada período de teste, é expressa em termos de taxa, relativizando o nº de organismos encontrados mortos ao número total de organismos testados. Normalmente são expostos 10 organismos-teste, em 500 ml de água desclorinada<sup>12</sup> ou outro meio adequado (p.ex. água de um lago com boa qualidade, água de um poço que não esteja contaminada, água filtrada por filtros de polipropileno e carvão ativado), a cinco ou mais concentrações do agente que está a ser testado e a um controlo (meio de teste não contaminado). Os níveis de exposição estabelecidos devem ser replicados pelo menos três vezes

<sup>12</sup> Geralmente obtém-se água desclorinada deixando água da torneira com arejamento contínuo por, pelo menos, 24h antes de utilizar. Os métodos químicos para retirar o cloro da água devem ser evitados pois podem interferir com a resposta dos organismos aos agentes que estão a ser testados durante os testes.

para que seja possível verificar/controlar a variabilidade dentro de cada tratamento e, pelo menos no início e no final do teste devem ser registados os parâmetros de qualidade da água mais relevantes, tais como a temperatura, o pH, o oxigénio dissolvido, a salinidade ou condutividade e a dureza. Estes testes têm a vantagem de permitir rapidamente tirar conclusões sobre o efeito letal dos químicos, sendo os seus resultados uma importante indicação acerca da eficiência do químico testado enquanto agente potencial de controlo da amêijoia asiática. Um dos parâmetros que é normalmente estimado com base nos dados de mortalidade registados nestes testes é o  $CL_{50}$ <sup>13</sup>. Este valor é obtido

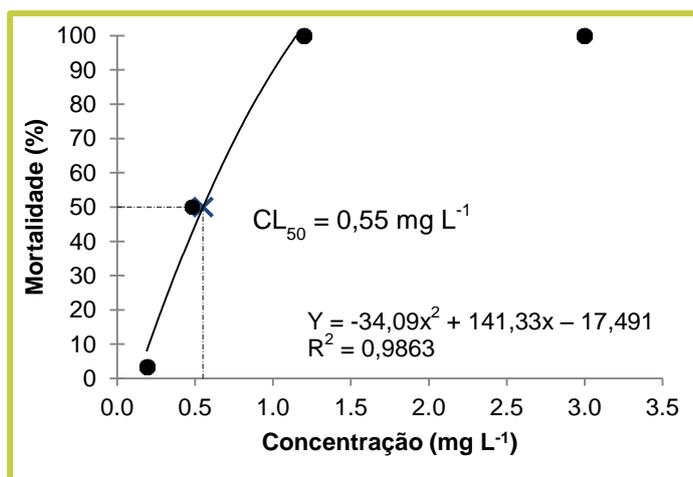


FIGURA 7: Curva dose-resposta (mortalidade) obtida após a exposição de *C. fluminea* a um moluscicida, durante 96h. Os pontos representam as respostas obtidas e a curva constitui uma representação gráfica de um modelo matemático ajustado às respostas (apresentado no canto inferior direito do gráfico, juntamente com o  $R^2$ , uma medida da qualidade do ajuste). A tracejado é indicado um método prático para estimar o  $CL_{50}$ . O gráfico e o ajuste do modelo foram efetuados com base em dados fictícios no software Microsoft® Excel®.

através da análise estatística do modelo dose-resposta, que consiste na representação gráfica do melhor ajuste possível de uma função matemática aos dados experimentais da mortalidade dos organismos (resposta) quando sujeito a várias concentrações de biocida (dose) (Figura 7). Em alternativa pode

usar-se software open-source de interface amigável especificamente direcionados para fornecer este(s) parâmetro(s) em face de uma tabela com as concentrações usadas e os dados obtidos nos testes (um exemplo deste tipo de recursos pode encontrar-se em <http://sdi.odu.edu/model/lc50.php>; acesso ao website em setembro de 2013).

#### • Testes de longa duração (toxicidade crónica) para avaliar a eficiência de químicos para o controlo de populações infestantes de *C. fluminea*

Os testes de toxicidade crónica são testes de longa duração, desenvolvidos para medir o efeito de um agente tóxico num organismo durante um período de tempo significativo da sua vida (tipicamente, um décimo ou mais da esperança média de vida deste). Os organismos-teste são expostos a uma gama de concentrações muito mais baixa do que a usada em testes de toxicidade aguda com o mesmo agente, avaliando-se os efeitos sub-letais do agente tóxico em parâmetros biológicos como reprodução, crescimento e comportamento. Normalmente é monitorizado o efeito sobre a sobrevivência mas em geral não é este o objetivo principal do estudo. Quando a amêijoia asiática é o organismo-teste e está a ser analisada a eficiência de biocidas para potencialmente integrarem métodos de controlo de infestações, podem aplicar-se testes de longa-duração, mas estes não se podem entender estritamente de acordo com a definição acima descrita. O parâmetro avaliado é geralmente a mortalidade e não se pode considerar que sejam testes crónicos *sensu stricto* já que tipicamente não se prolongam por um período de tempo suficientemente alargado considerando o ciclo de vida do bivalve.

<sup>13</sup> Concentração Letal mediana – concentração estimada que provoca a morte a 50% dos organismos testados num determinado período de tempo.

Normalmente são expostas 30 amêijoas em 1,5 L de água desclorinada (ou outro meio adequado como descrito na seção acima) a duas ou mais<sup>14</sup> concentrações do agente tóxico que está a ser testado. Pelas mesmas razões referidas nos testes agudos, as amêijoas são expostas adicionalmente a um tratamento controlo, os níveis de exposição devem ser replicados pelo menos três vezes e, no início, periodicamente ao longo do teste, e no final do teste, devem ser registados os parâmetros da qualidade da água mais relevantes. De 48h em 48h<sup>15</sup> é verificada a mortalidade de cada amêijoa pelo método descrito na secção anterior e, uma vez que o teste se prolonga por um período de tempo alargado, é necessário nesta altura

substituir o meio de teste e alimentar as amêijoas - uma boa opção é utilizar suspensões concentradas de microalgas verdes numa concentração de cerca de  $8 \times 10^4$  células/mL (Bidwell et al., 1995), mas há alternativas mais acessíveis para alimentar este organismo conforme sugerido em Rosa et al. (2011b). A substituição do meio de teste consiste na transferência das amêijoas para recipientes limpos com soluções de teste renovadas.

Os resultados são analisados em termos de perfis temporais de mortalidade para dosagens específicas, ou seja, determina-se o tempo necessário para que uma dada concentração de químico dosado provoque a morte a uma percentagem de interesse (normalmente 50%) dos organismos-teste -  $TL_{50}$ <sup>16</sup> (Figura 8).

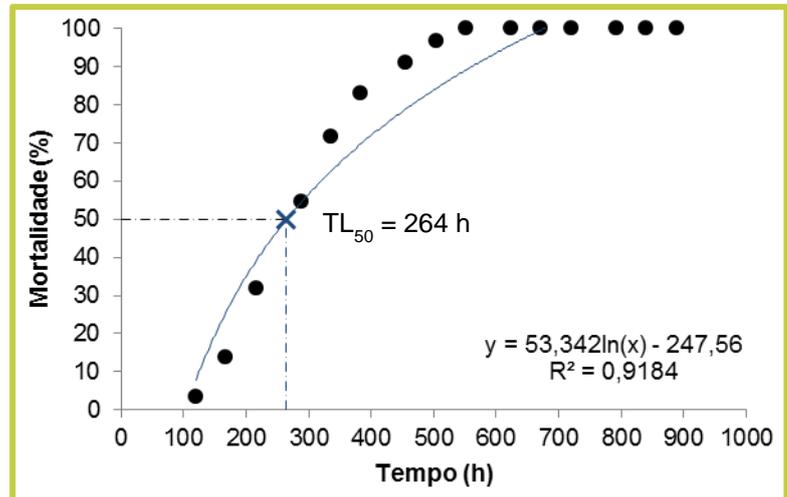


FIGURA 8: Representação gráfica da variação da mortalidade da amêijoa asiática com o tempo de exposição a uma dada concentração de químico. Os pontos representam as respostas obtidas e a curva constitui uma representação gráfica de um modelo matemático ajustado às respostas (apresentado no canto inferior direito do gráfico, juntamente com o  $R^2$ ). A tracejado é indicado um método prático para estimar o  $TL_{50}$ . O gráfico e o ajuste do modelo foram efetuados com base em dados fictícios no software Microsoft® Excel®.

#### • Testes de toxicidade em organismo não-alvo

Ao propor agentes de controlo é necessário ter em conta a sua seletividade, isto é, eles devem ser efetivos contra o alvo, mas devem ter o mínimo impacto no ecossistema onde é feita a descarga dos efluentes resultantes do tratamento. Para avaliar este aspeto, pode empregar-se uma abordagem ecotoxicológica típica, realizando-se testes de toxicidade para quantificar o efeito do químico de interesse em organismos não-alvo considerados modelo. A resposta destes organismos, que geralmente são bastante sensíveis a diferentes agentes de stress ambiental, fornece informação acerca do potencial do químico para promover impactos negativos no ambiente. Os organismos-modelo mais comuns para estudos em meio aquático são as microalgas verdes, como *Pseudokirchneriella subcapitata* (vide protocolo de teste em Marques et al.,

<sup>14</sup> É essencial fazer um cuidado planeamento da experiência para que não se torne inviável a verificação de mortalidade por terem sido estabelecidos demasiados tratamentos experimentais.

<sup>15</sup> Este período poderá ser estendido para 72h quando não for possível cumprir o período de 48h, ou pode ser diminuído para 24 h se tal for necessário para o químico em questão (efeitos mais drásticos).

<sup>16</sup> Tempo Letal mediano – tempo estimado requerido para a morte de 50% das amêijoas expostas a uma determinada concentração.

2009), e os dafnídeos, como *Daphnia magna* (vide protocolo de cultivo e teste e.g. em Pereira e Gonçalves, 2009 e Castro et al., 2009).



## ATIVIDADES PRÁTICAS NO ÂMBITO DA MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DE *C. fluminea*

Amêijoa asiática é um bom modelo biológico e apresenta vantagens para ser usada como objeto de estudo no Ensino Básico e Secundário. Rosa et al. (2011b) sumariaram algumas vantagens da espécie, entre elas a ocorrência em grandes quantidades, a fácil recolha e manutenção em laboratório, o tamanho apropriado para ser manuseada sem recorrer a instrumentos de ampliação e o facto de apresentar um ciclo de vida relativamente curto, com pelo menos dois períodos reprodutores anuais, o que permite ter indivíduos de diferentes fases do ciclo de vida num mesmo local e com alguma frequência. Assim, e tendo em conta que a espécie se encontra já estabelecida na maior parte das bacias hidrográficas portuguesas, a realização de atividades nela focadas ou que a utilizem enquanto organismo experimental é uma iniciativa acessível e de fácil implementação nas escolas do Ensino Básico e Secundário. Nesta secção sugerimos duas atividades que se enquadram *sensu lato* nos dois temas abordados no presente artigo: monitorização e controlo da amêijoa asiática. Não obstante a ligação que as atividades possam ter com estes dois temas, é possível adaptar estas atividades a outros conteúdos educativos formais e não-formais, tirando assim partido das características da espécie enquanto organismo-modelo e/ou da sua abrangente dispersão.

### • Atividade 1 – Avaliação dos impactos de *C. fluminea* em indústrias hidro-dependentes

O investimento num programa de monitorização, por parte de uma indústria hidro-dependente, deve ser precedido por uma avaliação do risco de invasão, pela identificação das estruturas mais suscetíveis à acumulação de bivalves dentro da instalação industrial e do nível de sensibilidade dessas mesmas estruturas (vide mais detalhes na secção “Métodos de monitorização de populações de amêijoa asiática”).

Neste contexto<sup>17</sup>, sugerimos a realização de um inquérito ao conjunto de indústrias hidro-dependentes que utilizem água de cursos ou massas de água acessíveis pelo grupo de trabalho. A realização do inquérito, que poderá ser acompanhado ou não de uma visita às instalações (conforme interesse e/ou disponibilidade do grupo de trabalho), deverá ser precedida de uma série de etapas preparatórias identificadas no diagrama da figura 9, que otimizarão a relação entre esforços investidos e resultados obtidos. Estas etapas permitirão definir um grupo de indústrias/instalações onde a infestação pela amêijoa asiática poderá então ser analisada em maior detalhe. Em resumo, este grupo reunirá as indústrias que captam água à superfície (a captação em profundidade ou a utilização de água da rede exclui, à partida, o risco de infestação) em massas de água onde estão estabelecidas populações de amêijoa asiática.

A aplicação de um inquérito durante uma visita às instalações selecionadas deverá permitir uma análise detalhada da infestação - p. ex. o processo industrial que envolve a água captada poderá ser esquematizado em diagramas como o que se apresenta na figura 10, onde se poderão assinalar os locais onde há maior acumulação de organismos -, dos seus impactos - poderá ser feito um cálculo dos custos associados à infestação e do seu peso no orçamento anual de cada empresa afetada - e das respostas eventualmente dadas ao problema; se existirem programas de monitorização em curso ou metodologias de

<sup>17</sup> Este tipo de atividade pode ser realizada também para avaliar/quantificar os impactos económicos da espécie, à semelhança do que foi efetuado por Rosa et al. (2011a), neste caso abrangendo todo o território nacional continental.

controlo aplicadas, estes poderão ser registados e a sua eficácia analisada. Esta análise poderá ser tão extensiva quanto o desejado, de acordo com os objetivos específicos de cada grupo de trabalho. No Anexo I apresenta-se um exemplo de um inquérito baseado no que foi aplicado em Rosa et al. (2011a), que pode servir como modelo nesta atividade. O inquérito foca aspetos relacionados com a configuração do sistema (considerando p. ex. bombas, filtros de malha variada, diâmetro de tubagens), com o tipo de estruturas afetadas pela infestação e as condições nessas estruturas, as eventuais estratégias usadas para fazer face ao problema e os custos associados ao mesmo.

**Definição da bacia hidrográfica/massas de água a focar**

1. Consulta de mapas, p. ex. usando a plataforma *Google Earth*
2. Verificação da presença da espécie na(s) massa(s) de água selecionada(s) – *vide* acima os métodos de amostragem sugeridos (métodos de monitorização - inspeção inicial)

**Listagem das indústrias potencialmente suscetíveis a infestações na área selecionada**

Pesquisa em *websites* de associações industriais e organismos governamentais, focada nos setores nos quais se incluem instalações que requerem utilização de água, nomeadamente:

- Estações de tratamento de água para consumo humano (ETAs)
- Centrais termoelétricas
- Cimenteiras
- Fábricas da pasta e papel
- Sistemas de irrigação de culturas

**Contacto preliminar com cada instalação listada**

Contacto telefónico ou via email com cada instalação para definir o grupo de instalações de interesse específico:

- Captam água à superfície
- Enfrentam ou enfrentaram episódios de infestação

**Aplicação do inquérito**

Poderá ser feito telefonicamente, mas a marcação de uma visita às instalações proporciona uma melhor visualização e caracterização do problema, assim como facilita a eventual integração de conteúdos curriculares de outras disciplinas

FIGURA 9: Diagrama com as etapas fundamentais associadas à planificação da análise detalhada de problemas de infestação de instalações industriais hidro-dependentes por *C. fluminea*.

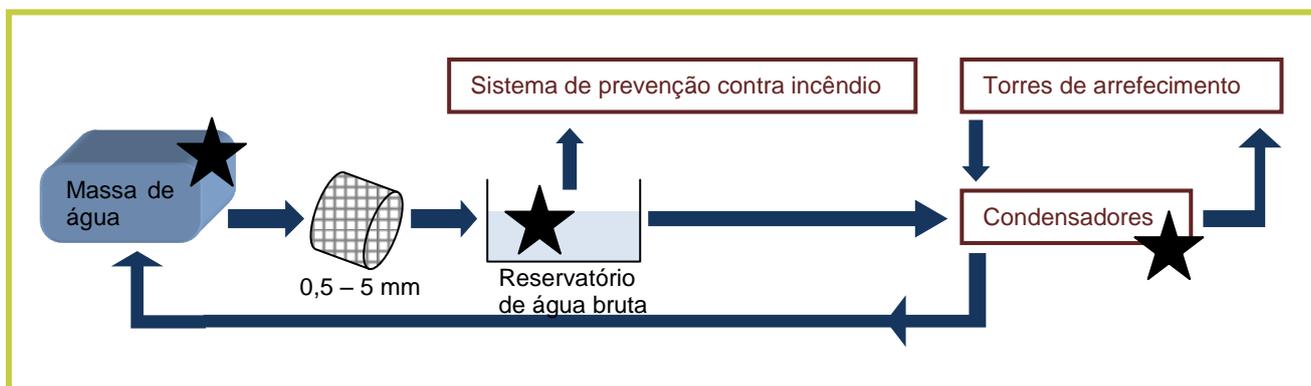


FIGURA 10: Diagrama que esquematiza a configuração básica dos sistemas de circulação de água numa central termoelétrica portuguesa infestada por *C. fluminea*. As estrelas assinalam os locais afetados. Baseado em Rosa et al. 2011a.

**• Atividade 2 – Ensaio de toxicidade aguda usando *C. fluminea* como organismo-teste**

Tal como foi abordado ao longo deste artigo, a amêijoia asiática é um organismo invasor que traz muitos problemas às indústrias que utilizam a água dos cursos infestados por esta espécie. Assim, vários métodos têm sido propostos para o controlo de infestações industriais de *C. fluminea*, entre eles a utilização de

químicos que levem ao extermínio dos organismos provocadores do problema. Muitos têm sido os químicos estudados para este efeito. Os testes de toxicidade que permitem aferir as concentrações que é necessário estabelecer para conseguir controlar as populações infestantes são um passo fundamental na definição detalhada da estratégia de controlo a utilizar.

Nesta proposta de atividade laboratorial apresenta-se o protocolo típico de um ensaio de curta-duração que permite fazer uma avaliação inicial do potencial do químico testado para funcionar como agente de controlo da amêijoia asiática. Aqui propomos a utilização de NaCl (sal de cozinha) como químico modelo e chamamos a atenção para os cuidados necessários se for equacionada a adaptação do protocolo a químicos menos inócuos sob o ponto de vista da manipulação laboratorial. Outros químicos relativamente seguros, de fácil acesso e pouco dispendiosos que possam ser usados em alternativa ao NaCl são a lixívia, o detergente da roupa ou loiça e o ácido acético.

A salinidade é um dos fatores abióticos que limita a dispersão desta espécie. Sabe-se que *C. fluminea* aparece habitualmente em locais de salinidade inferior a dois e que o limite de tolerância superior para este parâmetro se encontra entre 10 e 17 (Karatayev et al., 2005), sendo que, a partir deste limite, o organismo entrará em níveis insustentáveis de *stress* osmótico. Assim, utilizando um gradiente de concentrações entre 0 (água doce) e 35 (água do mar) g L<sup>-1</sup> de NaCl, poderá ser facilmente obtida uma resposta dos organismos-teste a este fator. Ainda que no caso de outros químicos que se pretenda testar não haja informação detalhada acerca da sensibilidade do organismo (e aí provavelmente será necessário efetuar testes preliminares com uma gama alargada de concentrações, para afinar a gama a testar num ensaio definitivo que produzirá a curva dose-resposta típica), é fundamental pesquisar sobre as características do químico, principalmente para assegurar a segurança do grupo de trabalho; esta pesquisa também poderá ser direcionada para a colocação de hipóteses acerca do mecanismo de toxicidade através do qual o químico provoca a morte destes organismos.

O ensaio agudo proposto (Figura 11) deve seguir o seguinte protocolo:

1. Selecionar grupos de 30 indivíduos (10 x 3 réplicas) por cada tratamento experimental que se pretende estabelecer, preferencialmente pertencendo à classe de tamanho [15, 20[ ou [20,25[ mm<sup>18</sup>, aclimatados às condições de incubação do teste durante pelo menos 1 semana<sup>19</sup>. Para um ensaio típico, onde sejam testadas 5 concentrações de químico e um controlo, será necessário reunir 180 organismos.
2. Um Controlo (0 g L<sup>-1</sup> NaCl) e várias concentrações-teste devem ser estabelecidos, se possível, de acordo com uma progressão geométrica. As várias concentrações deverão ser preparadas separadamente<sup>20</sup> usando como base água desclorinada<sup>21</sup> e através da dissolução de sal de cozinha comercial, em balões volumétricos de 2 L (solução-mãe).



FIGURA 11: Imagem de parte de um ensaio agudo com *C. fluminea* em execução.

<sup>18</sup> Tamanhos maiores facilitam a verificação da mortalidade, particularmente quando o experimentador ainda não tem experiência.

<sup>19</sup> Durante o período de aclimação às condições em que o ensaio será realizado (idealmente cerca de 20°C e fotoperíodo de 16 h<sup>L</sup>:8 h<sup>E</sup>, ambos constantes) devem alimentar-se os organismos com suspensões de microalgas verdes (consultar alternativas para a alimentação em Rosa et al. 2011b); a ração não deve ser limitada.

<sup>20</sup> Alternativamente, e nos casos em que a solubilidade do químico em água o permita, pode ser feita uma solução-stock muito concentrada, de onde são retirados pequenos volumes (neste caso sempre menores que 5 ml – 1% do volume de teste) para adicionar a cada réplica, de forma a estabelecer a concentração planeada.

3. Distribuir, por cada frasco de teste, 500 ml de solução-mãe (3 frascos/3 réplicas por cada solução). Os frascos de teste poderão ser em vidro, desde que a área da base possibilite a distribuição das 10 amêijoas sem necessidade de sobreposição. Uma alternativa é a utilização de garrafões de água de plástico de 5 L cortados a uma altura de cerca de 10 cm.
4. Estabelecer um sistema de arejamento em todos os recipientes de teste – este sistema deve manter-se em permanência até ao final do teste. A amêijoas asiática é muito sensível a variações na oxigenação, o que pode interferir com os resultados dos testes. Material simples de aquarofilia (bombas de ar, tubo de aquário, derivações em plástico e pedras difusoras) permite montar um sistema deste tipo.
5. Adicionar 10 amêijoas vivas a cada frasco de teste.
6. O parâmetro toxicológico em estudo é a mortalidade. Assim, o número de amêijoas mortas (*vide* Figura 6 e texto associado para o procedimento de verificação de mortalidade) em cada réplica do ensaio deverá ser contabilizado a cada 24 h, até ao final do ensaio (72 h ou 96 h após a dosagem). Os indivíduos encontrados mortos não devem ser devolvidos aos frascos de teste para minimizar a degradação do meio. Pelo menos no início e no final do teste devem ser medidos parâmetros básicos de qualidade da água, em pelo menos 1 réplica de cada tratamento experimental. A tabela 2 pode ser usada como modelo para o registo de todos estes dados no decurso do ensaio.
7. O efeito negativo do químico deverá ser analisado com base nas mortalidades obtidas ao fim de 72 h ou 96 h de exposição (poderá ser escolhido o tempo de exposição que permite melhor descrever uma curva dose-resposta completa<sup>22</sup>) - *vide* figura 7 e texto associado para detalhes adicionais sobre a análise deste tipo de dados.

TABELA 2: Modelo para uma tabela de registo adequada a um teste agudo com *C. fluminea*.

Tratamentos	Nº de mortos				Parâmetros de qualidade da água					
	24 h	48 h	72 h	96h	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	O <sub>2i</sub>	O <sub>2f</sub>	T <sub>i</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)
0 g L <sup>-1</sup>	R1									
	R2									
	R3									
~1 g L <sup>-1</sup>	R1									
	R2									
	R3									
...	...									
35 g L <sup>-1</sup>	R1									
	R2									
	R3									

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar da introdução *C. fluminea* em Portugal datar de 1980, muitos desconhecem esta espécie e a necessidade da monitorização das fontes de água primárias para a minimização da sua dispersão e dos seus impactos. No contexto das implicações económicas que esta peste pode representar, os programas de

<sup>21</sup> Água desclorinada no controlo e água desclorinada com a quantidade de sal necessária para perfazer a concentração em causa.

<sup>22</sup> Por vezes, dependendo do modo de ação do químico testado e das concentrações selecionadas, 96h de exposição resultam numa mortalidade elevada a concentrações muito baixas, o que inviabiliza a observação de uma curva dose-resposta. Nestes casos, os registos feitos às 72 h poderão ser uma boa alternativa.

monitorização fornecem dados essenciais para que cada setor possa estimar o risco de infestações nas instalações suscetíveis, além de gerarem informação muito relevante para a definição e ajuste de estratégias de controlo eficientes (e que deverão ser cada vez mais ambientalmente seguras). A consciencialização da população em geral relativamente aos problemas causados pela amêijoia asiática é fundamental como base para que se possa cada vez mais promover o envolvimento da sociedade na gestão da peste. Neste contexto, o presente artigo centra-se na divulgação do problema das infestações de amêijoia asiática na indústria, veiculando conhecimento atual sobre as estratégias de monitorização e controlo que foram e têm vindo a ser desenvolvidas para fazer face a esse mesmo problema. Num seguimento lógico deste texto será futuramente abordado o papel fundamental da sociedade na gestão da invasão dos sistemas aquáticos portugueses por *C. fluminea*.

---

**agradecimentos** • Joana L. Pereira agradece o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através de uma bolsa de pós-doutoramento (SFRH/BPD/44733/2008). Os autores agradecem a colaboração de João Gomes na síntese inicial de alguns dados que se revelaram relevantes para a construção deste texto, bem como de Inês Correia Rosa, que forneceu alguns dados para a construção de figuras que constam deste artigo. Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) no âmbito do projecto CONTROLCLAM (PTDC/AAC-AMB/113515/2009).

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldridge DC, Elliot P, Moggridge GD (2006). Microencapsulated BioBullets for the control of biofouling zebra mussels. *Environmental Science & Technology*, 40(3), 975-979.
- Beran L (2006). Spreading expansion of *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) in the Czech Republic. *Heldia* 6: 187-192.
- Bidwell J, Farris J, Cherry D. (1995). Comparative response of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the Asian clam, *Corbicula fluminea*, to DGH/QUAT, a nonoxidizing molluscicide. *Aquatic Toxicology* 33: 183-200.
- Britton JC, Morton B (1982). Guide to *Corbicula fluminea*. In: JB Burch, J White-Rudolph (eds.), Malacological Review, Colorado, USA.
- Castro BB, Consciência S, Gonçalves F (2009), Comunicação química em sistemas predador-presa alterados: um contributo para a controvérsia. *CAPTAR* 1(1): 54-66.
- Claudi R, Makie GL (1994). Pratical Manual for Zebra Mussel Monitoring and Control. Boca Raton: Lewis Publishers, 227p.
- Chainho P, Costa JL, Chaves ML, Lane MF, Dauer DM, Costa MJ (2006). Seasonal and spatial patterns of distribution of subtidal benthic invertebrate communities in the Mondego River, Portugal - a poikilohaline estuary. *Hydrobiologia* 555: 59-74.
- Costa R, Elliott P, Aldridge D, Moggridge G (2011). Enhanced mortality of the biofouling zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, through the application of combined control agents. *Journal of Great Lakes Research* 37: 272-278.
- DAISIE - European Invasive Alien Species Gateway, 2008. *Corbiculafluminea* [citado 30 Setembro 2013]. Disponível em: <http://www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=53281>
- Davis MA (2009). *Invasion Biology*. Oxford: Oxford University Press, 288p.
- Eng L (1979). Population dynamics of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller), in the concrete lined Delta-Mendota Canal of Central California. *First International Corbicula Symposium*: 36-68.
- Fisher SW, Stromberg P, Bruner KA, Boulet LD (1991). Molluscicidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: toxicity and mode of action. *Aquatic Toxicology* 20:219-234.
- Francis RA (2012). *A Handbook of Global Freshwater Invasive Species*. Routledge, 484 p.
- French JRP (1993). How Well Can Fishes Prey on Zebra Mussels in Eastern North America. *Fisheries* 18:13-19.
- Finnoff D, Shogren JF, Leung B, Lodge D (2007). Take a risk: preferring prevention over control of biological invaders. *Ecological Economics* 62: 216-222.

- Garcia M, Montalto L (2006). Los peces depredadores de *Limnoperna fortunei* en los ambientes colonizados. In: G. Darrigran e C. Damboronea (eds). Bio-invasión des mejillón dorado en el continete americano. La Palta: Univ. Nacional de La Plata, pp. 113-129.
- Ishak MM, Sharaf AA, Mohamed AM, Mousa AH (1970). Studies on the mode of action of some moluscides on the snail *Biomphalaria alexandrina*. Effect of Baylluscide, sodium pentachlorophenate, and copper sulfate on succinate, glutamate and reduced TMPD oxidation. *Comparative and General Pharmacology* 1: 201-208.
- Isom BG (1986). Historical review of Asiatic clam (*Corbicula*) invasion and biofouling of waters and industries in the Americas. In: JC Britton (ed.), Proceedings of the Second International *Corbicula* Symposium, American Malacological Bulletin - Special edition nr.2.
- Johnson KI, Henager CH, Page TL, Hayes PF (1986). Engineering factors influencing *Corbicula* fouling in nuclear service water systems. *American Malacological Bulletin special edition nr.2*: 47-52.
- Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK (2005). Contrasting distribution and impacts of two freshwater exotic suspension feeders, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems* 47: 239-262.
- Mackie GL, Claudi R (2010). Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems (Second Edition ed.). United Sates of America: CRC Press, 508p.
- Mansur MCD, Santos CP, Pereira D, Paz ICP, Zurita MLL, Rodriguez MTR, Nehrke MV, Bergonci PEA (2012). Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: biologia, prevenção, controlo. Porto Alegre: Redes Editora, 414p.
- Marques CR, Pereira R, Antunes SC, Cachada A, Duarte AC, Gonçalves F (2009). Estudo *in situ* do efeito de herbicidas numa microalga. *CAPTAR* 1(1): 113-126.
- McMahon RF (1977). Shell Size-Frequency Distributions of *Corbicula manilensis* Philippi from a Clam-Fouled Steam Condenser. *The Nautilus* 91: 54-59.
- Minchin D, Lucy F, Sullivan M (2002). Zebra mussel: impacts and spread. In: Leppäkoski, E., Gollasch, S., Olenin, S. (Eds.), Invasive Aquatic Species of Europe: Distribution, Impacts and Management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 135-148.
- Morais P, Teodósio J, Reis J, Chícharo MA, Chícharo L (2009). The Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the Guadiana River Basin (southwestern Iberian Peninsula): setting the record straight. *Aquatic Invasions* 4: 681-684.
- Morris RD, Audet AM, Angelillo IF, Chalmers TC, and Mosteller F (1992). Chlorination, chlorination by-products, and cancer: a meta-analysis. *American Journal of Public Health* July 1992: Vol. 82, No. 7, pp. 955-963.
- Mouthon J (1981). Sur la présence en France et au portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria* 45:109-116.
- Nagel KO (1989). Ein weiterer Fundort von *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774) (Mollusca, Bivalvia) in Portugal. *Mitteilungen der deutschen malakozoologischen Gesellschaft* 17: 44-45.
- Neitzel D, Johnson K, Page T, Young J, Dalling P (1984). Bivalve fouling of nuclear power plant service-water systems. Volume 1. Correlation of bivalve biological characteristics and raw- water system design. Pacific Northwest Lab., Richland, WA (USA)
- Page TL, Neitzel DA, Simmons MA (1986). Biofouling of power plant service systems by *Corbicula*. In: JC Britton (ed.), Proceedings of the Second International *Corbicula* Symposium, American Malacological Bulletin - Special edition no.2.
- Pereira JL, Gonçalves F (2009). A expressão genética como ferramenta de avaliação de impactos da poluição por pesticidas em sistemas aquáticos. *CAPTAR* 1:1: 40-53.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52:3: 273-288.
- Post RM, Lacy JR, Lyons LA, Mueller M, Petrille JC, Shurtz WF (1996). A decade of macrofouling control using non-oxidizing compounds – an industry review. EPRI Condenser Conference, Boston.
- Potter JM, Liden LH (1986). *Corbicula* control at the Potomac River Steam Electric Station Alexandria, Virginia. In: JC Britton (ed.), Proceedings of the Second International *Corbicula* Symposium, American Malacological Bulletin - Special edition no.2.
- Reis J (2006). Atlas dos bivalves de água doce de Portugal continental. Lisboa, 130 pp.
- Rosa IC, Pereira JL, Gomes J, Saraiva P, Gonçalves F, Costa R (2011a). The Asian clam *Corbicula fluminea* in the European freshwater-dependent industry: A latent threat or a friendly enemy? *Ecological Economics* 70: 1805-1813.
- Rosa IC, Costa R, Gonçalves F, Pereira JL (2011b). *Corbicula fluminea*: Utilização de uma espécie invasora como organismo experimental. *CAPTAR* 3(1): 40-59
- Smithson JA (1986). Development of a *Corbicula* control treatment at the Baldwin Power Station. In: JC Britton (ed.), Proceedings of the Second International *Corbicula* Symposium, *American Malacological Bulletin* - Special edition no.2.

- Sousa R, Dias S, Antunes C (2006). Spatial subtidal macrobenthic distribution on relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia* 559: 135-148.
- Sousa R, Antunes C, Guilhermino L (2008a). Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 44: 85-94.
- Sousa R (2008b) Factors contributing to the invasive success of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). Tese de Doutorado. Universidade do Porto, Porto.
- Sousa R, Novais A, Costa R, Strayer D (*in press*) - Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia*.
- Strayer DL (1999). Effects of alien species on freshwater mollusks in North America. *Journal of the North American Benthological Society* 18: 74-98.
- Vitousek PM, Dantonio CM, Loope LL, Westbrooks R (1996). Biological invasions as global environmental change. *American Scientist* 84(5): 468–478.

## **ANEXO I**

### **INQUÉRITO-GUIÃO DE VISITA PARA CARACTERIZAÇÃO DE INFESTAÇÕES DE *C. fluminea*.**

#### **1. Aspetos técnicos dos sistemas de água**

1.1. Que sub-sistemas de água possui (i.e. sistema de refrigeração, sistema de incêndio, ...)?

1.2. Ponto de captação:

- De onde é feita a captação?
- Qual a profundidade na coluna de água?
- Existe algum tipo de pré-tratamento na zona de captação?

1.3. Quais os principais componentes dos sistemas de água e qual o seu diâmetro, temperatura e condições hidrodinâmicas aproximadas (tipos de condutas, equipamentos principais, incluindo válvulas e bombas de grande dimensão,...)

1.4. É possível descrever-nos o fluxo geral da água?

#### **2. Biofouling**

2.1. Que tipo de procedimentos de controlo efectuam (filtros, pontos de dosagem química, biocidas, etc)? [Apenas aplicável se se utilizarem estruturas/procedimentos de controlo]

- Em que pontos aplicam os procedimentos de controlo?
- Porquê a escolha destes métodos de controlo?
- São eficientes face ao alvo?
- No caso de utilizarem químicos, qual é o químico, as concentrações e o regime de dosagem?

#### **3. *Corbicula fluminea***

3.1. Aspectos pré-infestação:

- Sabiam da existência da espécie enquanto praga antes de terem tido problemas?
- Tinham conhecimento da existência da espécie no curso de água de onde fazem a captação? Como?
- Tinham em curso algum plano de monitorização da peste (dentro e fora da instalação)? Porquê?

3.2. Episódios de infestação:

- Quando e como é que a espécie foi detectada pela primeira vez na instalação?
- Com que densidade estava presente?
- Quais as estruturas afectadas pela presença da amêijoa? Que tipo de problemas causaram/causam?
- Qual a estimativa do custo dos danos causados pela peste antes de ser controlada (ex.: substituição de equipamento, peças que tenham sido inutilizadas ou que tiveram que ser reparadas, redução de caudais/eficiências térmicas, paragem para limpeza, custo da descarga e tratamento da biomassa retirada do sistema)?
- Mantiveram algum programa de monitorização e controlo, para evitar possíveis infestações?
- Qual a estimativa do custo envolvido na gestão da peste - planos de monitorização e métodos de controlo
- A estratégia de controlo implementada resultou? Com que eficiência?