

# ZONAS DE BAIXA SALINIDADE E ÍNDICES BIÓTICOS: DNA BARCODING - UMA NOVA FERRAMENTA DE MONITORIZAÇÃO OU UMA FERRAMENTA COMPLEMENTAR?

**João Paulo Medeiros<sup>\*</sup>, Paula Chainho<sup>\*</sup>, José Lino Costa<sup>\*,\*\*</sup>, Carla Azeda<sup>\*</sup>, Erica Sá<sup>\*</sup>, Gilda Silva<sup>\*</sup>, Maria Luisa Chaves<sup>\*</sup>, João Carlos Marques<sup>\*\*\*</sup>, Eric D. Stein<sup>\*\*\*\*</sup>, Blythe Layton<sup>\*\*\*\*</sup>, Stephen B. Weisberg<sup>\*\*\*\*</sup>, Maria José Costa<sup>\*,\*\*</sup>**

<sup>\*</sup> Centro de Oceanografia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal (jpmedeiros@fc.ul.pt)

<sup>\*\*</sup> Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>\*\*\*</sup> IMAR – Instituto do Mar, Centro do Mar e Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

<sup>\*\*\*\*</sup> Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa, 3535 Harbor Blvd., Suite 110, CA 92626, United States of America

## Resumo

No presente estudo, os resultados foram obtidos com base na identificação morfológica dos organismos bentónicos e na combinação dos índices bióticos AMBI e IBMWP. A área de estudo centrou-se na zona de transição dulçaquícola-oligohalino do estuário do Rio Mira, para a qual foram calculadas diversas métricas desenvolvidas para sistemas dulçaquícolas e marinhos, com o intuito de avaliar a condição das comunidades bentónicas. Uma modificação de ambos os índices foi proposta. Os resultados mostraram que o índice IBMWP pareceu subestimar o estado ecológico destas comunidades, devido à diversidade naturalmente baixa nesta área. Mas qual será, na realidade, a verdadeira diversidade neste ecossistema que limitou o desempenho deste índice? A solução poderá passar por uma nova abordagem – DNA barcoding – que contribuirá certamente para uma maior resolução taxonómica com repercussões positivas no desempenho do índice IBMWP, bem como de outros que possam eventualmente ser adaptados e aplicados a estas áreas.

**Palavras-chave:** Índices bióticos, zonas de baixa salinidade, macroinvertebrados bentónicos, DNA barcoding, Rio Mira

## 1. Introdução

Várias ferramentas, *i.e.* índices bióticos, baseados em macroinvertebrados bentónicos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar o nível de qualidade ecológica (EcoQS) dos sistemas aquáticos. No entanto, as condições de referência e os limites dos rácios de qualidade ecológica (EQR) permanecem um problema, face à carência de dados históricos e estudos paleontológicos para a maioria dos sistemas aquáticos (Chainho *et al.*, 2007) e, em particular, para as zonas de baixa salinidade. Nas zonas de transição dulçaquícola-oligohalino são definidos mais do que um ecótono (Medeiros *et al.*, 2012), pelo que a avaliação do nível de qualidade ecológica (EcoQS) desta zona obriga à definição de condições de referência e limites dos EQR específicos para cada ecótono (Muxika *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008). Tal como referido por Dauvin *et al.* (2009), e de acordo com a DQA, as zonas de baixa salinidade (*e.g.* até ao limite superior de influência da maré) podem ser incluídas no processo de avaliação da qualidade ecológica. No entanto, o uso de índices bióticos e indicadores desenvolvidos para as zonas costeiras e zonas inferiores dos estuários, constitui um problema e a sua adaptação é, muitas vezes, impossível. Por outro lado, o desenvolvimento de um novo índice biótico é uma tarefa difícil e constitui um grande desafio. Diaz *et al.* (2004) sugerem a utilização e respetiva adaptação das ferramentas até então disponíveis para os sistemas dulçaquícolas e marinhos. No entanto, a seleção de diferentes índices bióticos pode resultar em diferentes classificações dos EcoQS (Borja *et al.*, 2007).

As zonas de transição dulçaquícola-oligohalino são caracterizadas por uma baixa diversidade natural, devido ao *stress* natural (Teixeira et al., 2008), onde as mudanças espaço-temporais são pronunciadas, promovendo variações consideráveis na composição e diversidade das comunidades bentónicas. Assim e apesar da baixa diversidade natural, coloca-se a questão de qual será, na realidade, a sua composição específica e como varia a diversidade das espécies ao longo do espaço e do tempo? Como é que os vários níveis de classificação taxonómica poderão levar à obtenção de diferentes respostas face a tipos e graus de contaminação específicos? (Cortelezzi et al., 2011). De acordo com Verdonchot (2006), o uso de níveis taxonómicos superiores (*e.g.* Ordem, Família) no processo de avaliação da qualidade ecológica pode produzir resultados enviesados. A identificação com base nas características morfológicas pode camuflar o verdadeiro EcoQS de um ecossistema, uma vez que as espécies fornecem perspectivas distintas sobre a qualidade do meio aquático e condições do habitat (Pilgrim et al., 2011). Deste modo, a abordagem morfológica tradicional associada ao pouco conhecimento da fauna local dificulta a execução de programas de monitorização ambiental (Hajibabaei et al., 2011) e limita a adaptação das ferramentas na avaliação do EcoQS dos ecossistemas aquáticos. O novo desafio requer uma mudança considerável nas técnicas de monitorização e avaliação da qualidade ecológica, impulsionado pela necessidade de desenvolver novas ferramentas que conduzirão a resultados mais rápidos e precisos (Baird & Hajibabaei, 2012). Métodos moleculares (*e.g.* DNA barcoding) têm emergido como ferramentas de identificação dos organismos e, mais recentemente, nos programas de monitorização ambiental (Stein et al., 2013). Análises baseadas nas sequências do DNA têm fornecido respostas que ainda não tinham, até então, sido obtidas com base nas abordagens tradicionais (Hajibabaei et al., 2012). Os métodos moleculares permitem ainda uma redução dos custos e do tempo necessários ao processo de avaliação da qualidade ecológica, contribuindo para uma maior compreensão da estrutura da comunidade, nível de tolerância das espécies e para uma bioavaliação eficaz (Baird & Sweeney, 2011).

Os principais objetivos do presente estudo foram: (1) testar a eficiência de diferentes métricas na avaliação do nível de qualidade ecológica da zona de transição dulçaquícola-oligohalino do estuário do Rio Mira com base numa abordagem tradicional e, (2) perante os resultados obtidos em (1), dar a conhecer qual poderá ser o próximo passo que poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas que permitam avaliar o EcoQS destes ecossistemas.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Área de estudo**

O estuário do Rio Mira é um sistema de transição mesotidal, homogéneo e com um fluxo de água condicionado pelas estações do ano (Bettencourt et al., 2004), de pequena dimensão que apresenta um formato alongado e entrincheirado, localizado na costa sudoeste de Portugal (Fig. 1). De acordo com Andrade et al. (1991), a influência das marés faz-se sentir a mais de 40 km da foz, possui um caudal médio anual de  $10 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  (Ferreira et al., 2003), variando entre 0 e  $500 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  (Blanton et al., 2000). É um estuário pouco perturbado quando comparado a outros sistemas de transição semelhantes, sujeitos a uma maior pressão antropogénica (Bettencourt et al., 2004). Na zona superior do estuário do Rio Mira, as principais pressões antropogénicas estão relacionadas com o enriquecimento de nutrientes e matéria orgânica, devido à agropecuária e à descarga de águas residuais (Chainho et al., 2008).

## 2.2. Metodologia

Foram estabelecidos dois grupos de estações de amostragem: Zona Dulçaquícola (estações D1, D2 e D3) e Zona Salobra (estações S1, S2, S3 e S4) (Fig. 1), localizados ao longo do gradiente salino, abrangendo a zona dulçaquícola, com salinidade mediana anual inferior a 0,5 e a zona salobra (*i.e.* oligohalino), com salinidade mediana anual igual ou superior a 0,5. Foram realizadas campanhas sazonais em 2006 e 2007, utilizando uma draga van Veen (0,05 m<sup>2</sup>). Em cada estação de amostragem foram recolhidos 3 replicados na zona subtidal. As amostras foram lavadas *in loco* e fixadas com uma solução de formaldeído a 4% tamponada com borato de sódio e corada com rosa de Bengala, para posterior processamento laboratorial. Os espécimes retidos foram, posteriormente, conservados em álcool a 70%, triados, identificados morfológicamente ao menor nível taxonómico possível e contados. Foram ainda medidas a percentagem de oxigénio dissolvido (% OD) e a salinidade, e recolhidas amostras de água para a determinação de nitratos, nitritos, amónia e fosfatos (mg.l<sup>-1</sup>) (APHA, 1995), e sedimento para a análise granulométrica e respetivo teor em matéria orgânica total (MOT).

## 2.3. Análise de dados

### 2.3.1. Condição físico-química

As variáveis físico-químicas (% OD; azoto dissolvido total – DIN,  $\mu\text{mol N.l}^{-1}$ ; fósforo inorgânico total – DIP,  $\mu\text{mol N.l}^{-1}$ ; matéria orgânica total – MOT, %) foram utilizadas para definir as condições de referência (Weisberg *et al.*, 1997). Critérios já desenvolvidos e aplicados em outros sistemas de transição foram adotados, por ainda não terem sido desenvolvidos para os sistemas aquáticos portugueses (Tabela 1).

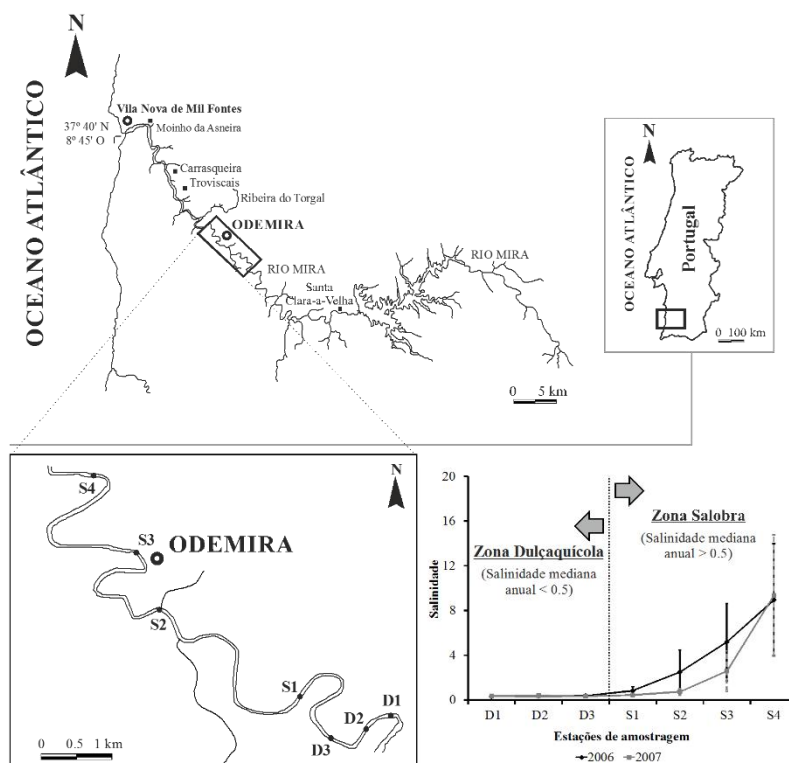


Fig. 1. Área de estudo com a localização das estações de amostragem. O gradiente salino (valores medianos e erro padrão por estação de amostragem em 2006 e 2007) encontra-se representado no gráfico.

### 2.3.2. Condição das comunidades bentônicas

A avaliação da condição das comunidades bentônicas na área de estudo foi efetuada, utilizando as métricas: riqueza taxonômica (Legendre & Legendre, 1988), índices de diversidade de Shannon–Wiener ( $H'$ ) ( $\log_2$ ) (Shannon & Weaver, 1963) e Margalef ( $d$ ) ( $\log_e$ ) (Margalef, 1969), AMBI (AZTI Índice Biótico Marinho) (Borja *et al.*, 2000), IBMWP (Iberian Biological Monitoring Working Party) (Alba-Tercedor & Sánchez-Ortega, 1988) e IASPT (Iberian Average Score per Taxa) (Alba-Tercedor & Sánchez-Ortega, 1988) (Tabela 1). As versões modificadas dos índices AMBI, IBMWP e IASPT (AMBIM, IBMWPM e IASTPM, respetivamente) foram calculadas com base na equivalência dos níveis de tolerância do índice congénere. A existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as zonas dulçaquícola e salobra e as épocas de amostragem, foram verificadas, recorrendo à análise fatorial e aos testes post-hoc HSD de Tukey (IBM SPSS 19.0).

**Tabela 1.** Critérios utilizados para classificar o estado químico com base na percentagem de oxigénio dissolvido (OD), concentração de nutrientes (DIN e DIP) e % MOT e limites dos índices de diversidade e bióticos. “H” significa EcoQS ELEVADO; “G” EcoQS significa BOM; “M” significa EcoQS MODERADO; “P” significa EcoQS POBRE; “B” significa EcoQS MAU.

EcoQS	OD (%) <sup>a</sup>		DIN ( $\mu\text{mol N.l}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	DIP ( $\mu\text{mol P-PO}_4^{3-}\text{l}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	TOM (%) <sup>d</sup>	$H'$ <sup>e</sup>	$d$ <sup>f</sup>	$S'$ <sup>e</sup>	AMBI <sup>e</sup>	IBMWP <sup>g</sup>	IASPT <sup>h</sup>
	Dulçaq.	Salobra									
G/H	> 80,2	> 82,1	< 7,1	< 0,7	< 5	> 3,6	> 4,0	> 45	0,0 - 3,3	> 60	> 6,0
M	40,2 - 80,2	42,1 - 82,1	7,1 - 71,4	0,7 - 0,9	5 - 10	2,5 - 3,6	2,5 - 4,0	30 - 45	3,4 - 4,2	35 - 60	5,0 - 6,0
B/P	< 40,2	< 42,1	> 71,4	> 0,9	> 10	< 2,5	< 2,5	< 30	4,3 - 7,0	< 35	< 5,0

<sup>a</sup> Bald *et al.* (2005); <sup>b</sup> Bricker *et al.* (2003); <sup>c</sup> OSPAR (2003); <sup>d</sup> Hily (1984); <sup>e</sup> Borja *et al.* (2003); <sup>f</sup> Bettencourt *et al.* (2004); <sup>g</sup> Alba-Tercedor & Sánchez-Ortega (1988) & Jáimez-Cuéllar *et al.* (2002); <sup>h</sup> Mandaville (2002).

### 2.3.3. Condição físico-química vs condição das comunidades bentônicas

Correlações de Pearson foram realizadas entre as variáveis ambientais (OD, DIN, DIP e MOT) e as métricas utilizadas na avaliação da condição das comunidades bentônicas, quer para as estações da zona dulçaquícola e salobra (global), quer para as estações de amostragem *per si*.

## 3. Resultados

### 3.1. Condição físico-química

Na zona dulçaquícola, os níveis de OD mantiveram-se sempre elevados (>80%) no Inverno e apenas na Primavera na zona salobra (EcoQS BOM/ELEVADO) (Fig. 2A). Nas restantes épocas, os níveis de OD apresentaram-se sempre inferiores a 80% em ambas as zonas (EcoQS MODERADO). Os valores de DIN variaram quase sempre entre 7,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  e 71,0  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (EcoQS MODERADO), à exceção da Primavera e do Verão na zona dulçaquícola (EcoQS BOM/ELEVADO) (Fig. 2B). A concentração de DIP registou valores sempre inferiores a 0,7  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na zona dulçaquícola (EcoQS BOM/ELEVADO); na zona salobra, os mesmos valores foram registados, à exceção do Inverno, onde a concentração de DIP esteve no limiar dos 0,7  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Fig. 2C). Finalmente, os teores de MOT foram sempre superiores na zona

salobra (EcoQS MODERADO), comparativamente à zona dulçaquícola (Fig. 2D) (EcoQS BOM/ELEVADO, à exceção do Outono, EcoQS MODERADO).

### 3.2. Condição das comunidades bentónicas

Mais de 90% dos espécimes que ocorreram na zona dulçaquícola foram classificados com base no respetivo nível de tolerância por ambos os índices (AMBI e IBMWP). No entanto, e para o primeiro índice, esta percentagem correspondeu a não mais do que 60,0% do total dos *taxa* capturados (Fig. 3A-B) e a cerca de 77,0% no caso do IBMWP (Fig. 3B). Na zona salobra, praticamente todos os espécimes foram classificados pelo AMBI, o que correspondeu a cerca de 87,6% dos *taxa* (Fig. 3B). Por outro lado, apenas 53,6% dos espécimes foram classificados pelo IBMWP, correspondendo apenas a cerca de 30,1% dos *taxa* (Fig. 3B). A modificação proposta aos índices AMBI e IBMWP reduziu, consideravelmente, o número de espécimes e de *taxa*, até então não classificados (Fig. 3C-D).

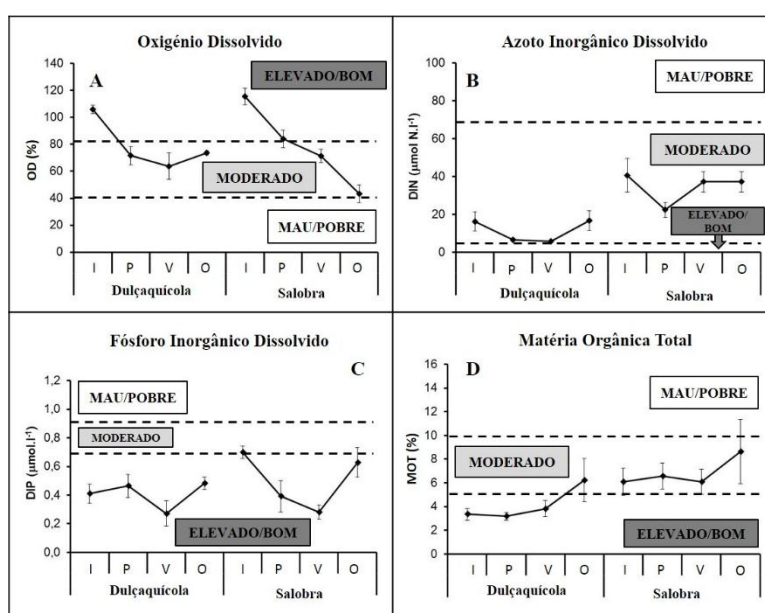
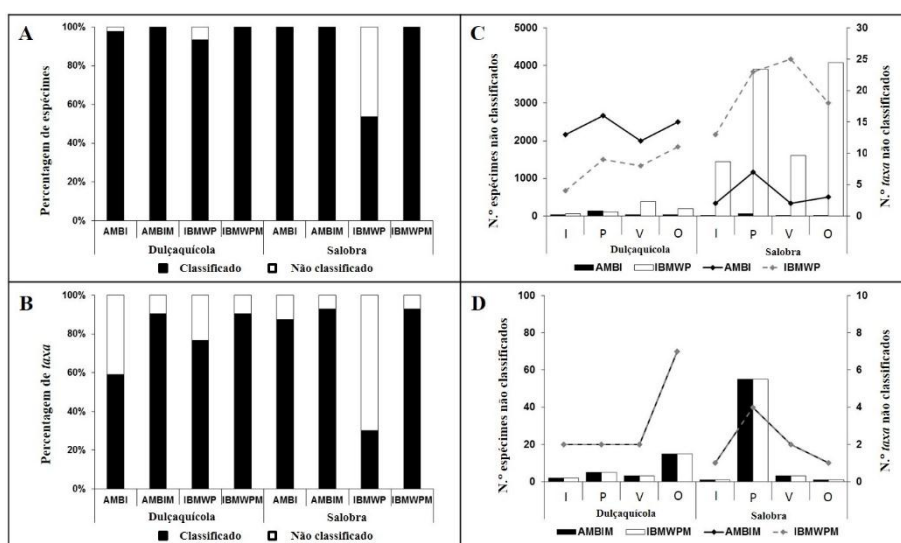


Fig. 2. Nível de qualidade ecológica (EcoQS) nas zonas dulçaquícola e salobra com base nos elementos físico-químicos (valores médios  $\pm$  erro-padrão). I: Inverno; P: Primavera; V: Verão; O: Outono.



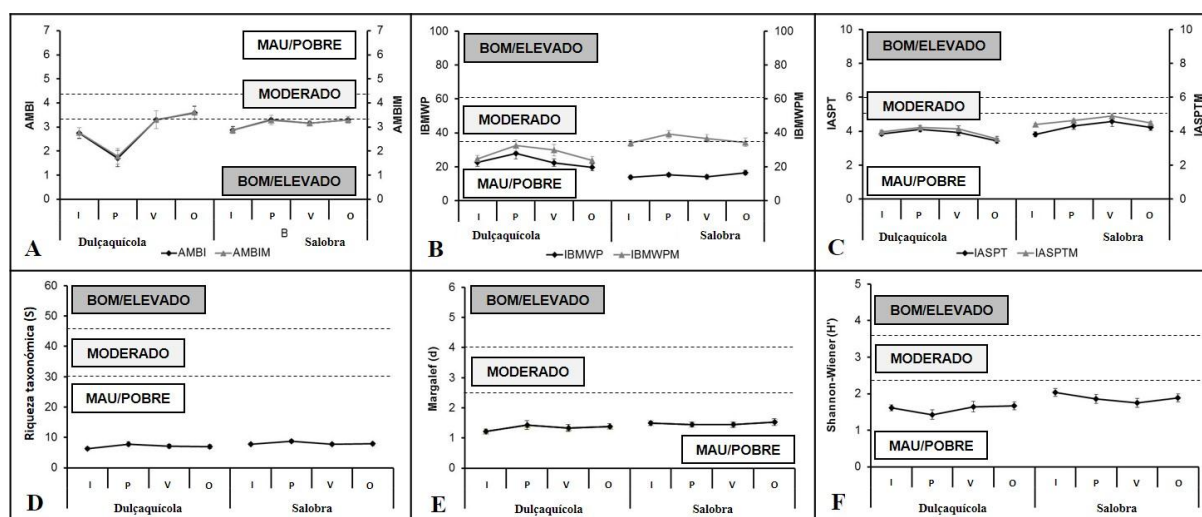
**Fig. 3.** Percentagem de espécimes (A) e *taxa* (B) classificados e não classificados de acordo com o respetivo nível de tolerância atribuído pelo AMBI, AMBIM, IBMWP e IBMWPM. (C) Número de espécimes e *taxa* não classificados pelo AMBI e IBMWP. (D) Número de espécimes e *taxa* não classificados pelo AMBIM e IBMWPM. I: Inverno; P: Primavera; V: Verão; O: Outono.

A análise fatorial revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas para todas as métricas testadas entre as zonas dulçaquícola e salobra, à exceção do IASPT (Tabela 2). A época de amostragem teve um efeito significativo nos resultados do AMBI, AMBIM, IBMWPM e IASPTM. Finalmente, o efeito da época do ano sobre as zonas dulçaquícola e salobra refletiu-se apenas no AMBI e AMBIM, como sugere a interação significativa entre os dois fatores (Tabela 2). Ambas as zonas foram, geralmente, classificadas pelo AMBI com um EcoQS BOM/ELEVADO; no entanto, a modificação proposta para este índice não contribuiu para um aumento do EcoQS (Fig. 4A). Por outro lado, ambas as zonas foram classificadas como MAU/POBRE pelo índice IBMWP. A versão modificada deste último (*i.e.* IBMWPM) refletiu um aumento do EcoQS, particularmente, na zona salobra (Fig. 4B). Apesar da relação direta do IASPT com o IBMWP, a versão modificada deste último praticamente não afetou o EcoQS atribuído pelo primeiro (Fig. 4C). No que diz respeito à riqueza taxonómica e aos índices de diversidade de Shannon-Wiener e Margalef, o EcoQS não foi para além do MAU/POBRE (Fig. 4D-F).

**Tabela 2.** Efeitos significativos (análise fatorial) dos principais fatores (zona e época de amostragem) sobre as métricas S, H', d, AMBI, AMBIM, IBMWP, IBMWPM, IASPT, IASPTM. Zona: dulçaquícola e salobra; Época: Inverno, Primavera, Verão e Outono.

Métricas	Fatores			Métricas	Fatores		
	Zona	Época	Zona×Época		Zona	Época	Zona×Época
S	$F_{(1,156)}=6,532^*$	$F_{(3,156)}=1,309$	$F_{(3,156)}=0,265$	IBMWP	$F_{(1,156)}=28,815^{***}$	$F_{(3,156)}=0,989$	$F_{(3,156)}=1,370$
H'	$F_{(1,156)}=10,302^*$	$F_{(3,156)}=1,180$	$F_{(3,156)}=0,787$	IBMWPM	$F_{(1,156)}=26,847^{***}$	$F_{(3,156)}=2,877^*$	$F_{(3,156)}=0,229$
d	$F_{(1,156)}=47,378^*$	$F_{(3,156)}=0,353$	$F_{(3,156)}=0,512$	IASPT	$F_{(1,156)}=3,447$	$F_{(3,156)}=1,187$	$F_{(3,156)}=1,120$
AMBI	$F_{(1,156)}=10,909^{***}$	$F_{(3,156)}=8,748^{***}$	$F_{(3,156)}=9,126^{***}$	IASPTM	$F_{(1,156)}=60,884^{***}$	$F_{(3,156)}=6,917^{***}$	$F_{(3,156)}=2,567$
AMBIM	$F_{(1,156)}=9,447^{**}$	$F_{(3,156)}=8,007^{***}$	$F_{(3,156)}=8,205^{***}$				

\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$



**Fig. 4.** Níveis de qualidade ecológica (EcoQS) nas zonas dulçaquícola e salobra, baseados nas comunidades bentónicas. I: Inverno; P: Primavera; V: Verão; O: Outono.

### 3.3. Condição físico-química vs condição das comunidades bentónicas

O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) evidenciou uma correlação positiva entre o AMBI e a respetiva versão modificada com os teores de MOT e a concentração de DIN (Tabela 3). Por outro lado, o índice IBMWP mostrou-se negativamente correlacionado com estas variáveis. Uma correlação negativa também foi verificada entre o IASPT e a MOT, mas apenas na zona dulçaquícola. Ainda nesta zona, a riqueza e o índice de diversidade de Margalef mostraram-se positivamente correlacionados com a concentração de DIP. Não foram verificadas quaisquer correlações entre as métricas estudadas e os níveis de OD.

**Tabela 3. Correlações significativas (coeficiente de correlação de Pearson) entre as métricas estudadas e as variáveis ambientais para a área de estudo (Global) e zonas dulçaquícola e salobra. (+) indica uma correlação positiva e (-) indica uma correlação negativa.**

Parâmetros ambientais		Métricas						
		AMBI	AMBIM	IBMWP	IBMWPM	IASPT	S	d
Global	MOT	0,433 <sup>(+++)</sup>	0,429 <sup>(+++)</sup>	0,423 <sup>(---)</sup>	-	-	-	-
	DIN	0,378 <sup>(++)</sup>	0,360 <sup>(++)</sup>	0,499 <sup>(---)</sup>	-	-	-	-
Zona Dulçaquícola	MOT	0,415 <sup>(+)</sup>	0,413 <sup>(+)</sup>	-	-	0,418 <sup>(-)</sup>	-	-
	DIP	-	-	-	-	-	0,497 <sup>(+)</sup>	0,507 <sup>(+)</sup>
Zona Salobra	MOT	0,483 <sup>(++)</sup>	0,480 <sup>(++)</sup>	0,381 <sup>(-)</sup>	-	-	-	-
	DIN	-	-	-	0,419 <sup>(-)</sup>	-	-	-
	DIP	-	-	-	0,409 <sup>(-)</sup>	-	-	-

<sup>(+)</sup> ou <sup>(-)</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>(++)</sup> ou <sup>(--)</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>(+++)</sup> ou <sup>(---)</sup>  $p < 0,001$

## 4. Discussão

As características naturais desta zona de transição (*e.g.* baixa salinidade, diversidade reduzida) pode induzir a erros de classificação do EcoQS. Os resultados do presente estudo corroboram o facto dos índices AMBI e IBMWP serem bons indicadores do *input* de matéria orgânica e do enriquecimento em nutrientes, dada a sua previsível resposta a essas pressões, tal como indicado pelas correlações de Pearson. Apesar dos níveis de pressão antropogénica indicarem que esta zona de transição possui um EcoQS MODERADO, os resultados do AMBI atribuíram a ambos os ecótonos um EcoQS BOM/ELEVADO, enquanto o IBMWP classificou-os como MAU/POBRE. Ainda que conhecida a elevada aplicabilidade do AMBI nos sistemas marinhos e de transição, alguns autores (*e.g.* Borja & Muxika, 2005; Borja *et al.*, 2007) referem limitações à sua aplicação nas zonas de baixa salinidade. Chainho *et al.* (2008) verificou que o AMBI parece sobrestimar a condição das comunidades bentónicas, devido à dominância das espécies tolerantes. Por outro lado, o IBMWP tende a subestimar o EcoQS, razão aparentemente relacionada com a baixa diversidade que existe, naturalmente, nesta área, e também com o facto dos organismos serem identificados ao nível taxonómico da família, omitindo a verdadeira diversidade existente. A modificação proposta ao índice IBMWP (*i.e.* IBMWPM) incrementou os valores de EcoQS, aproximando-os dos indicados pelas variáveis ambientais (EcoQS MODERADO). Além disso, embora se tenha verificado que o IBMWPM não respondeu previsivelmente aos teores de matéria orgânica observados, este mostrou uma correlação negativa com o enriquecimento de nutrientes, na zona salobra, sugerindo que a atribuição de uma classificação à tolerância dos organismos não incluídos no índice IBMWP, favoreceu o seu desempenho.

## 5. Perspetivas futuras

### 5.1. DNA Barcoding - uma nova abordagem

Com o propósito de colmatar parte das lacunas existentes no conhecimento das zonas de baixa salinidade dos sistemas estuarinos e, com base nos resultados obtidos pelo trabalho previamente exposto, pretende-se com o projeto intitulado *Definition of reference conditions and adaptation of assessment tools for freshwater-estuarine interface of an estuarine water type: The Mira River estuary (southwest Portugal) as a case study* [BD (SFRH/BD/77539/2011)] contribuir para um conhecimento mais aprofundado destas áreas, quer em termos físicos e químicos, quer em termos biológicos e, adaptando ferramentas pré-existentes ou desenvolvendo uma nova ferramenta, avaliar o respetivo nível de qualidade ecológica e estabelecer as condições de referência e limites dos EQR necessários ao processo de avaliação do EcoQS.

### 5.2. Metodologia

A área de estudo foi ampliada comparativamente à descrita em 2.2. e Fig. 1, por forma a abranger mais estações de amostragem da zona dulçaquícola e extensível a um dos tributários mais importantes do Rio Mira (Fig. 5). A campanha de amostragem foi realizada em Setembro de 2013. Como previamente referido, a existência de dois ecótonos com características físicas diferentes, conduziu à adoção de técnicas de amostragem específicas. Em cada estação de amostragem foram recolhidos três replicados (Mac-surber, 0,05 m<sup>2</sup>, na zona dulçaquícola, com profundidades baixas e sedimento grosseiro – estações Mi0 a Mi04 e TRG4 e TRG5; draga van Veen, 0,05 m<sup>2</sup>, na zona salobra, com profundidades mais elevadas e sedimento mais fino – estações Mi3 a Mi10 e TRG1 a TRG3) e combinados, originando uma amostra composta. As amostras foram lavadas *in loco* e preservadas em álcool a 95% (3:1). No laboratório, o álcool foi renovado e adicionada glicerina (5% do volume), conservando-se as amostras de sedimento num local escuro e fresco até ao seu processamento (Stein et al., 2013). Os espécimes foram posteriormente triados e identificados morfológicamente. A identificação dos espécimes com recurso à metodologia do DNA barcoding reúne uma série de passos *i.e.* extração, amplificação e sequenciação do DNA, executados de acordo com os protocolos disponibilizados pelo Centro Canadense de DNA Barcoding (CCDB). Como o trabalho ainda se encontra em execução, as sequências de DNA de cada espécime serão analisadas com base em programas (*e.g.* Sequencher, Bioedit) e bases de dados *online* (Genbank, BOLDSystems). Finalmente, os resultados obtidos (identificação morfológica e análise genética) serão integrados nas métricas disponíveis para a avaliação do estado de qualidade ecológica dos sistemas de transição em Portugal (*e.g.* BAT, Benthic Assessment Tool) (Teixeira *et al.*, 2009). Foram ainda medidas, aquando da amostragem, variáveis ambientais na coluna de água junto ao sedimento (% OD e salinidade) e recolhidas amostras de água para a determinação de nitratos, nitritos, amónia e fosfatos (mg.l<sup>-1</sup>) (APHA, 1995), e sedimento para a análise granulométrica e respetivo teor em matéria orgânica total (MOT). O processamento dos dados proporcionarão a definição das condições de referência e limites dos EQR. Os resultados obtidos serão publicados na tese de doutoramento que constituirá o *output* do projeto enunciado em 5.1.



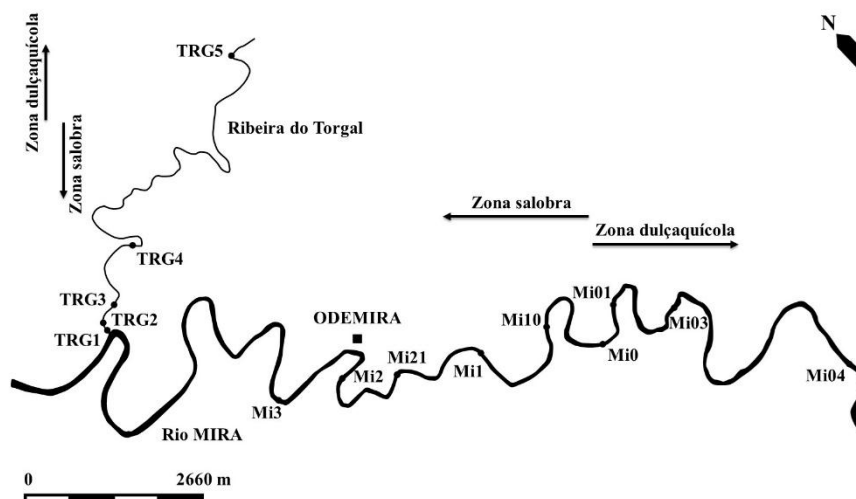


Fig. 5. Área de estudo com a localização das estações de amostragem.

## Agradecimentos

CO-FCUL e FCT. Projetos FCT: EFICAS (POCI/MAR/61324/2004), INSPECT (PTDC/MAR/73579/2006); 3M-RECITAL (LTER/BIABEC/0019/2009); BD (SFRH/BD/77539/2011).

## Referências bibliográficas

Alba-Tercedor, J. e A. Sánchez-Ortega (1988): "Un método rápido y simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hellawell (1978)." *Limnetica*, vol. 4, 51–56.

Andrade, F., M. Reis e P. Duarte (1991): "The Dynamics of the tyde excursion in the Mira estuary (Vila Nova de Milfontes, Portugal). A langragian approach." pp. 49-55. *In* Elliott, M. e J.P. Ducrotoy (eds). "Estuaries and Coasts. Spatial and temporal intercomparisons." Olsen & Olsen, Fredensborg, Dinamarca.

APHA (1995): "Standard methods for the examination of water and wastewater." American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, nineteenth ed., Washington, DC.

Baird, D.J. e B.W. Sweeney (2011). "Applying DNA barcoding in benthology: the state of the science." *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 30, nº. 1, 122-124.

Baird, D.J. e M. Hajibabaei (2012): "Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing." *Molecular Ecology*, vol. 21, 2039-2044.

Bald, J., A. Borja, I. Muxika, J. Franco e V. Valencia (2005): "Assessing reference conditions and physico-chemical status according to the European Water Framework Directive: a case-study from the Basque Country (Northern Spain)." *Marine Pollution Bulletin*, vol. 50, 1508–1522.

Bettencourt, A., S.B. Bricker, J.G. Ferreira, A. Franco, J.C. Marques, J.J. Melo, A. Nobre, L. Ramos, C.S. Reis, F. Salas, M.C. Silva, T. Simas e W. Wolff (2004): “Typology and Reference Conditions for Portuguese Transitional and Coastal Waters (TICOR).” Instituto da Água e Instituto do Mar, Lisboa, Portugal.

Blanton, J.O., M.A. Ferreira e F. Andrade (2000): “Effect of broad shallow sill on tidal circulation and salt transport in the entrance to a coastal plain estuary (Mira – Vila Nova de Milfontes, Portugal).” *Estuaries*, vol. 23, 293–304.

Borja, A. e I. Muxika (2005): “Guidelines for the use of AMBI (AZTI’s Marine Biotic Index) in the assessment of the benthic ecological quality.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 50, 787–789.

Borja, A., A.B. Josefson, A. Miles, I. Muxika, F. Olsford, G. Phillips, J.G. Rodríguez e B. Rygg (2007): “An approach to the intercalibration of benthic ecological status assessment in the North Atlantic ecoregion, according to the European Water Framework Directive.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 55, 42–52.

Borja, A., J. Franco e V. Pérez (2000): “A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 40, 1100–1114.

Bricker, S.B., J.G. Ferreira e T. Simas (2003): “An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status.” *Ecological Modelling*, vol. 169, 39–60.

Chainho, P., J.L. Costa, M.L. Chaves, D.M. Dauer e M.J. Costa (2007): “Influence of seasonal variability in benthic invertebrate community structure on the use of biotic indices to assess the ecological status of a Portuguese estuary.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 54, 1586–1597.

Chainho, P., M.L. Chaves, J.L. Costa, M.J. Costa e D.M. Dauer (2008): “Use of multimetric indices to classify estuaries with different hydromorphological characteristics and different levels of human pressure.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 56, 1128–1137.

Cortezzi, A., L.C. Armendáriz, M.V.L. van Oosterom, R. Cepeda e A.R. Capítulo (2011): “Different levels of taxonomic resolution in bioassessment: a case study of oligochaeta in lowland streams.” *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 23, nº. 4, 412–425.

Dauvin, J-C., G. Bachelet, A-L. Barillé, H. Blanchet, X. de Montaudouin, N. Lavesque e T. Ruellet (2009): “Benthic indicators and index approaches in the three main estuaries along the French Atlantic coast (Seine, Loire and Gironde).” *Marine Ecology*, vol. 30, 228–240.

Diaz, R.J., M. Solan e R.M. Valente (2004): “A review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality.” *Journal of Environmental Management*, vol. 73, 165–181.

Ferreira, J.G., T. Simas, A. Nobre, M.C. Silva, K. Shifferegger e J. Lencart-Silva (2003): “Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems.” In “Application of the United States National Estuarine Eutrophication Assessment

to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa and Guadiana Systems.” Instituto da Água e Instituto do Mar, Lisboa, Portugal.

Hajibabaei, M., J.L. Spall, S. Shokralla e S. van Konynenburg (2012): “Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol”. *BMC Ecology* 12:28.

Hajibabaei, M., S. Shokralla, X. Zhou, G.A.C. Singer e D.J. Baird (2011): “Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos.” *PLoS ONE*, vol. 6, nº. 4: e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497.

Hily, C. (1984): “Variabilité de la Macrofaune Benthique dans les Milieux Hypertrophiques de la Rade de Brest.” Thèse de Doctorat d'État, Université de Bretagne Occidentale, vol. 1, 359 pp., vol. 2, 337 pp.

Jáimez-Cuéllar, P., S. Vivas, N. Bonada, S. Robles, A. Mellado, M. Alvarez, J. Avilés, J. Casas, M. Ortega, I. Pardo, N. Prat, M. Rieradevali, C. Sáinz-Cantero, A. Sánchez-Ortega, M.L. Suárez, M. Toro, M.R. Vidal-Abarca, C. Zamora-Muñoz e J. Alba-Tercedor (2002): “Protocolo Guadalmed (PRECE).” *Limnetica*, vol. 21, 187-204.

Legendre, P. e L. Legendre (1998): “Numerical Ecology”. 2<sup>nd</sup> English Edition. Elsevier.

Mandaville, S.M. (2002): “Benthic Macroinvertebrates in Freshwaters – Taxa Tolerance Values, Metrics, and Protocols.” Project H-1, Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax, Nova Scotia, Canada, xviii, 48 pp., Appendices A–B. 120 pp. total.

Margalef, R. (1969): “Diversity and stability: a practical proposal and a model of independence.” *Brookhaven Symposium in Biology*, Upton, NY, vol. 22, 25–37.

Medeiros, J.P., M.L. Chaves, G. Silva, C. Azeda, J.L. Costa, J.C. Marques, M.J. Costa e P. Chainho (2012): “Benthic condition in low salinity areas of the Mira estuary (Portugal): Lessons learnt from freshwater and marine assessment tools.” *Ecological Indicators*, vol. 19, 79-88.

Muxika, I., A. Borja e J. Bald (2007): “Using historical data, expert judgment and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 55, 16-29.

OSPAR (2003): “OSPAR Integrated Report 2003 on the Eutrophication Status of the OSPAR Maritime Area Based Upon the First Application of the Comprehensive Procedure.” *OSPAR Integrated Report 2003 on the Eutrophication Status*. OSPAR Commission.

Pilgrim, E.M., S.A. Jackson, S. Swenson, I. Turcsanyi, E. Friedman, L. Weigt e M.J. Bagley (2011): “Incorporation of DNA barcoding into a large-scale biomonitoring program: opportunities and pitfalls.” *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 30, nº. 1, 217-231.

Shannon, C.E. e W. Weaver (1963): “The Mathematical Theory of Communication.” University of Illinois Press.

Stein, E.D., B.P. White, R.D. Mazon, P.E. Miller e E.M. Pilgrim (2013): “Evaluating Ethanol-based Sample Preservation to Facilitate Use of DNA Barcoding in Routine Freshwater Biomonitoring Programs Using Benthic Macroinvertebrates.” PLoS ONE, vol. 8, nº. 1: e51273. doi:10.1371/journal.pone.0051273.

Teixeira, H., F. Salas, A. Borja, J.M. Neto e J.C. Marques (2008): “A benthic perspective in assessing the ecological status of estuaries: the case of the Mondego estuary (Portugal).” Ecological Indicators, vol. 8, 404–416.

Teixeira, H., J.M. Neto, J. Patrício, H. Veríssimo, R. Pinto, F. Salas e J.C. Marques (2009): “Quality assessment of benthic macroinvertebrates under the scope of WFD using BAT, the Benthic Assessment Tool.” Marine Pollution Bulletin, vol. 58, 1477–1486.

Verdonschot, P.F.M. (2006): “Beyond masses and blooms: the indicative value of oligochaetes.” Hydrobiologia, vol. 564, 127-142.

Weisberg, S.B., J.A. Ranasinghe, D.M. Dauer, L.C. Schaffner, R.J. Díaz e J.B. Frithsen (1997): “An estuarine benthic index of biotic integrity (B-IBI) for Chesapeake Bay.” Estuaries, vol. 20, 149–158.