

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

1. OBJECTIVOS

O principal objectivo desta actividade reside na utilização de um índice biológico como ferramenta de biomonitorização de compostos disruptores endócrinos em sistemas marinhos e estuários.

Os objectivos específicos são: a) Conhecer as características externas e internas da ostra; b) identificar as diferenças de espessamento da concha de acordo com os locais do seu crescimento na região e as compradas num supermercado da zona; c) aferir, a partir do índice determinado, o estado da qualidade da água da zona monitorizada; d) identificar as vantagens e limitações na determinação destes índices biológicos.

2. INTRODUÇÃO

Em meados dos anos setenta (século XX) verificou-se o desaparecimento dos principais bancos naturais de ostra em quase todo o Mundo. Referências várias apontam para o declínio quase simultâneo nos seguintes países: França (Alzieu *et al.*, 1980, 1982), Inglaterra (Langston *et al.*, 1987), Portugal (Phelps e Page, 1997), Estados Unidos da América (Rothschild *et al.*, 1994 – Baía de Chesapeake, Stephenson *et al.*, 1986 – Baía de San Diego, Smith *et al.*, 1987 – Costa da Califórnia), Pacífico (Wolniakowski *et al.*, 1987 – Baía de Coos), Austrália e Nova Zelândia (Batley *et al.*, 1989). Essa mortalidade registada estava relacionada com uma alteração morfológica da ostra que, nos casos mais graves, se caracterizava por uma forma esférica.

Trabalhos de campo e laboratoriais, permitiram identificar elevados teores de Tributilde-estanho - TBT (biocida incorporado nas chamadas tintas antivegetativas) nos tecidos das ostras e estabelecer correlações positivas muito significativas entre a incidência das malformações, os teores destes compostos químicos na água e nos

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

sedimentos e também a proximidade de potenciais fontes destes xenobióticos: docas, portos marítimos, marinas e locais de intenso tráfego marítimo (recreativo ou desportivo).

Posturas da ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*), expostas por um período de 49 dias a uma gama de concentrações de 2 a 200 ng TBT.l⁻¹, evidenciaram o seguinte (Thain *et al.*, 1987): não foi observado nenhum efeito de espessamento da concha nos indivíduos provenientes dessas posturas nos ensaios brancos e a 2 ng TBT.l⁻¹. No entanto, face a concentrações de 20 a 200 ng TBT.l⁻¹, houve um aumento na relação dose-resposta, o qual se traduziu num espessamento acentuado da concha, a 100 ng TBT.l⁻¹; a 200 ng TBT.l⁻¹ esta mostrou-se esférica (“Balling”) desaparecendo o perfil achatado de uma valva característica de uma concha normal.

Alzieu *et al.* (1982) verificaram que adultos de ostra da espécie *C. gigas* desenvolveram espessamento da concha, quando expostas a uma concentração de 200 ng TBTF.l⁻¹.

De acordo com Alzieu *et al.* (1989) as malformações da concha registadas nesta espécie, podem ser induzidas a concentrações superiores a 2 ng TBTF.l⁻¹.

Embora se tenha verificado em alguns locais a recuperação de bancos de ostras, assim, como o reaparecimento de outras espécies mais sensíveis após a implementação de legislação específica (Minchin *et al.*, 1995, Dowson *et al.*, 1993, Bryan *et al.*, 1993, Tester e Ellis, 1995, Evans *et al.*, 1994, 1996), os teores dos TBTs são, em muitas regiões do mundo, ainda hoje, superiores ao limite de concentração de 20 ng TBT.l⁻¹, valor geralmente aceite como o limite de protecção dos ecossistemas aquáticos.

Sendo assim, o espessamento da concha e a alteração morfológica da concha para uma forma esférica, a que os ingleses denominam de “balling”, encontra-se entre os efeitos crónicos mais relevantes e facilmente identificáveis deste composto nestes moluscos. O espessamento da concha resulta de uma acção de natureza disruptora do xenobiótico no mecanismo de formação do cálcio. Ostras com forte espessamento indicam a presença de compostos disruptores endócrinos no sistema ambiental.

2.1 A OSTRAS COMO INDICADOR BIOLÓGICO

Um indicador biológico funciona como um organismo que reflecte as condições do ambiente onde se insere, a partir de sinais biológicos específicos. Para se considerar um organismo como um indicador biológico, é necessário que este apresente algumas características. Deste modo, a ostra apresenta as seguintes características que a levam a considerar como um excelente bioindicador de referência na avaliação da qualidade dos sistemas marinhos e dos estuários:

- a). É um bivalve filtrador; sendo um predador passivo, alimentando-se de fitoplâncton, não necessita que lhe seja fornecido o alimento, quando inserida em saco ostreícola: a natureza encarrega-se de o fazer;
- b). É um organismo sedentário: sendo sedentária, não importa efeitos do exterior à zona de monitorização: os efeitos apresentados reflectem as condições locais;
- c). É autóctone. Esta característica é muito importante, porque, por um lado, significa que o organismo se adapta bem ao local de monitorização; por outro, não se corre o risco de se gerar um desequilíbrio ecológico, característico de introdução de uma espécie exótica no sistema ambiental;
- d). É um organismo euritérmico e eurihalino, conferindo-lhe assim, bastante resistência, quer no manuseamento, quer na adaptabilidade ao sistema a monitorizar, caso se verifiquem alterações pontuais de temperatura e salinidade durante o período de monitorização;
- e). Fácil de manusear em laboratório;
- f). Assegura uma integração com o ambiente aquático onde se insere, podendo dar logo a indicação do estado de salubridade do meio ao técnico responsável pelo programa de monitorização;

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

- g). Apresenta um elevado valor comercial. Este facto, por um lado, sensibiliza a comunidade em geral para a canalização de verbas para auxiliar a investigação; por outro, existe um mercado próprio que disponibiliza juvenis;
- h). Já existe uma relação dose-resposta que, embora seja numa escala semi-quantitativa, dá indicação do estado da qualidade do sistema;
- i). Uma característica muito importante, é o facto de se tratar de um efeito reversível, ou seja, a concha volta a retomar a forma normal se inserida em zonas “limpas”. A figura abaixo (Figura 1) mostra esta característica:



Figura 1. Ostra Portuguesa (*Crassostrea angulata*) após o transplante para um local “limpo”. Indica-se, a linha a tracejado, a fase de crescimento do bivalve no local “limpo”.

Note-se que algumas das características apresentadas não são relevantes para a actividade a desenvolver com os alunos, mas são características que permitem o uso da ostra como indicador biológico de referência.

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

2.2 ÍNDICES DE MONITORIZAÇÃO:

Existem diversas propostas, por vários autores, que tentam estabelecer uma relação causa-efeito. Apresenta-se os diversos índices propostos, embora nesta actividade se utilize somente o primeiro indicado, uma vez que já é conhecida a relação causa-efeito:

1. “Shell Thickness Index” – STI₁ (Alzieu *et al.*, 1982):

$$STI_1 = \frac{\text{Tamanho da valva direita (mm)}}{\text{Espessura da valva direita (mm)}}$$

Para este índice já existe a seguinte relação causa-efeito (Figura 2):



Figura 2. Tabela de qualidade de acordo com o índice STI.

2. “Cavity/ Depth Ratio” (Hey *et al.*, 1976):

$$CDR = \frac{\text{Espessura máxima da ostra intacta}}{(\text{Volume total} - \text{Volume das valvas})}$$

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

3. Densidade das valvas (His e Robert, 1987):

3.1. LVD - “*Left Valve Density*”- Densidade da valva esquerda (His e Robert, 1987):

$$\text{LVD} = \frac{\text{Peso da valva esquerda}}{\text{Volume da valva esquerda}}$$

3.2. RVD - “*Right Valve Density*” – Densidade da valva direita (His e Robert, 1987)

$$\text{RVD} = \frac{\text{Peso da valva direita}}{\text{Volume da valva direita}}$$

3. METODOLOGIA

A metodologia é simples. Convém referir que seria interessante os alunos analisarem ostras da sua região de forma a avaliarem o estado da qualidade da água da zona onde podem encontrar as ostras. Devem pedir a um profissional que faça a apanha das ostras porque os sedimentos por vezes são falsos e torna-se perigoso para uma pessoa inexperiente.

3.1 MATERIAL:

- 30 (ou mais) ostras colhidas do meio a monitorizar;
- Escova de lavagem;
- Faca de ostras;
- Paquímetro (craveira) (de preferência de plástico);
- Balança de precisão (+- 0.1 g);
- Proveta ou vaso graduado;
- Papel absorvente;
- Luvas cirúrgicas;
- Caixas de Petri (Pyrex ou plásticas);
- Película aderente;
- Lápis;
- Ficha de registo individual;
- Marcador com tinta insolúvel na água (Caneta de acetato);
- Sacos de plástico pequenos (de congelador).

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Nesta actividade, aconselha-se a congelação das amostras antes da análise, para evitar acidentes. Os bordos da concha são ligeiramente cortantes. Por isso aconselha-se o uso de luvas na fase de manuseamento do material biológico, em especial na fase de lavagem e de abertura da concha.

1. Lavar cuidadosamente as ostras (em água corrente ou dentro de uma bacia com água), com o auxílio de uma escova, a fim de retirar a maior porção possível de sedimento sobre as conchas sem as partir ou deteriorar (Figura 3);



Figura 3. Lavagem e limpeza das ostras.

2. Remover todo o material estranho (ex: cracas, algas, galerias de poliquetas), com o auxílio de uma faca de ostras (Figura 4) ou canivete. (Caso seja mais conveniente, poderão ser os próprios professores ou um auxiliar adulto a realizar esta tarefa);



Figura 4. Faca de ostras.

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

3. Limpar as ostras com um papel absorvente para se retirar o excesso de água e deixar escorrer durante alguns instantes;
4. Individualizar os exemplares, colocando-os, por exemplo, em caixas de Petri numeradas (Figura 5);



Figura 5. Uma das formas possíveis de referenciar as ostras.

5. Pesar as ostras (Figura 6) com o auxílio de uma balança de precisão, a fim de se determinar o peso individual total;



Figura 6. Pesagem das ostras.

6. Determinar o volume total da ostra (Figura 7), seguindo o método de deslocamento dos níveis de um fluido (Este processo pode ser efectuado logo após a lavagem das ostras, caso estas estejam vivas. No caso de utilizar o material congelado convém efectuar a determinação do volume antes do material descongelar):

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

- 6.1. Inserir água numa proveta a um nível determinado (anotar ou fixar esse valor);
- 6.2. Fazer deslizar a ostra ao longo das paredes da proveta com esta ligeiramente inclinada, para que se evite o derrame de água quando a ostra é mergulhada na água da proveta. (A ostra deve estar totalmente mergulhada na água);
- 6.3. Verificar a diferença entre os níveis de água e considerar essa diferença como o volume total da ostra em mililitros.



Figura 7. Processo para a determinação do volume de uma ostra.

7. Proceder à determinação dos dados biométricos da ostra intacta: altura (tamanho), largura e profundidade. Para tal, recorre-se a um paquímetro (craveira) e a medição faz-se à precisão do milímetro (Figura 8).

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?



Figura 8. Determinação dos dados biométricos da ostra.

8. Os exemplares são abertos recorrendo a uma faca própria. Como irão observar os exemplares mortos, a abertura das conchas é fácil e não requer o uso de material cortante. Caso os exemplares estejam vivos esta operação deve realizar-se com cuidado, pois o animal oferece resistência, cerrando com força as valvas, e o operador corre o risco de se ferir. No caso de um operador inexperiente nesta matéria, deve congelar as amostras antes de as analisar, para facilitar a abertura dos exemplares sem partir ou deteriorar as valvas, ou colocá-las em cima de gelo (ou de termoacumuladores) para que os animais diminuam de vitalidade.

9. Separar a concha da parte edível;

10. Pesar a parte edível e as valvas recorrendo à balança de precisão utilizada para a determinação da pesagem total (de referir que as pesagens devem ser efectuadas sempre na mesma balança);

11. Proceder à medição da altura (tamanho), largura e profundidade de cada valva (Figura 9) (geralmente, o tamanho da valva esquerda corresponde ao tamanho total da ostra intacta) (a espessura determina-se na zona mais espessa da valva);

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?



Figura 9. Exemplo de procedimento para medição da valva direita de uma ostra.

12. Determinar o volume da cada valva, utilizando a mesma metodologia aplicada no ponto 6.
13. Identificar o material (valvas e parte edível), colocando-os em sacos de plástico e indicando o local de colheita, data de colheita e número do exemplar.

Os dados obtidos através das medições, pesagens e volumes, devem ser todos anotados em ficha própria, como o exemplo em ficheiro separado.

4. RESULTADOS E TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados devem ser coligidos e tratados informaticamente, de preferência utilizando um programa estatístico para identificar “erros” e eventuais diferenças significativas entre as amostras analisadas.

Nesta fase utilizaremos um tratamento simples e a tabela pode ser feita de acordo com o exemplo seguinte (Figura 10). Elabora-se uma tabela para cada conjunto de ostras.

OSTRAS E POLUIÇÃO: QUE LIGAÇÃO?

Nº	OSTRA INTACTA			VALVA DIREITA			VALVA ESQUERDA			PESO						STI
	Tamanho (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Tamanho (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Tamanho (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Total g	P. Edível g	V. Direita g	V. Esquerda g	Concha g	Pedivel/Total (%)	
1																
2																
3																
...																
Média																
Desvio																
Máximo																
Mínimo																
n																

Figura 10. Exemplo de uma tabela de tratamento de dados

Sugestões para a interpretação dos resultados e outras propostas:

- 1 Análise comparativa dos valores médios relativos aos dados biométricos da amostra de campo e a adquirida no supermercado;
- 2 Cálculo do valor do STI para cada caso. Este valor não é mais do que a média aritmética dos valores da coluna respeitante, arredondada ao valor inteiro;
- 3 Consulta da tabela 2 e atribuição da cor na escala de qualidade, de acordo com os valores de STI encontrados;
- 4 Comparação do valor médio da proporção, em peso, da parte edível em relação ao peso total com o respectivo valor do STI (em ostras espessadas, essa proporção apresenta um valor inferior às amostras com concha menos espessada);
- 5 Análise da coloração do miolo de cada amostra, tentando ver se existe um contraste nítido de coloração entre o bordo do manto e a sua restante superfície. (Ostras com o bordo muito nítido, geralmente, são ostras saudáveis).
- 6 Investigar sobre o TBT e os problemas de saúde dos trabalhadores da indústria naval que estiveram em contacto com astintas anti-vegetativas com TBT.

Bom trabalho e boas análises!

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzieu Cl., Heral, M., Thibaud, Y., Dardignac, M.J. e Feuillet, M (1982) Influence des peintures antissalissures à base d' organostanniques sur la calcification de la coquille de l' ôître *Crassostrea gigas*, *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 45, pp 100-116.
- Alzieu Cl., Sanjuan, J., Deltriel, J.P. e Borel, M. (1986) Tin contamination in Arcachon Bay effects on oyster shell anomalies, *Marine Pollution Bulletin* 17, pp 494-498.
- Alzieu Cl., Sanjuan, J., Michel, P., Borel, M. e Dreno, J.P. (1989) Monitoring and assessment of butyltins in Atlantic coastal waters, *Marine Pollution Bulletin* 20, pp 22-26.
- Alzieu Cl., Thibaud, Y., Heral, M. e Boutier, B. (1980) Evaluation des risques à l'emploi des peintures antissalissures dans les zones conchylicoles, *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 44, pp 301-348.
- Associação de Valorização do Património Cultural e Ambiental de Olhão (APOS) (2008). [Acessível on line através do seguinte portal: <http://www.olhao.web.pt/ParqueNatural.htm>]
- Batley G.E., Fuhua, C., Brocklebank, C.E. e Flegg, K.J. (1989) Accumulation of tributyltin by the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*, *Aus. J. Mar. Freshwater Res.* 40, pp 49-54.
- Bryan G.W., Burt, G.R., Gibbs, P.E. e Pascoe, P.L. (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom* 73 (4), pp 913-929.
- Dowson P.H., Bubbs, J.M. e Lester, J.N. (1993) Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: five years after 1987 UK retail ban on TBT based antifouling paints, *Marine Pollution Bulletin* 26(9), pp 487-494.
- Evans S.M., Evans, P.M. e Leksono, T. (1996) Widespread recovery of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea, *Marine Pollution Bulletin* 32(3), pp 263-269.
- Evans S.M., Hawkins, S.T., Porter, J. e Samosir, A.M. (1994) Recovery of dogwhelk populations on the Isle of Cumbrae, Scotland following legislation limiting the use of TBT as antifoulant, *Marine Pollution Bulletin* 28(1), pp 15-17.
- His E. e Robert, R. (1987) Comparative effects of two antifouling paints on the oyster *Crassostrea gigas*, *Marine Pollution* 95, pp 83-86.
- Key D., Nunny, R.S., Davidson, P.E. e Leonard, M.A. (1976) *Abnormal shell growth in the Pacific oyster (Crassostrea gigas): Some preliminary results from experiments undertaken in 1975.* ICES/ CM.1976/K pp 11.
- Langston W.J., Burt, G.R. e Mingjiang, Z. (1987) Tin and organotin in water, sediments and benthic organisms of Poole Harbour, *Marine Pollution Bulletin* 18, pp 634-639.
- Loureiro J., Nunes, N. e Botelho, O.F. (1986a) *Bacia Hidrográfica do Rio Sado*, in: M.P.A.T./ S.E.A.R.N. / D.G.R.A.H. (ed). *Monografias Hidrológicas dos Principais Cursos de Água de Portugal Continental*, Divisão de Hidrometria, Lisboa, pp. 409-464.
- Loureiro J., Nunes, N. e Botelho, O.F. (1986b) *Bacia Hidrográfica do Rio Mira*, in: M.P.A.T./ S.E.A.R.N. / D.G.R.A.H. (ed). *Monografias Hidrológicas dos Principais Cursos de Água de Portugal Continental*, Divisão de Hidrometria, Lisboa, pp. 465-499.

- Minchin D., Oehlmann, J., Duggn, C.B., Stroben, E. e Keatinge, M. (1995) Marine TBT antifouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. *Marine Pollution Bulletin* 18, pp 634-639.
- Pessoa M.F. (1999) *Imposex em Hinia reticulata (L.) (Gastropoda)- Um Contributo para a Biomonitorização dos Níveis de Estanho e Derivados Orgânicos no Litoral Sudoeste Português*. PhD Thesis, FCT/ UNL, pp. 508.
- Pessoa M.F., Rosa, A. e Oliveira, J.S. (2000) *Crassostrea angulata*. *Lam na Monitorização de Compostos Organoestanosos a partir de Índices de Espessamento da Concha-Resultados Preliminares*, in: Soares de Carvalho G., Veloso Gomes F.; Taveira Pinto F. (Eds) *Os Estuários de Portugal e os Planos de Bacia Hidrográfica*, Lisboa, Associação EUROCOAST-PORTUGAL, pp 45-52.
- Phelps H.L. e Page, D.S. (1997) Tributyltin biomonitoring in Portuguese estuaries with the portuguese oyster (*C. angulata*), *Env. Tech.* 18 (12), pp 1269-1276.
- Rothschild B.J., Ault, J.S., Goulletquer, P. e Heral, M. (1994) Decline of the Chesapeake Bay oyster population: a century of habitat destruction and overfishing, *Marine Ecology Progress Series* 111, pp 29-39.
- Tester M. e Ellis, D. (1995) TBT controls and recovery of whelks from imposex, *Marine Pollution Bulletin* 30(1), pp 90-91.
- Thain J.E., Waldock, M.J. e Waite, M.E. (1987) Toxicity and degradation studies of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the aquatic environment, in: *Proceedings of the Organotin Symposium, Ocean's 87 Conference, Halifax, Canada, 28th September – 1st October 4*, pp 1398-1404.