

Uma amêijoia (asiática) de sucesso: atividades experimentais com *Corbicula fluminea*

A amêijoia *Corbicula fluminea*, vulgarmente conhecida como amêijoia asiática, é um bivalve invasor de água doce. À semelhança de outros bivalves, a amêijoia asiática apresenta uma elevada taxa de filtração, o que constitui uma característica interessante e que pode ser facilmente avaliada em contexto de ensino. Neste artigo são propostas duas atividades experimentais que se baseiam nesta característica. A primeira atividade proposta relaciona a taxa de filtração das amêijoas com as características da água, nomeadamente a salinidade, com os objetivos de avaliar o efeito da salinidade na taxa de filtração das amêijoas, bem como exemplificar como este parâmetro pode condicionar a expansão e distribuição geográfica da espécie. A segunda atividade aborda o potencial de aplicação desta espécie em soluções de biorremediação, permitindo assim obter uma vantagem da sua elevada taxa de filtração. O objetivo desta segunda atividade é exemplificar a aplicação do bivalve em biorremediação de águas eutrofizadas/poluídas. As atividades laboratoriais foram idealizadas para serem realizadas no âmbito das aulas das disciplinas de Biologia e Geologia (10º ano ou 11º ano) e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Não obstante, podem ser adaptadas a outros ciclos de ensino, por exemplo para apoiar tópicos programáticos em que a regulação trófica dos ecossistemas aquáticos é abordada. A sua realização permite articular diferentes disciplinas (nomeadamente Biologia, Química e Matemática), familiarizando os alunos com diferentes conceitos, procedimentos e equipamentos laboratoriais.

Palavras-chave

taxa de filtração
ensaios laboratoriais
salinidade
biorremediação
ecotoxicologia

Gonçalo Abreu^{1x}

Érica Pascoal^{1x}

Leandro Monteiro¹

Diogo Mantas¹

Joana Luísa Pereira^{1,2}

Fátima Jesus^{1,2*}

^x Ambos os autores contribuíram igualmente para o estudo

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal.

² Centro de Estudos do Ambiente e do Mar - CESAM, Universidade de Aveiro, Portugal.

* fatima.jesus@ua.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2024 Autores

INTRODUÇÃO

Corbicula fluminea (Müller, 1774) é um bivalve de água doce, da família Corbiculidae, vulgarmente conhecido por corbícula ou amêijoia asiática. Esta espécie é originária da Ásia, Oceânia e África, tendo sido introduzida na Europa e na América, onde se tornou invasora. Esta, tal como outras espécies invasoras, são um problema ecológico que se enfrenta atualmente, sendo frequentemente um agente desestabilizador do ecossistema em que se encontram. A amêijoia apresenta uma excelente capacidade de propagação, tendo invadido bacias hidrográficas europeias e americanas. Em Portugal, foi primeiro encontrada na bacia do rio Tejo no início da década de 1980 (Mouthon, 1981), estando atualmente presente em todas as regiões hidrográficas nacionais com exceção da região dos rios Cávado, Ave, Leça (Rosa et al., 2011) e Lis (Sampaio, 2012). Esta ampla distribuição torna-a uma espécie de fácil acesso, possibilitando, assim, a sua utilização em estudos e ensaios laboratoriais. No Anexo I apresenta-se informação sobre a técnica de recolha das amêijoas e sobre a sua manutenção em laboratório.

A amêijoia asiática, à semelhança de outros bivalves, apresenta uma elevada taxa de filtração, que se traduz na remoção de uma quantidade considerável de algas (o seu alimento principal) da água num curto período de tempo. Quando estão a filtrar, as valvas das amêijoas estão parcialmente abertas e os sífões são visíveis. No entanto, quando expostas a condições adversas, como é o caso da alta salinidade, as amêijoas fecham as valvas evitando, desta forma, a exposição e, conseqüentemente, efeitos deletérios provocados por essa condição. Esta característica comportamental pode então ser usada para inferir a partir de que gama de salinidade é que se torna improvável que a corbícula se instale, permitindo assim definir zonas de elevada suscetibilidade à invasão. O efeito da salinidade na atividade de filtração das amêijoas é o tema da primeira atividade laboratorial proposta neste artigo.

A elevada taxa de filtração das amêijoas constitui uma característica que pode ser útil quando se pretende remover partículas suspensas ou compostos químicos da água. De facto, organismos desta espécie foram já utilizados com sucesso em várias aplicações de tratamento de águas e biorremediação, entre as quais se destacam as seguintes: remoção de metais de efluentes ácidos de minas (Rosa et al., 2014); tratamento de efluentes de lagares de azeite por remoção de alguns compostos (fenóis, amidas, compostos alifáticos) (Domingues et al., 2020); remoção de matéria orgânica (carência química de oxigénio) e redução da toxicidade de efluentes de suinicultura (Domingues et al., 2021; Gomes et al., 2021) e de vinificação (Ferreira et al., 2018; Pipolo et al., 2017); remoção de compostos emergentes da água (Ismail et al., 2014); remoção de bactérias *Escherichia coli* da água (Gomes et al., 2018) ou de rios impactados por atividades agrícolas, utilizados conjuntamente com outros bivalves (Ismail et al., 2016); no controlo de um bloom de cianobactérias, usada individualmente (Silva et al., 2020), ou em simultâneo com peixes (carpa *Aristichthys nobilis*) (Shen et al., 2020); e na redução do estado de eutrofização de sistemas aquáticos em conjunto com outras espécies aquáticas (Li et al., 2010; Song et al., 2014). Na segunda atividade proposta neste artigo pretende-se avaliar o potencial de biorremediação desta espécie.

Este artigo pretende assim apresentar duas atividades laboratoriais de realização simples utilizando como espécie modelo a amêijoia asiática, que possam ser realizadas em contexto de ensino, particularmente (mas não necessariamente em exclusivo) direcionadas para alunos do Secundário. São abordados conceitos do domínio das disciplinas de Biologia, Química e Matemática, pelo que representam uma excelente oportunidade para que os alunos compreendam como estas disciplinas estão interligadas. Além disso,

representam uma oportunidade para que os alunos se familiarizem com diferentes conceitos, procedimentos e equipamentos laboratoriais, já que implicam o manuseamento de espécimes e de diverso equipamento laboratorial, preparação de reagentes e a recolha, tratamento e análise de dados obtidos que, para além de contribuírem para o aumento da literacia científica dos alunos, irá familiarizá-los com a realização de ensaios laboratoriais e os processos experimentais neles envolvidos. As atividades propostas permitem também discutir aspetos essenciais em experimentação laboratorial, como é o caso da necessidade de incluir controlos e replicação nas atividades experimentais, bem como compreensão dos conceitos de variável independente e dependente numa experiência.

Importa salientar que, tratando-se de atividades com uma espécie invasora, recomenda-se cuidado no descarte dos organismos utilizados e da água em que estes foram mantidos. Para evitar a dispersão da espécie é recomendado que os organismos e a água sejam congelados antes de serem descartados.



ATIVIDADE 1: EFEITO DE FATORES ABIÓTICOS NA DISTRIBUIÇÃO DA AMÊIJOA ASIÁTICA

A espécie invasora *C. fluminea* encontra-se distribuída por grande parte de Portugal, incluindo a bacia de drenagem da Ria de Aveiro. Apesar de ser encontrada em alguns estuários, tolerando níveis relativamente elevados de salinidade, no caso da Ria, curiosamente, a dispersão da amêijoas asiática tem sido travada por este fator. A salinidade representa, assim, um fator abiótico crítico para definir zonas de suscetibilidade à invasão porque os canais são interconectados e a variação nas restantes condições ambientais (e.g., temperatura, velocidade da corrente, concentração de oxigénio dissolvido e de cálcio, alimento disponível, etc.) está dentro das gamas de tolerância da espécie, não condicionando, portanto, o seu desenvolvimento.

Sabendo que as amêijoas se alimentam por filtração de microalgas verdes em suspensão, e que têm taxas de filtração muito elevadas, nesta atividade propõe-se avaliar a filtração das amêijoas por quantificação da densidade de microalgas, usando um método espectrofotométrico. A exposição dos organismos a uma elevada concentração de sal conduzirá ao fecho das valvas, uma resposta de evitamento à exposição a este composto, cessando a filtração, o que se irá traduzir numa reduzida diminuição da tonalidade verde da água. Por outro lado, os organismos expostos a uma baixa concentração de sal apresentarão uma maior taxa de filtração, o que se refletirá numa diminuição mais pronunciada da tonalidade verde da água.

Nesta atividade experimental pretende-se explorar dois aspetos fundamentais. Por um lado, propõe-se avaliar o efeito que a salinidade exerce sobre a taxa de filtração das amêijoas e a resposta comportamental de defesa face ao aumento da salinidade, o que permite exemplificar como este parâmetro pode condicionar a expansão e distribuição geográfica da espécie. Por outro lado, pretende-se demonstrar a elevada taxa de filtração das amêijoas, um fator que contribui para o sucesso invasor desta espécie. Em adição, é também possível a realização de atividades extra, relacionadas com as microalgas e com as amêijoas (Anexo II). Os participantes terão oportunidade de conduzir um ensaio laboratorial completo (montagem do ensaio, registo de observações e análise de resultados). Esta atividade tem uma duração aproximada de duas horas, excluindo o tempo necessário para a captura das amêijoas em campo.

Material necessário

i) Preparação das soluções de NaCl

- cloreto de sódio (NaCl)
- 1 balança e material de pesagem (espátulas, barquinhas)
- 2-3 balões volumétricos de 1 L
- 3 L de água desclorinada (pode ser água da torneira retirada 1 dia antes ¹)

ii) Montagem da experiência

- 3 provetas de 250 mL (ou de 500 mL)
- 9 frascos de vidro (ou plástico transparente) com capacidade mínima de 250 mL
- bomba de arejamento
- 9 torneiras de arejamento para aquário
- tubo de arejamento para aquários
- 9 pontas de micropipeta (idealmente de micropipetas de 1 mL ²)
- micropipeta de 5 mL e respetivas pontas ³
- 1 frasco de suspensão de microalgas verdes ⁴

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

- 1 balde com amêijoas ⁵
- 2 L de água desclorinada
- 2 craveiras (mínimo 1)
- 2-3 agulhas de dissecação espatuladas (mínimo 1)
- 1 tabuleiro
- 4-5 frascos de vidro ou plástico

iv) Avaliação e registo de dados

- cuvetes descartáveis (mínimo 18)
- suporte para cuvetes
- espectrofotómetro ⁶
- micropipeta de 1000 µL ou pipeta de Pasteur

Procedimento experimental

i) Preparação das soluções de teste

1. Preparar as soluções de teste em água desclorinada: 1 L de solução com 0 g NaCl/L (controlo ⁷), 1 L de solução com 4 g NaCl/L, e 1 L de solução com 20 g NaCl/L ⁸.

¹ Para obter água desclorinada, basta retirar água da torneira com 24 h de antecedência, deixando-a num balde destapado e se possível com arejamento, permitindo que o cloro se liberte sob a forma gasosa.

² O objetivo é permitir a formação de bolhas de ar de pequena dimensão (que são mais efetivas na capacidade de arejar o meio, e a sua regulação é mais fácil). Podem utilizar-se alternativas às pontas de micropipeta, como por exemplo, palhinhas perfuradas e tapadas na ponta.

³ Em alternativa, podem usar-se pipetas de Pasteur ou outro material que permita medir 2 mL.

⁴ Pode ter sido congelado anteriormente e ser cedido por laboratórios que trabalhem com microalgas ou aquaculturas. Pode ser substituído por espinafre cozido moído.

⁵ A recolha das amêijoas deverá ser realizada antecipadamente (para o efeito, consultar informações no Anexo I).

⁶ No caso de não ter um espectrofotómetro disponível para avaliação da densidade celular, poderá ser utilizada uma câmara de Neubauer, procedimento este que requer acesso a um microscópio com ampliação mínima de 100x (consultar Anexo III). Em alternativa, a avaliação da densidade celular poderá ser feita qualitativamente, com base na densidade do tom esverdeado da suspensão.

⁷ O controlo é uma condição experimental essencial em experimentação. O controlo é em tudo semelhante aos tratamentos que se pretendem avaliar, com a particularidade de não conter o agente cujo efeito se pretende avaliar. Neste caso, o controlo não contém sal – comparando os tratamentos com diferentes concentrações de sal com o tratamento sem sal (controlo) pode-se avaliar o efeito do sal, *i.e.*, o tratamento controlo vai permitir calibrar as observações nos tratamentos com sal.

⁸ Se pretendido, pode incluir-se mais uma concentração de NaCl. Nesse caso, sugere-se uma concentração intermédia, por exemplo, 10 g NaCl/L.

ii) Montagem da experiência

2. Colocar 250 mL de solução em cada um de três frascos de vidro previamente identificados. Cada um destes frascos, pertencentes ao mesmo tratamento, corresponde a uma réplica⁹. Sugere-se 3 réplicas para cada tratamento.

3. Montar o sistema de arejamento, colocando pontas de pipeta nas extremidades dos tubos de arejamento para ajudar a regular o fluxo de ar. Ligar o sistema de arejamento à bomba de arejamento e afinar o fluxo de forma semelhante em todas as réplicas¹⁰ (Figura 1).



FIGURA 1. Aspecto geral de um teste com amêijoas, ilustrando os frascos com meio e amêijoas sob arejamento.

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

4. Transferir amêijoas do balde de cultura para o tabuleiro contendo água desclorinada.

5. Usando uma craveira, medir o comprimento das amêijoas, isto é, segundo a sua maior dimensão (Figura 2). Confirmar a sua viabilidade, usando uma agulha de dissecação espatulada, conforme descrito por Gabriel et al. (2013). Sucintamente, a ponta da agulha deve ser inserida entre as valvas; em seguida avalia-se a resistência que a amêijoas oferece à rotação da agulha - se a amêijoas estiver viva, a abertura das valvas vai ser dificultada. Não forçar a abertura das valvas para não lesionar a amêijoas. Retirar a ponta da agulha e, se a amêijoas estiver viva, colocá-la num frasco previamente identificado com essa gama de tamanhos (ex:]20-21] mm,]21-22] mm, etc.), contendo água desclorinada.



FIGURA 2. Ilustração da medição do comprimento da amêijoas com recurso a uma craveira. Neste caso concreto, a amêijoas mede 21 mm de comprimento.

6. Selecionar as amêijoas para o teste (40 amêijoas com tamanho idêntico, idealmente entre os 20 e os 25 mm).

iv) Atividade experimental

7. Colocar duas amêijoas em cada frasco de teste, e aguardar pelo menos 30 min¹¹ até prosseguir a experiência. Este tempo é necessário para aclimação das amêijoas às novas condições, especialmente tendo em consideração o manuseamento a que foram sujeitas. A distribuição de tamanhos das amêijoas deverá ser igual em todas as réplicas (*i.e.*, se por exemplo, num frasco colocar uma amêijoas com 23 mm e outra com 24 mm, então todos os restantes frascos devem conter um conjunto de amêijoas igual)¹².

⁹ A utilização de réplicas é essencial em experimentação. As réplicas estão sujeitas às mesmas fontes de variabilidade, permitindo confirmar que os resultados não se devem ao acaso (neste caso em particular, que não são fruto da utilização de organismos que não representem o padrão mais comum).

¹⁰ Uma vez que estas amêijoas são muito sensíveis a baixas concentrações de oxigénio, é conveniente manter todos os frascos sob arejamento contínuo. Além de manter os níveis de oxigénio dissolvido elevados, o arejamento contínuo permite ainda evitar a sedimentação das algas no fundo do frasco (as algas são mais densas que a água e tendem a sedimentar), o que poderia afetar os parâmetros de filtração e condicionar os resultados.

¹¹ Se houver necessidade, este período de aclimação pode estender-se por várias horas, até 24 h.

¹² As amêijoas têm que ter aproximadamente o mesmo tamanho nas várias réplicas para que a taxa de filtração, que aumenta com o tamanho do organismo (Castro et al., 2018), não seja um fator de confusão, distorcendo os resultados.

8. Após 30 min, colocar as algas (2 mL em cada réplica). Imediatamente, retirar 1 amostra de cada réplica para leitura espectralométrica, certificando-se que a amostra se encontra homogênea (em termos de distribuição de algas). Anotar a hora de início (T0).

9. Ler a absorvância de cada amostra a 440 nm ¹³ no espectrofotômetro. Esta leitura vai permitir determinar a densidade celular no tempo T0. Ao longo do período de duração da experiência, deve-se observar e registrar o comportamento das amêijoas, nomeadamente em termos de fecho ou abertura das valvas ¹⁴.

10. Decorridos 30 min após a adição das algas, retirar uma amostra de cada frasco, certificando-se que a amostra se encontra homogênea (em termos de distribuição de algas). Se possível, seguir a mesma ordem pela qual as algas foram adicionadas.

11. Quantificar a absorvância de cada amostra a 440 nm no espectrofotômetro. Esta leitura vai ser usada para determinar a densidade celular no tempo final (T30).

Nota: no caso de optar por realizar a contagem de microalgas na câmara de Neubauer, deve proceder do seguinte modo para cada amostra recolhida. Carregar a câmara, utilizando para isso uma micropipeta ou uma pipeta de Pasteur e em seguida proceder à contagem no microscópio ótico com ampliação mínima de 100x (recomenda-se a contagem com a objetiva de 10x ou de 40x). Consulte o “Anexo III: Contagem de microalgas na câmara de Neubauer” para mais detalhes sobre o procedimento.

Análise de resultados

12. Para cada réplica, converter a absorvância (densidade ótica) registada nos tempos T0 e T30 em densidade celular, expressa em n.º células/mL (se procedeu à contagem de microalgas com a câmara de Neubauer, pode ignorar este passo, dado que já obteve o valor da densidade celular). Para o efeito, poderá usar a reta de calibração seguinte ¹⁵:

$N^{\circ} \text{ células/mL} = 6931 + 23179166 \times Abs - 9972459 \times Abs^2$, em que Abs representa a absorvância medida a 440 nm.

Para determinar a biomassa de microalgas em cada réplica é necessário multiplicar pelo volume de meio em cada frasco (V, mL). Assim:

$$Biomassa = V \times 'N^{\circ} \text{ células/mL}'$$

13. Determinar, para cada réplica, a biomassa removida, usando a equação seguinte:

$Biomassa \text{ removida} = Biomassa \text{ T0} - Biomassa \text{ T30}$, em que Biomassa T0 e Biomassa T30 representam, respetivamente, a biomassa de células no tempo T0 e no tempo T30. Este valor pode ser convertido em %, para mais fácil compreensão, usando, para o efeito, a fórmula seguinte:

¹³ Este comprimento de onda (λ) corresponde ao λ do principal pico de absorção da clorofila a, o pigmento predominante nas microalgas verdes, pelo que a leitura de absorvância neste λ permite inferir acerca da abundância de microalgas na amostra.

¹⁴ Espera-se que as amêijoas do controlo ou expostas à concentração de NaCl mais baixa se encontrem a filtrar (valvas abertas), ao passo que as amêijoas expostas à concentração de NaCl mais alta se encontrem com as valvas fechadas. O comportamento de fecho das valvas representa um mecanismo de defesa face à presença de compostos nocivos no meio, e que contribui em parte para explicar o sucesso na dispersão desta espécie e, conseqüentemente, o seu elevado potencial invasor.

¹⁵ Idealmente, a reta de calibração deveria ser desenvolvida para cada espectrofotômetro, mas esta reta (desenvolvida para um espectrofotômetro JENWAY) pode ser usada como uma reta genérica no âmbito desta atividade.

$$\text{Biomassa removida (\%)} = \frac{\text{Biomassa removida}}{\text{Biomassa T0}} \times 100$$

14. Para cada tratamento, determinar a média dos valores obtidos para cada réplica, e (opcionalmente) determinar o respetivo erro padrão (para avaliação da variabilidade dos dados).

15. Para facilitar a visualização dos resultados, pode-se representar graficamente os valores da Biomassa removida (%) para cada tratamento.

Espera-se que as amêijoas do controlo (não expostas a sal) apresentem os valores mais elevados de biomassa removida, o que se deve ao facto de se encontrarem nas condições de salinidade ideais, o que se deverá refletir numa elevada taxa de filtração e, conseqüentemente, maior remoção de microalgas em suspensão, o que se traduz numa elevada percentagem de biomassa removida.

As amêijoas expostas a 4 g NaCl/L deverão apresentar um valor semelhante ou um pouco inferior ao observado para o controlo já que a salinidade no meio não é suficientemente elevada ao ponto de inibir a taxa de filtração das amêijoas. Sendo assim, as amêijoas deverão filtrar a uma taxa similar à do controlo, e como consequência, as taxas de remoção de biomassa não serão díspares.

As amêijoas expostas a 20 g NaCl/L deverão apresentar uma baixa percentagem de biomassa removida, inferior à do controlo e do tratamento 4 g NaCl/L. Esta concentração de sal é próxima do limite máximo de tolerância da espécie, que é cerca de 20 psu¹⁶ no Inverno (temperaturas próximas de 11 °C), e < 15 psu no Verão (temperaturas próximas de 20 °C), de acordo com Ferreira-Rodríguez & Pardo (2016). Como as amêijoas não toleram esta salinidade, fecham as valvas (comportamento este que deverá ser visível durante o período de exposição), o que se reflete na ausência (ou muito baixa) filtração e, conseqüentemente, numa baixa percentagem de biomassa removida.

Em alternativa, é possível retirar estas mesmas conclusões, através de uma análise mais simples, com base apenas na comparação da absorvância (obtida por leitura espectrofotométrica) ou da densidade celular (obtida por contagem de células na câmara de Neubauer) nos tempos T0 e T30 para cada uma das concentrações de sal. A diferença entre os valores observados nos tempos T0 e T30 são proporcionais à variação da densidade celular no meio, representando uma medida da biomassa consumida. É esperado que no tratamento com a concentração de 20 g NaCl/L, a diferença (T0-T30) da absorvância (ou densidade celular) seja menor do que nos restantes tratamentos (baixa percentagem de biomassa removida). Já no tratamento com a concentração de 4 g NaCl/L, a diferença (T0-T30) da absorvância (ou densidade celular) deve ser maior do que a observada para a concentração de 20 g NaCl/L, mas menor (ou semelhante) à observada no controlo (0 g NaCl/L), resultado de uma esperada maior percentagem de biomassa removida comparativamente ao tratamento de 20 g NaCl/L.

A análise dos dados permite inferir acerca das condições de salinidade a partir das quais é improvável que a amêijoa se instale, contribuindo para a definição de zonas de suscetibilidade à invasão.

¹⁶ 1 psu (practical salinity unit) equivale a 1 g de sal por kg de água. Assim, 20 g NaCl/L corresponde a aproximadamente 20 psu.



ATIVIDADE 2: AMÊIJOA ASIÁTICA COMO AGENTE DE BIORREMEDIAÇÃO

Nesta atividade pretende-se avaliar o potencial da amêijoia asiática na melhoria da qualidade da água, quer no caso de águas eutrofizadas, quer no caso de águas contaminadas por compostos potencialmente tóxicos (doravante referimo-nos ocasionalmente a água contaminada de forma indiscriminada, por simplicidade). Dependendo do tipo de cenário em causa, a ação de biorremediação das amêijoas pode ser avaliada de formas distintas: no caso de uma água eutrofizada, a ação das amêijoas pode ser avaliada comparando a densidade de microalgas na água “tratada” pelas amêijoas e na água “não tratada”; no caso de uma água contaminada, a ação das amêijoas pode ser avaliada através da monitorização química do decréscimo de contaminantes na água, ou, em alternativa, comparando a qualidade da água “tratada” e “não tratada” com recurso a organismos indicadores - plantas aquáticas, por exemplo, em que uma melhoria da qualidade da água, reflexo de uma biorremediação eficaz, traduz-se num maior crescimento das plantas ¹⁷.

A utilização como agente de biorremediação deve ser precedida de uma avaliação da toxicidade da água para as amêijoas, já que a biorremediação só poderá ser eficiente se as amêijoas estiverem vivas e a filtrar ativamente. Assim, se a água a remediar for tóxica para as amêijoas, poderá ser necessário utilizar uma água previamente diluída (água eutrofizada ou contaminada diluída em água desclorinada ou em água de um local de referência (não poluído), para diminuir um pouco a sua toxicidade, permitindo que as amêijoas a tolerem).

Os objetivos desta atividade são exemplificar a aplicação de bivalves, em particular, *C. fluminea*, para biorremediação de águas eutrofizadas/contaminadas, bem como demonstrar a aplicação de organismos indicadores (neste caso, microalgas e plantas aquáticas) para avaliação da qualidade da água, uma aplicação dos ensaios que se utilizam em Ecotoxicologia. Em adição, é também possível a realização de atividades adicionais, relacionadas com as microalgas e com as amêijoas (Anexo II). Assim, esta atividade encontra-se organizada em três etapas sequenciais: A) Avaliação prévia da toxicidade da água para as amêijoas; B) Biorremediação (ação das amêijoas); C) Avaliação da qualidade da água após ação das amêijoas, dividida em duas subsecções (água eutrofizada e água contaminada).

A) Avaliação prévia da toxicidade da água

O objetivo desta etapa é avaliar a toxicidade da água contaminada para as amêijoas, de forma a selecionar para a fase seguinte, uma diluição da água que garanta que as amêijoas permaneçam vivas e a filtrar ativamente, pois só nestas condições ocorre biorremediação. Assim, primeiramente, as amêijoas têm de ser expostas a diferentes diluições da amostra de água contaminada. Geralmente, para este efeito utilizam-se as seguintes concentrações: 100 %, 50 %, 25 % e 12,5 % (que correspondem, respetivamente, a uma diluição de 1, 2, 4 e 8 vezes ¹⁸) e um controlo, mas a gama de concentrações pode ser alargada ou ajustada se necessário. Os organismos são expostos durante 48 horas. Após este período, é necessário verificar

¹⁷ Pode recorrer-se a outros métodos de avaliação da toxicidade de uma amostra de água, como por exemplo, testes de imobilização com crustáceos (ver, por exemplo, Coelho et al. (2021) e Loureiro et al. (2013)) ou testes com larvas de inseto (ver, por exemplo, Jesus et al. (2021)).

¹⁸ Fator de diluição = $\frac{\text{concentração inicial}}{\text{concentração final}}$

qual a concentração (ou concentrações) que não causa(m) mortalidade e em que se verifique filtração, selecionando-se a concentração mais alta (tolerada pelas amêijoas) para a fase seguinte do trabalho. Esta fase tem uma duração de 2 dias.

Material necessário

i) Preparação das soluções

- água eutrofizada e/ou contaminada
- 1,5 a 2 L de água desclorinada (pode ser água da torneira retirada 1 dia antes) ou água de um local de referência (não contaminado)
- 5 provetas de 250 mL (ou de 500 mL)

ii) Montagem da experiência

- 15 frascos de vidro (ou plástico transparente) com capacidade mínima de 250 mL
- bomba de arejamento
- 15 torneiras de arejamento para aquário
- tubo de arejamento para aquário
- 15 pontas de micropipeta (idealmente de micropipetas de 1 mL)

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

cf. item correspondente na atividade 1

Procedimento experimental

i) Preparação das soluções de teste

1. Preparar 800 mL de cada solução de teste, por diluição da amostra de água contaminada/eutrofizada, usando água desclorinada/água de um local de referência (não contaminado):

- 100 %: 800 mL de água contaminada/eutrofizada;
- 50 %: 400 mL de água contaminada/eutrofizada e 400 mL de água desclorinada/água de um local de referência (não contaminado);
- 25 %: 200 mL de água contaminada/eutrofizada e 600 mL de água desclorinada/água de um local de referência (não contaminado);
- 12,5 %: 100 mL da água contaminada/eutrofizada e 700 mL de água desclorinada/água de um local de referência (não contaminado);
- Controlo (0%): 800 mL de água desclorinada/água de um local de referência (não contaminado).

Nota: os valores em percentagem (%) indicam a concentração de água contaminada/eutrofizada.

ii) Montagem da experiência

2. Homogeneizar as soluções previamente preparadas e colocar 250 mL de solução em cada frasco de vidro previamente identificados preparando, assim, 3 réplicas para cada um dos tratamentos.

3. Montar o sistema de arejamento, colocando pontas de pipeta nas extremidades dos tubos de arejamento, para ajudar a regular o fluxo de ar. Ligar o sistema de arejamento à bomba de arejamento e afinar o fluxo de forma semelhante em todas as réplicas (Figura 1).

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

4. Selecionar as amêijoas para o teste (cf. item correspondente na Atividade 1), num total de 75 amêijoas com tamanho idêntico, sendo que não é necessário medir o tamanho das amêijoas.

iv) Atividade experimental

5. Colocar cinco amêijoas em cada frasco (proporção de 1 amêijoas para cada 50 mL de solução) e manter a experiência durante 48 h em condições de temperatura e fotoperíodo idênticas para todas as réplicas.

6. Após 48 h, avaliar a mortalidade das amêijoas em cada frasco: as amêijoas que se encontram ativamente a filtrar estão vivas; aquelas que não estão a filtrar ativamente precisam de ser submetidas a uma avaliação de viabilidade, realizada com uma agulha de dissecação espatulada (*cf.* item correspondente na Atividade 1). Registrar o número de amêijoas vivas.

Análise de resultados

7. Para cada tratamento, determinar a taxa de mortalidade, com base na mortalidade (nº de amêijoas mortas) registada em cada uma das três réplicas (réplicas R1, R2 e R3), utilizando a fórmula seguinte:

$$\% \text{ mortalidade} = \frac{\text{média (mortalidade R1; mortalidade R2; mortalidade R3)}}{5} \times 100$$

De entre os tratamentos que não causaram mortalidade e nos quais foram observadas amêijoas a filtrar ativamente, selecionar aquele que corresponde à concentração mais alta, para a fase seguinte da atividade.

B) Biorremediação (ação das amêijoas)

O objetivo desta etapa é expor as amêijoas à água eutrofizada/contaminada para, posteriormente, avaliar a eficiência da biorremediação realizada pelas amêijoas. Assim, será utilizada a água a testar com a diluição escolhida na etapa anterior, a qual será exposta a dois tratamentos distintos: água sujeita a biorremediação – contém água a testar e amêijoas; água não sujeita a biorremediação – contém apenas água a testar. Ambos os tratamentos serão submetidos a arejamento. Desta forma, ambos os tratamentos diferem apenas na presença ou ausência das amêijoas, o que facilita a discussão dos resultados e a obtenção de conclusões na fase seguinte. Esta atividade pode durar entre 2 a 4 dias (excluindo a colheita das amêijoas no campo).

Material necessário

i) Preparação das soluções de teste

- água a testar (água eutrofizada ou contaminada)
- 1,5 a 2 L de água desclorinada (pode ser água da torneira retirada 1 dia antes ¹⁹)
- 5 provetas de 250 mL (ou de 500 mL)

ii) Montagem da experiência

- 6 ou 9 frascos de vidro (ou plástico transparente) com capacidade mínima de 250 mL
- bomba de arejamento
- 9 torneiras de arejamento para aquário
- tubo de arejamento para aquário
- 9 pontas de micropipeta (idealmente de micropipetas de 1 mL ²⁰)

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

(*cf.* item correspondente na Atividade 1)

¹⁹ Para obter água desclorinada, basta retirar água da torneira com 24 h de antecedência, deixando-a num balde destapado, permitindo que o cloro se liberte sob a forma gasosa.

²⁰ O objetivo é permitir a formação de bolhas de ar de pequena dimensão (que são mais efetivas na capacidade de arejar o meio, e a sua regulação é mais fácil). Podem utilizar-se alternativas às pontas de micropipeta, como por exemplo, palhinhas perfuradas e tapadas na ponta.

Procedimento experimental

i) Preparação das soluções de teste

1. Preparar 1,6 L da água a testar (amostra de água a testar devidamente diluída *cf.* etapa anterior, doravante apenas designada “água a testar”). É aconselhável incluir também um controlo, contendo água desclorinada ou água de um local de referência, não poluído (800 mL de água) e a mesma quantidade de amêijoas presente nos frascos de teste. Apesar deste não ser estritamente necessário na sequência desta atividade, a sua realização pode permitir compreender alguma anormalidade na experiência ²¹.

ii) Montagem da experiência

2. Colocar 250 mL de solução em cada frasco de vidro, num total de 6 frascos com a água a testar, e 3 para o controlo, se incluído, previamente identificados preparando, assim, 3 réplicas para cada tratamento.

3. Montar o sistema de arejamento, colocando pontas de pipeta nas extremidades dos tubos de arejamento, para ajudar a regular o fluxo de ar. Ligar o sistema de arejamento à bomba de arejamento e afinar o fluxo de forma semelhante em todas as réplicas (Figura 1).

iii) Seleção das amêijoas para a experiência

4. Selecionar as amêijoas para o teste (*cf.* item correspondente na Atividade 1), num total de 30 amêijoas com tamanho idêntico.

iv) Atividade experimental

5. Colocar cinco amêijoas em cada frasco dos seguintes tratamentos: água sujeita a biorremediação (3 frascos) e controlo (3 frascos).

6. Manter a experiência durante 48h ²² com arejamento e sob condições de temperatura e fotoperíodo semelhantes em todos os frascos.

7. Após este período, remover as amêijoas de cada frasco e avaliar a sua viabilidade em cada frasco (*cf.* item correspondente na etapa anterior da atividade). Estes organismos podem ser descartados: para evitar a dispersão desta espécie invasora, recomenda-se que os organismos sejam congelados antes de serem descartados. Se tiver ocorrido mortalidade significativa, recomenda-se a repetição desta fase da experiência com uma concentração mais baixa (maior diluição) da água eutrofizada ou contaminada.

8. Agitar o conteúdo de cada frasco e retirar uma amostra de água ²³ para posterior avaliação da qualidade da água.

C) Avaliação da qualidade da água após ação das amêijoas

• ÁGUA EUTROFIZADA

Para avaliar a qualidade da água após a ação das amêijoas, é necessário comparar a qualidade da água sujeita e não sujeita à ação das amêijoas. Para tal, basta avaliar a densidade de microalgas nas amostras de água sujeitas e não sujeitas à ação das amêijoas – esta avaliação permite inferir acerca da eficiência de

²¹ Por exemplo, admitindo que todas as amêijoas morrem quando expostas à amostra de água a testar, o controlo com a água não contaminada poderá permitir concluir se tal se deveu à amostra de água, ou a alguma debilidade das amêijoas utilizadas.

²² Se necessário, a experiência pode prolongar-se até 96 h.

²³ Se se tratar de água eutrofizada, 5 mL de cada frasco são suficientes para a fase seguinte; se se tratar de água contaminada, o volume mínimo de cada frasco é 10 mL, apesar de se poder usar o conteúdo total de cada frasco sem necessidade de retirar uma amostra (ver procedimentos na etapa seguinte da atividade).

remoção de microalgas pelas amêijoas. Se pretendido, pode também avaliar-se a qualidade da água antes de qualquer tratamento (isto é, sem ação do arejamento ou das amêijoas). Esta atividade tem uma duração prevista de 1 h.

Material necessário

- cuvetes descartáveis (mínimo 6)
- suporte para cuvetes
- espectrofotómetro (alternativamente, câmara de contagem microscópica como indicado anteriormente)
- micropipeta de 1000 µL ou pipeta de Pasteur

Procedimento experimental

1. Quantificar a absorvância de cada amostra a 440 nm no espectrofotómetro, certificando-se que cada amostra se encontra homogénea (em termos de distribuição de algas).

Análise de resultados

2. Para cada réplica, converter a absorvância (densidade ótica) em densidade celular (se procedeu à contagem de microalgas com a câmara de Neubauer, pode ignorar este passo, dado que já obteve o valor da densidade celular). Para o efeito, poderá usar-se a reta de calibração seguinte ¹⁵:

$N^{\circ} \text{ células/mL} = 6931 + 23179166 \times Abs - 9972459 \times Abs^2$, em que Abs representa a absorvância medida a 440 nm.

Para determinar a biomassa de microalgas em cada réplica é necessário multiplicar pelo volume de meio em cada frasco (V, mL). Assim: $Biomassa = V \times N^{\circ} \text{ células}$

3. Determinar, para cada réplica do tratamento com amêijoas, a biomassa removida, usando a equação seguinte:

$Biomassa \text{ removida} = Biomassa \text{ média } T \text{ sem amêijoas} - Biomassa \text{ } T \text{ com amêijoas}$, em que Biomassa média T sem amêijoas e Biomassa T com amêijoas representam, respetivamente, a média da biomassa nas réplicas do tratamento sem amêijoas e do tratamento com amêijoas. Este valor pode ser convertido em %, para mais fácil compreensão, usando, para o efeito, a fórmula seguinte:

$$Biomassa \text{ removida } (\%) = \frac{Biomassa \text{ removida}}{Biomassa \text{ } T \text{ sem amêijoas}} \times 100$$

4. Determinar a média dos valores obtidos para cada réplica do tratamento com amêijoas, e (opcionalmente) determinar o respetivo erro padrão (para avaliação da variabilidade dos dados).

O esperado é que as amêijoas tenham removido microalgas da água em virtude da sua elevada taxa de filtração, o que se reflete numa percentagem significativa de biomassa removida nas amostras de água previamente expostas à ação das amêijoas em relação ao tratamento sem amêijoas (controlo). A simples comparação da absorvância das amostras dos tratamentos com e sem amêijoas permite obter uma ideia da eficiência de remoção de microalgas e, conseqüentemente, da eficiência de biorremediação – quanto mais díspares os valores médios dos dois tratamentos, maior a eficiência de remoção. Podem, no entanto, obter-se baixos valores de remoção de microalgas, denotando uma baixa eficiência de biorremediação nas condições testadas. Tal pode dever-se a vários fatores, entre os quais, baixa temperatura, falta (ou

reduzido) arejamento da água, reduzida dimensão das amêijoas, estado de saúde débil das amêijoas, entre outros.

Em alternativa, é possível avaliar a eficiência de biorremediação das amêijoas, através de uma análise mais simples, comparando a absorvância (ou a densidade celular, no caso de se ter procedido à contagem de células na câmara de Neubauer) entre o tratamento com amêijoas (submetido à ação das amêijoas), o controlo (não submetido à ação das amêijoas) e, opcionalmente, o tratamento contendo água sem qualquer tipo de tratamento (sem arejamento). A absorvância e a densidade celular são duas grandezas diretamente proporcionais, pelo que o uso de uma ou outra permite tirar as mesmas conclusões. A diferença entre a absorvância medida no tratamento com amêijoas e no controlo representa uma medida da biomassa consumida pelas amêijoas, permitindo obter uma ideia sobre a eficiência de remoção de microalgas verdes e, conseqüentemente sobre a eficiência de biorremediação. Por outro lado, a diferença entre a absorvância medida no controlo e no tratamento contendo água sem arejamento permite obter uma ideia sobre o efeito do arejamento na variação da densidade das microalgas verdes. Note-se que o tratamento com amêijoas engloba simultaneamente o efeito do arejamento e o efeito da filtração pelas amêijoas já que, dada a sensibilidade das amêijoas à falta de oxigénio, estas não podem ser mantidas sem arejamento.

• ÁGUA CONTAMINADA

No caso de ter sido usada água contaminada, a biorremediação pode ser avaliada através da comparação da qualidade da água sujeita e não sujeita à ação das amêijoas. Se pretendido, pode também avaliar-se a qualidade da água antes de qualquer tratamento (isto é, sem ação do arejamento ou das amêijoas). Para avaliação da qualidade da água pode utilizar-se uma espécie de planta aquática. Recomenda-se a espécie *Lemna minor*, de nome comum lentilha-de-água, uma espécie de planta aquática com uma ampla distribuição e com elevada sensibilidade a compostos químicos. Esta espécie pode ser encontrada em pequenas massas de água, nas zonas sombrias (Figura 3). O procedimento experimental segue, de um modo geral, as linhas orientadoras definidas por Silva et al. (2016) a propósito da avaliação da toxicidade de extratos aquosos de cinzas de incêndios florestais, baseando-se na norma da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) nº 221 (OECD, 2006). Esta avaliação baseia-se na contagem do número de frondes de plantas expostas à água de cada um dos tratamentos: com amêijoas e sem amêijoas. No entanto, pode ser interessante avaliar também o peso seco das plantas. Esta variável é, geralmente, mais robusta, já que é uma medida direta da biomassa das plantas. Em alternativa, pode determinar-se o peso fresco das plantas, mas esta variável é mais suscetível a variações e erros decorrentes do procedimento de secagem da água adsorvida às plantas e do tempo que decorre entre a remoção do frasco e a respetiva pesagem.



FIGURA 3. A) acumulação de *Lemna minor* num ribeiro na Região Centro de Portugal; B) *Lemna minor* mantida em laboratório.

Além dos tratamentos com amêijoas e sem amêijoas deve realizar-se um tratamento adicional, que sirva de controlo a este teste experimental. Para este controlo deve ser utilizando água de um local de referência ou, idealmente, do local onde as plantas foram recolhidas. Este controlo serve de referência para determinação da inibição do crescimento da macrófita e permite validar que o teste de inibição decorreu corretamente.

Esta atividade tem uma duração de 7 dias. Se se pretender avaliar o peso seco das plantas, deve contabilizar-se mais 1 a 2 dias para secagem das mesmas.

Material necessário

i) Seleção das plantas para a experiência

- plantas da espécie *Lemna minor*
- 4 placas de Petri
- água
- pinças

ii) Montagem da experiência²⁴

- frascos e respetiva água do final da etapa “B – Biorremediação (ação das amêijoas)” ou as respetivas amostras de água
- 3 frascos (semelhantes aos usados na etapa “B – Biorremediação (ação das amêijoas)”)
- água do local de recolha das plantas (ou de um local de referência) para o controlo do teste

iii) Finalização da experiência

- candeeiro
- estufa (se disponível)
- balança
- papel absorvente
- 9 a 12 barquinhas para pesagem

²⁴ Pode, adicionalmente, testar um tratamento extra: água contaminada não exposta a qualquer arejamento ou ação das amêijoas.

Procedimento experimental

Para evitar duplicação de informação, apresenta-se de seguida apenas as linhas gerais deste procedimento, recomendando-se a consulta do artigo de Silva et al. (2016) para mais detalhes sobre a avaliação da qualidade da água com recurso a *L. minor*.

i) Seleção das plantas para a experiência

1. Para cada frasco vão ser necessárias três colónias de *L. minor*, garantindo que as colónias colocadas em diferentes frascos apresentam o mesmo número de frondes evitando, desta forma, variabilidade entre diferentes frascos. Assim, numa fase inicial, separam-se várias colónias de plantas, cada uma com 3 a 4 frondes, suficientes para todos os frascos, distribuindo-as por placas de Petri com água e com recurso a um candeeiro para melhor visualização. Se pretender avaliar também a variação do peso fresco ou seco, deverá, adicionalmente, separar três conjuntos de colónias idênticos aos colocados nos frascos, e determinar o seu peso. O peso fresco é determinado após uma breve secagem das plantas em papel absorvente para remover o excesso de água; o peso seco implica a secagem em barquinhas de pesagem (idealmente numa estufa a 60 °C) e posterior pesagem das colónias secas. A média destes valores fornece uma estimativa do peso das plantas no início do teste.

ii) Montagem da experiência

2. Por uma questão de facilidade, sugere-se que a avaliação da qualidade das amostras de água seja feita colocando as plantas diretamente nos frascos de vidro após desligar o arejamento, *i.e.*, após o final da etapa “B – Biorremediação (ação das amêijoas)”. Em cada frasco devem ser colocadas três colónias de *L. minor*. O controlo deste teste deverá ser realizado com recurso a uma água natural de um local de referência (não contaminado). Cada tratamento é testado em triplicado.

3. Manter os frascos em condições de temperatura e fotoperíodo idênticas, por um período de sete dias ²⁵.

4. Passado este período, contar o número de frondes nas colónias de cada frasco, *i.e.*, em cada réplica. Recomenda-se o uso de um candeeiro para ajudar na visualização.

5. Caso se pretenda avaliar o efeito da biorremediação no peso seco das plantas, colocar as colónias de cada frasco em barquinhas e deixar a secar numa estufa a 60 °C para posterior pesagem. Se optar por determinar o peso fresco deve pesar as plantas após uma breve secagem em papel absorvente para remoção do excesso de água.

Análise de resultados

6. A análise de resultados foi também descrita por V. Silva et al. (2016), pelo que aqui se aborda apenas uma breve apresentação dos mesmos. Para cada uma das variáveis (*i.e.*, número de frondes e peso seco), pode determinar-se o incremento de biomassa (y) e a taxa de crescimento específico (μ) em cada frasco, utilizando, respetivamente, as seguintes fórmulas:

$$y = X_f - X_i$$

²⁵ Pode ser necessário prolongar a duração do teste no caso de o crescimento das plantas ser insuficiente (o que se pode dever a baixa temperatura ou iluminação).

$\mu = \frac{\ln(Xf) - \ln(Xi)}{t}$, em que Xf e Xi representam, respetivamente o valor da variável em estudo (número de frondes ou peso seco) no final do tempo de exposição (7 dias ²⁶) e no início do tempo de exposição, e t representa a duração da exposição em dias.

Para uma melhor compreensão, é frequente apresentar os resultados em termos de inibição: inibição do incremento de biomassa (Iy) e inibição da taxa de crescimento específico ($I\mu$), ambas expressas em percentagem, utilizando as seguintes fórmulas:

$$Iy = \frac{y_{controlo} - y_{tratamento}}{y_{controlo}} \times 100$$

$I\mu = \frac{\mu_{controlo} - \mu_{tratamento}}{\mu_{controlo}} \times 100$, em que $y_{controlo}$ e $\mu_{controlo}$ representam, respetivamente o valor médio do incremento de biomassa e da taxa de crescimento específico da variável em estudo (número de frondes, peso seco ou peso fresco) no controlo, e $y_{tratamento}$ e $\mu_{tratamento}$ representam, respetivamente o valor do incremento de biomassa e da taxa de crescimento específico da variável em estudo em cada frasco dos tratamentos (tratamento com amêijoas e tratamento sem amêijoas). Estes cálculos são efetuados para cada réplica de cada tratamento, pelo que de seguida se deve determinar a média dos valores obtidos para cada tratamento, e (opcionalmente) determinar o respetivo erro padrão (para avaliação da variabilidade dos dados).

Espera-se menor inibição do incremento de biomassa e da taxa de crescimento específico (resultado de uma taxa de crescimento mais elevada) e aparência mais saudável das plantas na água do tratamento com amêijoas do que na água do tratamento sem amêijoas, o que reflete uma biorremediação eficiente. Os valores de inibição observados no tratamento com amêijoas permitem também inferir acerca da persistência (ou não) de toxicidade na água mesmo após biorremediação, mas esta conclusão apenas é válida caso se tenha usado no controlo água de um local de referência (não contaminado) semelhante à água contaminada (em termos de dureza, pH, condutividade, etc.). Note-se que a (esperada) melhoria da qualidade da água após a biorremediação pode ser resultado de vários fatores, nomeadamente: degradação dos compostos tóxicos pelas amêijoas; adsorção dos compostos tóxicos a produtos de excreção (muco ou pseudofeces), o que reduz a sua biodisponibilidade; produção de compostos resultantes da excreção das amêijoas que atuem como fonte de nutrientes para as plantas, melhorando o seu crescimento. Pode, em oposição, dar-se o caso de o metabolismo das amêijoas processar os compostos tóxicos presentes na água e originar metabolitos (produtos do metabolismo) mais tóxicos que os compostos originais, o que resultará no aumento da toxicidade da água após ação das amêijoas. De um modo geral, o metabolismo dos contaminantes leva à produção de metabolitos com menor toxicidade, mas em alguns casos pode verificar-se o oposto (La Farré et al., 2008; Maculewicz et al., 2022).

O tratamento opcional com água não tratada (*i.e.*, água contaminada não submetida a arejamento nem à ação das amêijoas), deve apresentar resultados semelhantes aos obtidos no tratamento com água não submetida à ação das amêijoas. Qualquer diferença entre a toxicidade destas duas amostras de água poderá dever-se à eventual ação de degradação microbiana estimulada pelo arejamento (condições aeróbias).

²⁶ Ou outro, se a duração da experiência tiver sido ajustada.

É possível ainda analisar os resultados de uma forma mais simples, por comparação da diferença entre o número de frondes/folhas final e o inicial para cada tratamento. Esta diferença traduz o aumento da biomassa das plantas, dando indicações acerca da qualidade da água. Quanto maior esta diferença, maior a qualidade da água para as plantas. É esperado que, se a biorremediação tiver sido bem-sucedida, no tratamento com água submetida à ação das amêijoas o número de frondes/folhas aumente durante o período de exposição. Isto deve-se ao facto de esta água ter sido biorremediada pelas amêijoas (as amêijoas terão removido o(s) contaminantes(s) através da biofiltração), e, portanto, as plantas terão condições para se desenvolverem. Já no tratamento com água não submetida à ação das amêijoas, o número de frondes/folhas deve sofrer um aumento menos significativo, ou pode até mesmo manter-se, isto porque esta água não teve a sua qualidade melhorada pela biorremediação mediada pelas amêijoas. Dependendo do poluente presente nesta água, é também possível que as plantas não sobrevivam à exposição.

CONCLUSÃO

Neste artigo apresentam-se duas atividades experimentais em que se recorre à elevada taxa de filtração da *C. fluminea* para ilustrar o efeito dos fatores abióticos na sua dispersão, bem como o seu elevado potencial para biorremediação de águas contaminadas, numa aplicação real. As atividades propostas dirigem-se essencialmente aos alunos do Secundário, podendo ser realizadas em contexto de aulas ou de atividades dos Clubes de Ciência das escolas, uma vez que requerem equipamentos que, geralmente, estão disponíveis nas escolas. Estas atividades são importantes para assimilar e compreender aplicações práticas dos conteúdos disciplinares de Biologia, servindo de apoio à sua lecionação. No entanto, o facto de articular diferentes disciplinas da área científica e de familiarizar os alunos com o processo experimental deverá contribuir para um enriquecimento académico dos alunos e para a compreensão do papel da ciência no desenvolvimento do conhecimento.

agradecimentos • Os autores agradecem o apoio financeiro ao CESAM pela FCT/MCTES (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+ LA/P/0094/2020), através de fundos nacionais. Este trabalho foi preparado no âmbito do projeto europeu NYMPHE, financiado pela União Europeia através do Programa Horizon Europe (Grant no. 101060625; DOI 10.3030/101060625). Os pontos de vista e opiniões expressos são, no entanto, da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não reflectem necessariamente os da União Europeia ou da Agência Executiva Europeia de Investigação (REA). Nem a União Europeia nem a autoridade que concedeu o financiamento podem ser responsabilizadas pelos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F & Pereira JL (2018). Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (OF Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology* 196: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.002>
- Coelho SR, Sousa ACA, Pastorinho MR, Pacheco MJ, Ciriaco L, Lopes A & Fernandes A (2021). Avaliação toxicológica de lixiviados tratados de aterro sanitário por meio do crustáceo de água doce *Daphnia magna*. *CAPTAR* 10: art. 7. <https://doi.org/10.34624/captar.v0i0.21057>
- Domingues A, Rosa IC, Pinto da Costa J, Rocha-Santos TAP, Gonçalves FJM, Pereira R & Pereira JL (2020). Potential of the bivalve *Corbicula fluminea* for the remediation of olive oil wastewaters. *Journal of Cleaner Production* 252: 119773. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119773>
- Domingues E, Fernandes E, Gomes J & Martins RC (2021). Swine wastewater treatment by Fenton's process and integrated methodologies involving coagulation and biofiltration. *Journal of Cleaner Production* 293: 126105. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126105>
- Ferreira-Rodríguez N & Pardo I (2016). An experimental approach to assess *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) resistance to osmotic stress in estuarine habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 176: 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.017>
- Ferreira R, Gomes J, Martins RC, Costa R & Quinta-Ferreira RM (2018). Winery wastewater treatment by integrating Fenton's process with biofiltration by *Corbicula fluminea*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93: 333-339. <https://doi.org/10.1002/jctb.5355>
- Gabriel RG, Ré A, Gonçalves F, Costa R & Pereira JL (2013). Monitorização e controlo da amêijoia invasora *Corbicula fluminea* em indústrias hidro-dependentes. *CAPTAR* 4(1): 92-112. <https://doi.org/10.34624/captar.v4i1.13611>
- Gomes J, Domingues E, Fernandes E, Castro L, Martins R & Quinta-Ferreira R (2021). Coagulation and biofiltration by *Corbicula fluminea* for COD and toxicity reduction of swine wastewater. *Journal of Water Process Engineering* 42: 102145. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102145>
- Gomes JF, Lopes A, Gonçalves D, Luxo C, Gmurek M, Costa R, ...Matos A (2018). Biofiltration using *C. fluminea* for *E.coli* removal from water: Comparison with ozonation and photocatalytic oxidation. *Chemosphere* 208: 674-681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.045>
- Ismail NS, Müller CE, Morgan RR & Luthy RG (2014). Uptake of Contaminants of Emerging Concern by the Bivalves *Anodonta californiensis* and *Corbicula fluminea*. *Environmental Science & Technology* 48(16): 9211-9219. <https://doi.org/10.1021/es5011576>
- Ismail NS, Tommerdahl JP, Boehm AB & Luthy RG (2016). *Escherichia coli* Reduction by Bivalves in an Impaired River Impacted by Agricultural Land Use. *Environmental Science & Technology* 50(20): 11025-11033. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03043>
- Jesus F, Santos M, Ré A, Campos I, Pereira JL, Gonçalves FJM, ...Serpa D. (2021). Avaliação dos Efeitos dos Incêndios Florestais na Espécie Bentónica *Chironomus riparius*. *CAPTAR* 10: art. 2. <https://doi.org/10.34624/captar.v0i0.23938>
- La Farré M, Pérez S, Kantiani L & Barceló D (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(11): 991-1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- Li X-N, Song H-L, Li W, Lu X-W & Nishimura O (2010). An integrated ecological floating-bed employing plant, freshwater clam and biofilm carrier for purification of eutrophic water. *Ecological Engineering* 36(4): 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.004>
- Loureiro C, Gonçalves F, Pedrosa MA, Pereira JL, Antunes SC & Castro BB (2013). Efeitos de alterações ambientais em populações de invertebrados: uma abordagem prática. *CAPTAR* 4 (1): 57-71. <https://doi.org/10.34624/captar.v4i1.13605>
- Maculewicz J, Kowalska D, Świacka K, Toński M, Stepnowski P, Białk-Bielińska A & Dolzonek J (2022). Transformation products of pharmaceuticals in the environment: Their fate, (eco)toxicity and bioaccumulation potential. *Science of the Total Environment* 802: 149916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149916>
- Mouthon J (1981). Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria* 45(4/5): 109-116.
- OECD (2006). Test no. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- Pipolo M, Martins RC, Quinta-Ferreira RM & Costa R (2017). Integrating the Fenton's Process with Biofiltration by *Corbicula fluminea* to Reduce Chemical Oxygen Demand of Winery Effluents. *Journal of Environmental Quality* 46: 436-442. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.09.0338>
- Rosa IC, Costa R, Gonçalves F & Pereira JL (2011). *Corbicula fluminea*: Utilização de uma espécie invasora como organismo experimental. *CAPTAR* 3(1): 40-59. <https://doi.org/10.34624/captar.v3i1.14479>

- Rosa IC, Costa R, Gonçalves F & Pereira JL (2014). Bioremediation of Metal-Rich Effluents: Could the Invasive Bivalve *Corbicula fluminea* Work as a Biofilter? *Journal of Environmental Quality* 43(5): 1536-1545. <https://doi.org/10.2134/jeq2014.02.0069>
- Sampaio EAS (2012). *Comparação da diversidade e estrutura das comunidades de macroinvertebrados bentônicos associados ao bioinvasor Corbicula fluminea na área estuarina de água doce dos rios Minho e Lima*. Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/66591/2/30699.pdf>
- Shen R, Gu X, Chen H, Mao Z, Zeng Q & Jeppesen E (2020). Combining bivalve (*Corbicula fluminea*) and filter-feeding fish (*Aristichthys nobilis*) enhances the bioremediation effect of algae: An outdoor mesocosm study. *Science of the Total Environment* 727: 138692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138692>
- Silva C, Anselmo A, Macário IPE, Figueiredo D, Gonçalves FJM & Pereira JL (2020). The bad against the villain: Suitability of *Corbicula fluminea* as a bioremediation agent towards cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering* 152: 105881. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105881>
- Silva V, Pereira JL, Gonçalves F, Keizer J & Abrantes N (2016). Efeitos dos fogos florestais nos sistemas aquáticos. *CAPTAR* 6(2): 68-77. <https://doi.org/10.34624/captar.v6i2.11367>
- Song H, Li X, Li W & Lu X (2014). Role of biologic components in a novel floating-bed combining *Ipomoea aquatic*, *Corbicula fluminea* and biofilm carrier media. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 8(2): 215-225. <https://doi.org/10.1007/s11783-013-0587-z>

ANEXO I

Recolha e manutenção das amêijoas

A recolha das amêijoas deverá ser feita com vários dias de antecedência, permitindo um período de quarentena antes da sua utilização nas atividades experimentais.

● Material necessário

Recolha das amêijoas

- saco de rede (malha que permita a saída de areia, mas não das amêijoas)
- baldes de plástico com tampa (para transporte das amêijoas e de água)
- 1 tabuleiro (para triagem das amêijoas)

Manutenção das amêijoas

- baldes de plástico
- água desclorinada (pode ser água da torneira retirada 1 dia antes do uso)
- suspensão de microalgas verdes (para alimentar as corbículas)
- bomba de arejamento e tubos de arejamento com pedras difusoras na extremidade

● Procedimento

Enterrar a abertura do saco de rede cerca de 5 - 10 cm no sedimento do curso de água, e puxar o saco de modo a recolher a parte superficial do sedimento. Em alternativa, pode usar-se uma pá para recolha da parte superficial do sedimento. Agitar o saco, mantendo-o dentro de água, de modo a permitir a saída dos sedimentos de maiores dimensões. Colocar o conteúdo do saco num tabuleiro e triar as amêijoas. Idealmente, devem recolher-se amêijoas com tamanhos entre 20 e 25 mm de comprimento, mas podem ser usados organismos com outras dimensões.

As amêijoas devem ser transportadas para o laboratório com brevidade - idealmente o transporte deverá durar menos de 2 h. É aconselhável trazer alguma água do campo para as primeiras trocas de água.

Imediatamente após a chegada ao laboratório, os baldes que contêm as amêijoas devem ser colocados sob arejamento. No dia seguinte, as amêijoas devem ser transferidas para um novo balde contendo 50 % de água desclorinada e 50 % de água de campo. Passados um a dois dias, as amêijoas devem ser transferidas para um balde contendo 75 % de água desclorinada e 25 % de água de campo. Por fim, passados um a dois dias, as amêijoas podem ser transferidas para um balde contendo 100% de água desclorinada. As amêijoas devem ser alimentadas *ad libitum* com uma suspensão de microalgas verdes 3 vezes por semana (podem ser pré-congeladas) ou com espinafres cozidos e moídos.



ANEXO II

Atividades opcionais

O manuseamento de microalgas na atividade “Efeito dos fatores abióticos na distribuição da amêijoia asiática” representa uma boa oportunidade para se efetuarem observações da morfologia da espécie, por observação das microalgas ao microscópio. Para uma melhor visualização da morfologia das microalgas (idealmente não previamente congeladas), recomenda-se uma ampliação de pelo menos 400x, apesar das células serem observáveis com uma ampliação de 100x.

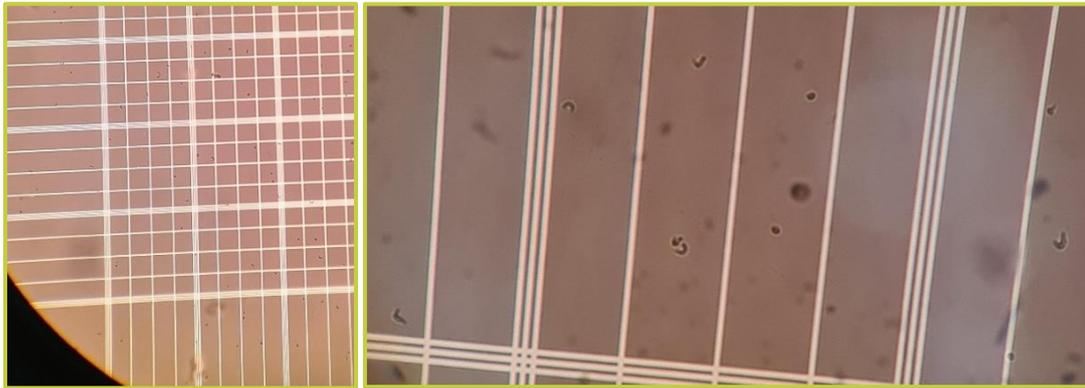


FIGURA II.1: Visualização de *Raphidocelis subcapitata* ao microscópio: à esquerda, numa ampliação de 100x; à direita numa ampliação de 400x (visualização numa câmara de Neubauer).

Em adição, pode também proceder-se à dissecção de alguns exemplares de amêijoia, para identificação dos principais órgãos internos. Entre os órgãos de mais fácil identificação estão o manto, o pé, a massa visceral e os sifões. Recomenda-se a consulta do artigo de Rosa et al. (2011) para identificação da anatomia básica da espécie.

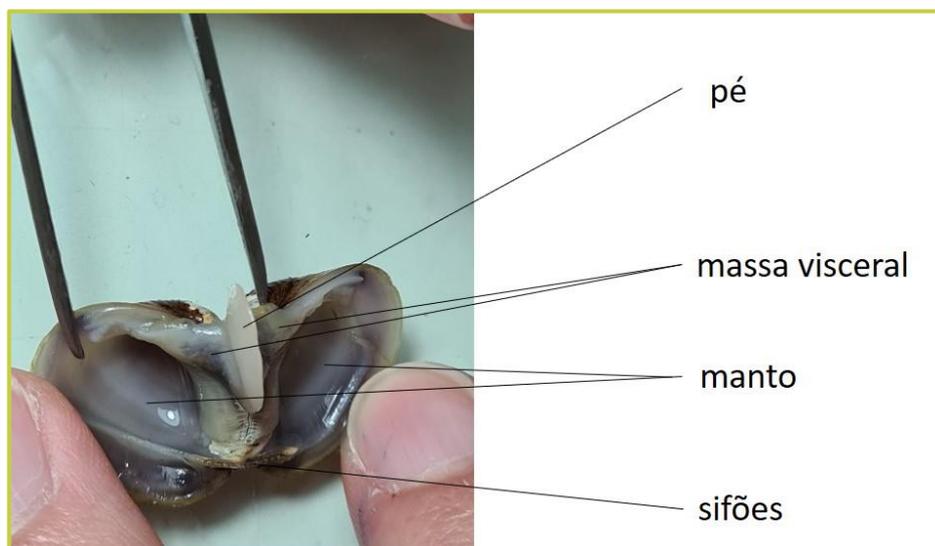


FIGURA II.2: Anatomia básica de *Corbicula fluminea* – vista interna das duas valvas.

ANEXO III

Contagem de microalgas na câmara de Neubauer

Em alternativa à estimativa da densidade celular com base nas absorvâncias medidas num espectrofotómetro, pode determinar-se a densidade celular por meio da contagem de microalgas na câmara de Neubauer.

A contagem de microalgas pode ser realizada num microscópio ótico, com uma ampliação mínima de 100x. Para isso, é necessária uma câmara de Neubauer, que após ser carregada com a amostra, deve ser inserida na platina do microscópio. Para realizar este procedimento, deve seguir os seguintes passos:

- Colocar a amostra que contém as microalgas, devidamente homogeneizada, na câmara de Neubauer, usando preferencialmente uma micropipeta de 200 ou 1000 μL ou, em alternativa, uma pipeta de Pasteur. A ponta da pipeta deve ser encostada ao bordo da lamela que cobre a câmara e à própria câmara (Figura III.1). A adição da amostra deve ser feita dos dois lados da câmara, de forma a preencher ambas as grelhas de contagem. A amostra deve ser adicionada, até que não sobre mais ar entre a lamela e as secções da câmara com as grelhas. Os poços da câmara não devem ser enchidos completamente, visto que a sua função é apenas receber o excedente de amostra colocada.

Após a colocação da amostra, devem-se aguardar pelo menos 5 minutos, para permitir que as microalgas assentem. Isto vai permitir que todas as microalgas fiquem no mesmo plano de focagem do microscópio, facilitando a contagem. Em seguida, colocar a câmara na platina do microscópio e focar o mesmo.

A contagem deve ser realizada no quadrado central grande com 5x5 quadrados médios, que por sua vez possuem 4x4 quadrados pequenos (Figura III.2). A contagem deve ser efetuada nas duas grelhas. Se a diferença na contagem das duas grelhas for considerável, deve repetir-se o procedimento de contagem, recarregando as duas grelhas da câmara, de forma a determinar um valor médio mais preciso.

Calcular a média do valor obtido nas duas grelhas. Se forem realizadas mais contagens, então a média deve ser calculada para todas as contagens (e.g., se fizer a contagem em duas câmaras, significa que foram contadas quatro grelhas, então a média pretendida será a soma das quatro contagens a dividir por quatro).

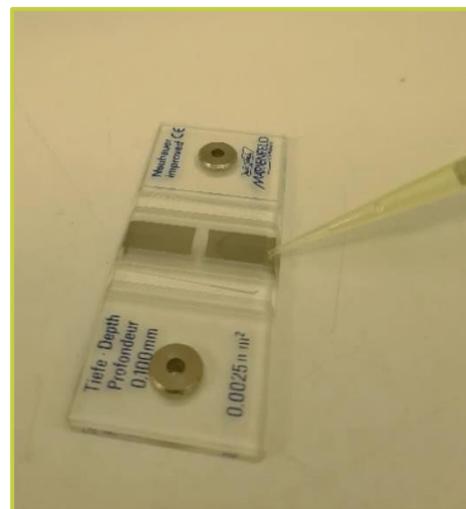


FIGURA III.1: Carregamento da câmara de Neubauer.

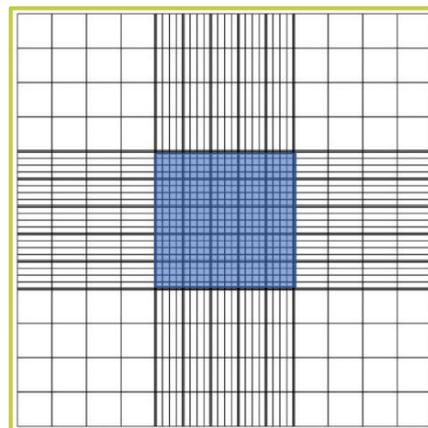


FIGURA III.2: Grelha da câmara de Neubauer, evidenciando o quadrado 5x5 central, onde deve ser efetuada a contagem das microalgas.

Após obter o valor da média das contagens, deve utilizar-se a seguinte fórmula, para obter a densidade celular de microalgas:

$Densidade\ celular = \frac{média \times 1000}{0,1} = média \times 10^4$, em que a densidade celular é dada em células/mL, 0,1 corresponde à área do quadrado 5x5 da grelha em mm³, 1000 corresponde à equivalência em mm³ de 1 mL (dado que a densidade celular é dada em células/mL) e a média é a média da contagem da câmara. O raciocínio deste cálculo é, basicamente, uma “regra de três simples”, e portanto, se numa área de 0,1 mm³ temos um determinado número de células (média), então numa área de 1000 mm³ (que corresponde a um volume de 1 mL) temos x células/mL, em que x corresponde ao valor da densidade celular de microalgas.

Notas:

- O quadrado 5x5 central é limitado por três linhas, tendo isto em conta, a contagem deve ser efetuada apenas da linha central (desse conjunto de três linhas) para dentro do quadrado.
- Cada microalga que se encontre sobre essa linha central ou sobre as linhas que limitam os quadrados médios 4x4, conta como meia microalga, pelo que a próxima que se encontre na mesma situação, irá completar uma microalga.