



7, 8 e 9
Março 2018
ÉVORA
Évora Hotel

GESTÃO DOS
RECURSOS HÍDRICOS:
**NOVOS
DESAFIOS**

MONITORIZAÇÃO DE MEXILHÃO-ZEBRA EM ALBUFEIRAS DO EFMA

Filipe BANHA¹; Mafalda Gama², Dulce Santos³, Dárcio Sousa⁴, Miguel Mascarenhas⁵, David Catita⁶, Ana Ilhéu⁷, Pedro Anastácio⁸

- 1 Doutor, MARE– Centro de Ciências do Mar e Ambiente, Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, no 59, 7000-671, Évora, e-mail: filipebanha@hotmail.com
- 2 Doutor, MARE– Centro de Ciências do Mar e Ambiente, Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, no 59, 7000-671, Évora, e-mail: mafaldagama@hotmail.com
- 3 Doutor, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal & Plant Cell Technology Laboratory, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2775-412 Oeiras; e-mail: dulcesantos@fmv.ulisboa.pt
- 4 Mestre em Biologia da Conservação, Bioinsight, Rua Antero de Quental, no 52-Loja B, Urbanização Colinas do Cruzeiro, 2675-690 Odivelas, e-mail: darcio.s@bioinsight.pt
- 5 Mestre em *Evaluación de Impacto Ambiental*, Bioinsight, Rua Antero de Quental, no 52-Loja B, Urbanização Colinas do Cruzeiro, 2675-690 Odivelas, e-mail: miguel.m@bioinsight.pt
- 6 Ciências do Ambiente; EDIA, S.A. 7800-522 Beja; dcatita@edia.pt; 284 315 100.
- 7 Mestre em Engenharia Civil; EDIA, S.A. 7800-522 Beja; ailheu@edia.pt; 284 315 100
- 8 Doutor, MARE– Centro de Ciências do Mar e Ambiente, Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, no 59, 7000-671, Évora, e-mail: anast@uevora.pt

Resumo

As invasões biológicas são consideradas a segunda principal ameaça à biodiversidade da Terra, acarretando graves consequências ao nível económico, ecológico e social. Devido à sua rápida reprodução, dispersão e subsequente adaptação ao meio, o controlo de espécies invasoras é frequentemente difícil, sendo a sua erradicação virtualmente impossível em muitas situações. Este problema é particularmente grave nos ecossistemas dulçaquícolas, cuja resiliência se encontra já afetada pela pressão humana. Por exemplo, a construção de estruturas de retenção de água provoca alterações funcionais, alterando as suas características de lóticis para lênticos, colocando em vantagem organismos invasores adaptados a estas condições. Na região mediterrânea, este tipo de estruturas é extremamente importante para o desenvolvimento económico da região, permitindo a promoção da agricultura, o abastecimento público de água e produção elétrica. Um dos últimos grandes empreendimentos implementados na região mediterrânea e na Península Ibérica em concreto diz respeito ao Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva – EFMA. Entre as espécies aquáticas invasoras, com potencial para afetar negativamente o EFMA, salienta-se o mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*). Este é um pequeno bivalve de água doce, com forte capacidade de fixação e desenvolvimento em superfícies lisas, como tubagem de rega, grelhas, turbinas, filtros, bem como todos os componentes de centrais hidroelétricas ou de bombagem.



7, 8 e 9
Março 2018
ÉVORA
Évora Hotel

GESTÃO DOS
RECURSOS HÍDRICOS:
**NOVOS
DESAFIOS**

Esta é uma das piores pragas ecológicas conhecidas e foi detetada pela primeira vez na Península Ibérica, em Espanha, no rio Ebro em 2001, causando prejuízos acima de 13 milhões de euros numa só década. Atualmente encontra-se em plena expansão na Península Ibérica, dispersando-se principalmente devido a atividades humanas como a navegação e pesca desportiva, mas também através de vetores naturais como aves aquáticas. Uma vez que o EFMA, depende, em parte, dos sistemas hídricos partilhados com Espanha, não deve ser subestimada a capacidade de colonização desta zona por parte do mexilhão zebra. O custo associado ao combate deste tipo de pragas é potencialmente elevado, sendo a sua eliminação, após colonização, virtualmente impossível, em especial nas condutas enterradas. O combate a esta espécie, numa fase inicial, pode ser relativamente mais simples comparativamente com a atuação em fases mais avançadas da colonização. Por este facto torna-se fundamental a deteção precoce da espécie. Nesse sentido foram amostrados mensalmente 18 pontos no EFMA, dois deles no Rio Guadiana, 5 no Alqueva e os restantes em albufeiras que recebem águas de Alqueva. Mensalmente nos pontos de amostragem foram obtidos da coluna de água (a 2 e a 5 metros), amostragens de plâncton para deteção de larvas de mexilhão zebra através da filtragem correspondente a 200 L. Para estas duas profundidades também foram analisados os valores das variáveis: temperatura (°C), oxigénio dissolvido (mg/L), condutividade elétrica (mS/cm), pH, turbidez (NTUs) e potencial redox (mV), e cálcio (mg/L). A metodologia implementada para eventual deteção de larvas de mexilhão-zebra das amostragens de água filtrada foi a análise por microscopia de luz polarizada, realizada de forma independente para as amostras dos 2 e dos 5 metros em cada ponto de amostragem e em cada saída. Em cada local de amostragem foi também recolhida água, entre os 2 e os 5 metros de profundidade, para posterior análise da presença de larvas, através da metodologia de PCR. Para esta análise, o DNA de *D. polymorpha* foi usado como controlo positivo da amplificação da subunidade I da Citocromo C Oxidase (COI), usando os *primers* referidos na literatura como sendo específicos para esta espécie de bivalve.

Em cada local de amostragem foram também recolhidos 5L de água, entre os 2 e os 5 metros de profundidade, para análise da presença de ácido desoxirribonucleico (ADN) de mexilhão-zebra através de amplificação por PCR. Em concreto, a análise de ADN de mexilhão-zebra foi efectuada por amplificação específica da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase, seguida de electroforese em gel de agarose, para identificação dos amplicões obtidos através da metodologia de PCR.

Neste trabalho, apresentam-se os resultados da campanha de monitorização efetuada até à data. Para além disto, são discutidas as duas metodologias de deteção de larvas de mexilhão-zebra desenvolvidas neste trabalho e a forma como foram superadas as dificuldades técnicas habitualmente associadas a este tipo de monitorização e que por vezes podem levar a falsos positivos.

Palavras-chave: Invasões biológicas, mexilhão-zebra, deteção, EFMA, Alentejo.

Introdução

O mexilhão-zebra é uma das espécies invasoras mais preocupantes a nível mundial, podendo ser responsável por uma grande quantidade de impactes, económicos, ecológicos ou sanitários. Originária da região do Mares Cáspio e Negro, no final do século XIX começou a expandir-se pela Europa Ocidental (Durán e Anadón, 2008) sendo detetada pela primeira vez em Espanha em 2001 (Durán e Anadón, 2008). A presença do mexilhão-zebra é motivo de grande preocupação, tendo o Governo de Espanha elaborado um conjunto de medidas de combate à espécie num documento de estratégia nacional (Estrategia Nacional para el control del Mejillón Cebra (*Dreissena polymorpha*) en España, edição da Conferencia Sectorial de Medio Ambiente, 2007) com vista à implementação de um plano de controlo.

O mexilhão-zebra (*D. polymorpha*) é um pequeno bivalve nativo de lagos, rios lênticos e áreas de baixa salinidade nas regiões do mar Cáspio e do mar Negro (Durán e Anadón, 2008; Karatayev et al., 1998). A longevidade desta espécie varia, geralmente, entre os 2 e os 5 anos (Effler et al., 1996). Os adultos atingem um tamanho entre 25 e 35 mm, sendo sésseis e gregários. O mexilhão-zebra produz larvas do tipo velígera, que se mantêm no plâncton por algumas semanas (Mackie e Claudi, 2009). O ciclo de vida desta espécie, tanto na fase larvar como nos adultos, está dependente de vários fatores ambientais, incluindo um conjunto de parâmetros físico-químicos, como temperatura, oxigénio dissolvido, pH e condutividade elétrica. A tabela 1 apresenta um conjunto de valores de referência, disponíveis na bibliografia, para cada um destes parâmetros, que podem potenciar o desenvolvimento do mexilhão-zebra.

Considerando os prejuízos económicos associados à invasão de áreas com infraestruturas hidráulicas, como barragens, canais e condutas de rega, surgiu a necessidade de elaboração de um programa de monitorização por parte da EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva, com o objetivo principal da deteção precoce de mexilhão-zebra na área do EFMA através da monitorização regular de locais-chave. Foi ainda recomendada a instalação de meios técnicos para a desinfeção de barcos e equipamentos náuticos, assim como o reforço da informação acerca da espécie e de seus impactos nos Cais de Mourão, Frente de Barragem de Alqueva, Frente de Barragem de Pedrogão, Cais de Monsaraz, Cais de Alqueva, Cais da Amieira e Foz do Ardila - Barca, por estarem situados junto a ancoradouros e/ou cais, permitindo a circulação de barcos, sendo classificados como locais com elevada suscetibilidade de invasão.

O “Projeto de Monitorização de mexilhão-zebra em albufeiras do EFMA (2016/2017)” tem como principais objetivos a avaliação da ocorrência e distribuição potencial de mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*) na zona do Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva – EFMA, de forma a permitir a deteção precoce da entrada desta espécie na área de estudo. De referir que a deteção precoce possibilita o estabelecimento de medidas de controlo adequadas.

Metodologia

Selecionaram-se 18 locais dentro da zona de influência do EFMA, nomeadamente os cais de Amieira, Alqueva, Estrela, Mourão, Monsaraz e de Juromenha; as Albufeiras dos Álamos, do Loureiro, da Amoreira, de Pedrogão - Barca, de Pedrogão-Barragem, de S. Pedro, de Serpa, do Alvito, de Odivelas, do Pisão e do Roxo. Por fim o Rio Guadiana Elvas (Monte da Vinha). Para a monitorização das variáveis físico-químicas da coluna de água, foram obtidos da coluna de água (a 2 e a 5 metros), com recurso a uma sonda multiparâmetros, os valores das variáveis oxigénio dissolvido, temperatura, condutividade, pH.

Foram também recolhidas amostras, com recurso a uma garrafa de Van Dorn, para determinação de cálcio através do método Calmagite. A amostragem de plâncton para deteção de larvas de mexilhão zebra foi realizada a duas profundidades (2 e 5 metros), sendo filtrado através de uma rede de plâncton de 50 μ de malha um volume de 200 litros de água a cada uma das profundidades (Figura). A água foi recolhida através de bombagem, a partir de um cais ou sempre que necessário usando um barco de forma a se obter a amostra à profundidade exata desejada. Após a obtenção dos filtrados de água da rede de plâncton e respetivo acondicionamento em frascos herméticos, procedeu-se à conservação das amostras em etanol a 25%, de forma a preservar as estruturas carbonatadas dos organismos para posterior observação à lupa binocular e observação com microscopia de luz polarizada.



Figura 1 – Recolha de amostra com recurso a garrafa de Van Dorn (esquerda) e recolha de amostra para posteriormente ser filtrada para análise por PCR (direita).

A análise através de microscopia de luz polarizada para deteção de larvas de mexilhão-zebra foi realizada de forma independente para as amostras dos 2 e dos 5 metros em cada ponto de amostragem e em cada saída. Cada amostra proveniente de 200 litros de filtragem através de rede de plâncton foi sub-amostrada 6 vezes para efeitos de deteção, e de contagem (caso fossem detetadas larvas). Para deteção de larvas foram recolhidas subamostras de 25 ml (6x) do centro do frasco, com pipeta e após agitação, colocadas em placas de Petri e observadas ao microscópio sob luz polarizada cruzada (Marsden, 1992). As amostras foram analisadas na sua totalidade, ou seja, foi analisado o volume total recolhido (150 ml). A deteção por microscopia baseia-se no facto de que as larvas de mexilhão-zebra são muito birrefringentes, aparecendo sob luz polarizada cruzada como pontos brilhantes contra um fundo escuro (Johnson, 1995). Para além disso, as partes das conchas alinhadas com os eixos dos filtros não são birrefringentes, o que faz com que as larvas pareçam cruzeiros brilhantes, chamadas Cruzes de Malta. Esta característica é partilhada com ostracodes e larvas de outros bivalves (*Corbicula fluminea*), dos quais podem ser distinguidas morfologicamente.

Na identificação de larvas de mexilhão zebra foram usadas as chaves dicotómicas de Nichols e Black (1994) e de Mackie e Claudi (2009). Foram analisadas previamente coleções de referência de larvas de Mexilhão zebra provenientes do Rio Ebro, (Figura 2) as quais foram também comparadas com organismos que levantaram algumas dúvidas. Para a eficiência do processo de deteção foi importante a experiência prévia da equipa com larvas de mexilhão zebra na zona do rio Ebro em Espanha (ver Banha et al., 2015).

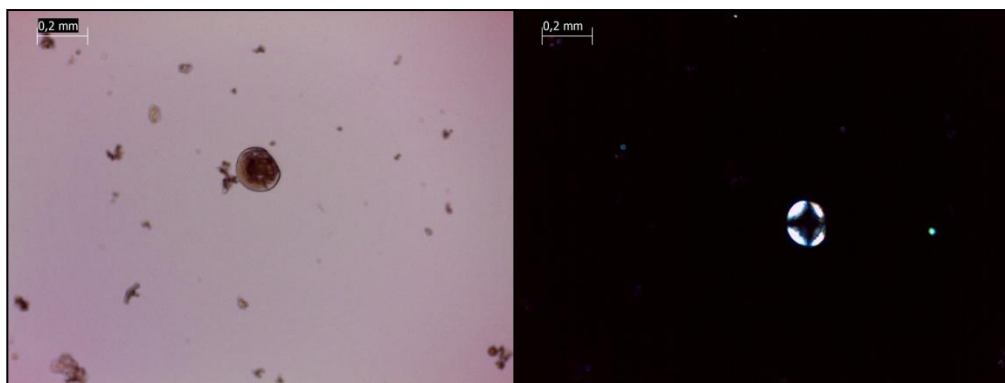


Figura 2 – Larvas de mexilhão-zebra fotografadas por Mafalda Gama, Filipe Banha e Pedro Anastácio, nas instalações da Universidade de Évora e provenientes de uma amostra de referência obtida em 10-10-2016 no rio Ebro, em Espanha. Esquerda – sob luz normal; direita – sob luz polarizada. Ampliação 10x. Na imagem da direita é visível uma larva com a característica forma em D.

Em cada local de amostragem foram também recolhidos 5 litros de água, entre os 2 e os 5 metros de profundidade, para posterior análise da presença de larvas, através da metodologia de PCR. A água recolhida foi filtrada através de malha de 50 μ m e acondicionada em frio, num frasco com etanol a 96%. A cada local de amostragem foi dedicada uma malha de filtração para evitar contaminações cruzadas de material entre amostras. Chegadas ao laboratório, as amostras foram centrifugadas a 4000rpm durante 30 minutos em tubos cónicos de 50ml à temperatura ambiente. Cerca de 14ml do sobrenadante (álcool) foi descartado e o *pellet* (sedimento) resultante da centrifugação de cada amostra foi ressuspenso e transferido para microtubo de 1,5ml e novamente centrifugado a 13000 rpm para o compactar e facilitar retirar o excesso de etanol. Os *pellets* foram deixados a secar à temperatura ambiente para garantir a completa evaporação do etanol antes do processamento para extração de DNA total com o kit PowerSoil® DNA Isolation (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Procedeu-se também à extração de DNA total de amostras de adulto de *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea* e *Unio spp.* preservados em etanol absoluto. Para este efeito usou-se o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e os DNAs assim obtidos foram também analisados com o espectrofotómetro de UV-Visível Nanodrop 2000C (ThermoFisher Scientific). De forma a testar se os DNAs extraídos a partir dos sedimentos obtidos em cada um dos pontos de amostragem apresentam boa qualidade para se proceder às reações de PCR, procedeu-se em primeiro a uma reação de amplificação com os *primers* universais LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994), seguida de eletroforese em gel de agarose a 1% em 1xTAE (Tris-Acetato-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), com o corante GreenSafe Premium (Nzytech) para visualização dos produtos de amplificação sob luz ultravioleta (UV). A análise da presença ou ausência de DNA de *D. polymorpha* nas amostras recolhidas foi feita através da reação de amplificação por PCR da subunidade I da Citocromo C Oxidase (COI), usando os *primers* DpCOI-F (5'-TGTCACCACTCATGGGCTTGTT-3') e DpCOI-R (5'-TGCAGAACAAAGGGACCCGGTAAA-3'), que produzem um amplicão de 386 nucleótidos, único e específico para a espécie *D. polymorpha* nas condições de reação descritas por Keele et al. (2013), Keele et al. (2014) e Rochelle et al. (2009).

Resultados e Discussão

Neste estudo foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos e químicos: Temperatura, Oxigénio dissolvido, Condutividade elétrica, pH, Turbidez, Potencial redox e Cálcio a duas profundidades (2 e 5m) (Tabela 1). No que respeita ao cálcio, é importante referir que este desempenha um importante papel no desenvolvimento das larvas de mexilhão-zebra, participando ainda numa série de outros processos fisiológicos. Segundo Sprung (1987) a concentração de cálcio deixa de ser um fator limitante a concentrações superiores a 50 mg/L. Neste período o valor mínimo observado foi de 17 a 2 metros de profundidade e valor máximo de 113 a 2 metros de profundidade. Relativamente à turbidez, não existe na literatura um limite de tolerância a esta variável por parte do mexilhão-zebra. No entanto, Summers et al. (1996) sugere que a espécie ajusta a sua taxa metabólica em resposta à elevada turbidez. Esta aclimação pode ser a razão pela qual a espécie parece não prosperar em áreas de elevada turbidez. Para esta variável o valor mínimo observado foi 0 a 2 e 5 metros de profundidade e o valor máximo de 33,64 a 2 metros de profundidade.

De uma forma geral, as variáveis físico-químicas avaliadas não parecem ser limitantes do desenvolvimento de mexilhão-zebra, pelo que os locais amostrados parecem ter uma elevada suscetibilidade à invasão, à semelhança com o que tem sido observado ao longo de toda a monitorização (Bioinsight, 2017a; Bioinsight, 2017b).

Em todas as amostras foram encontrados organismos planctónicos, com abundâncias diferentes em cada local (Figura 2). Foi frequente, por exemplo, a observação de copépodes, de cladóceros e mesmo de algumas algas. No entanto, não foram encontradas larvas de mexilhão-zebra, em nenhuma das três campanhas de amostragem, em quaisquer dos 18 locais de amostragem e nas duas profundidades amostradas.

Tabela 1- Comparação entre os valores máximos e mínimos obtidos num determinado

| Parâmetro | Baixo potencial de sobrevivência de adultos | Baixo potencial de desenvolvimento de larvas | Potencial moderado de desenvolvimento (não há reprodução) | Condições ótimas de desenvolvimento | Valores mínimos e máximos obtidos no estudo |
|--------------------------|---|--|---|-------------------------------------|---|
| Temperatura | <10 e >32 | 26 - 32 | 10 - 20 e 31 - 32 | 15 - 31 | 22,2 - 29,4 |
| Oxigénio dissolvido | <4 | 3 - 7 | 4 - 8 | >8 | 6,68 - 10,05 |
| Condutividade e elétrica | <22 | 22 - 36 | 37 - 82 | >83 | 392 - 668 |
| pH | <7,0 e >9,5 | 7,0 - 7,8 e 9,0 - 9,5 | 6,8 - 7,4 e 8,7 - 9,5 | 7,4 - 8,8 | 6,59 - 8,88 |

período para algumas variáveis físico-químicas e os valores considerados adequados para o desenvolvimento de larvas e adultos de mexilhão-zebra. Sombreado azul: Valores máximos e mínimos enquadram-se nas condições ótimas ao desenvolvimento da espécie.

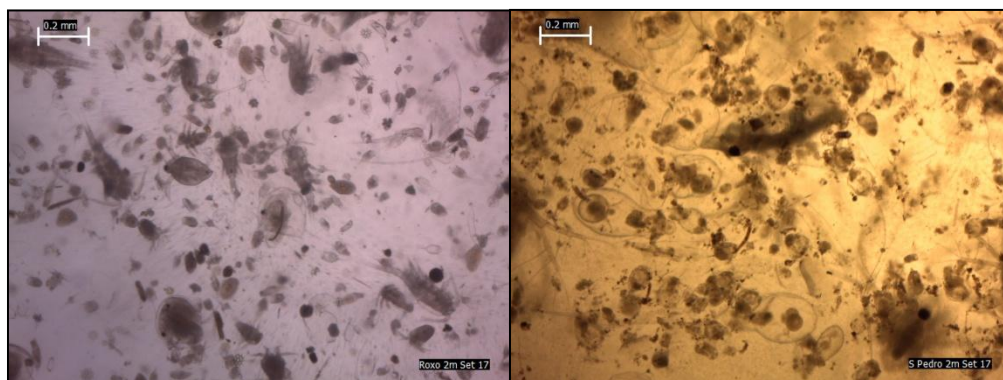


Figura 2 – Exemplos das amostras obtidas e dos organismos planctónicos encontrados na Albufeira do Roxo (esquerda) e Albufeira de S. Pedro (direita), aos 2 metros em setembro de 2017, observados com uma ampliação de 10x.

A observação de um amplicão de 710 bp em todas as pistas P1 a P18, indica que os DNAs isolados nos 18 pontos de amostragem (Figura 3 (A)), apresentam boa qualidade e quantidade para se proceder à amplificação por Taq polimerase (PCR), nomeadamente para a deteção de presença/ausência de DNA de *D. polymorpha*. Os resultados indicam que as reação de amplificação por PCR com os *primers* específicos para *D. polymorpha* geram um amplicão único de 386 nucleótidos em DNA de *D. polymorpha*, aqui utilizado como controlo positivo (Figura 3 (B, pista Dp)). De forma a testar se o nosso procedimento de PCR poderá detetar DNA de outras espécies de bivalves de água doce presentes em Portugal (*Corbicula fluminea* e *Unio delphinus* e *Unio tumidiformis*), dando assim origem a falsos positivos, analisámos DNA extraídos de adultos destas espécies. Como se pode observar nas pistas Cf, Ud e Ut, não se deteta qualquer amplificação, o que sugere que, as condições de PCR aqui aplicadas, são específicas e identificam a presença ou ausência de *D. polymorpha*, distinguindo-o de outras espécies eventualmente presentes. Finalmente, ausência de amplificação nas pistas H₂O e EB (Controlos negativos), indica que a reação de PCR decorreu sem contaminação cruzada com algum tipo de DNA que não o utilizado propositadamente na reação.

Conclusões

Até à data não foi detetada a presença de mexilhão-zebra nas amostras recolhidas nas 18 estações de amostragem, nas campanhas realizadas até ao momento, quer através da análise por microscopia, quer através da análise genética. Relativamente à análise por PCR, salienta-se que não se observaram amplicões com peso molecular semelhante ao de *D. polymorpha*. No que diz respeito à análise da componente físico-química, foi possível concluir que os valores continuam a não ser limitantes para o desenvolvimento de mexilhão-zebra, pelo que, é de salientar que a área de estudo apresenta elevado potencial para a invasão desta espécie. De referir que em todos os locais de amostragem se verificam condições ótimas de temperatura e condutividade para a ocorrência da espécie. No que diz respeito ao oxigénio dissolvido, a salientar que os valores registados em todos os locais de amostragem, apresentam condições potenciais para o desenvolvimento moderado da espécie a condições ótimas de desenvolvimento.

Em relação à análise por microscopia salienta-se que de todas as amostras analisadas, em nenhuma foi observada a presença de mexilhão-zebra. No entanto, é de referir que se observaram, em algumas amostras, um total de 53 organismos que apresentavam a cruz de Malta, após análise mais pormenorizada, as mesmas foram identificadas de forma inequívoca como ostracodes.

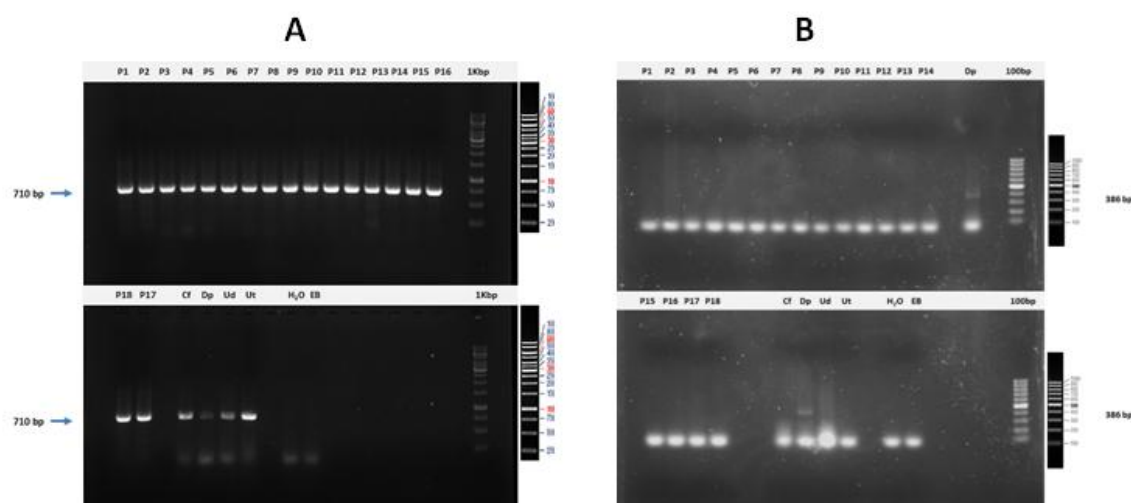


Figura 3 – A - Análise dos DNA isolados nos pontos de amostragem P1 a P18 utilizando os *primers* universais LCO1490 e HCO2198. B- Análise da presença/ausência de DNA de *Dreissena polymorpha* nos diversos pontos de amostragem P1 a P18, utilizando os *primers* específicos DpCOI-F e DpCOI-R. P1 a P18: DNAs obtidos em cada um dos pontos de amostragem. Cf: DNA de adulto de *Corbicula fluminea* ;Dp: DNA de adulto de *Dreissena polymorpha* ; Ud: DNA de adulto de *Unio delphinus*; Ut: DNA de adulto de *Unio tumidiformis*; H2O e EB: Controlo negativo da reação de PCR.

Referências bibliográficas

- Banha F., Gimeno, I., Lanao M., Touya V., Durán C., Peribáñez M. A., Anastácio P. M. (2015) The role of waterfowl and fishing gear on zebra mussel larvae dispersal. Biological invasions 18(1):115-125.
- Bioinsight. (2017a). Monitorização de mexilhão-zebra nas albufeiras do EFMA. Nota Técnica I (Campanhas 1, 2 e 3). Relatório elaborado para a EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva. Bioinsight. Odivelas, abril de 2017.



7, 8 e 9
Março 2018
ÉVORA
Évora Hotel

GESTÃO DOS
RECURSOS HÍDRICOS:
**NOVOS
DESAFIOS**

Bioinsight. (2017b) Monitorização de mexilhão-zebra nas albufeiras do EFMA. Nota Técnica II (Campanhas 4, 5 e 6). Relatório elaborado para a EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva. Bioinsight. Odivelas, julho de 2017.

CHE. (2011). Protocolos de desinfección y limpieza para evitar la dispersión de la plaga del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*). Confederación Hidrográfica del Ebro, Zaragoza, 14.

Cohen A.N., Weinstein A. (2001). Zebra Mussel's calcium threshold and implications for its potential distribution in North America. San Francisco Estuary Institute, Richmond California. pp. 47. <http://www.dfg.ca.gov/quaggamussel/docs/2001-zebramusselcalcium.pdf>.

Doll B. (1997). Zebra mussel colonization: North Carolina's Risks. Sea Grant North Carolina, University of North Carolina, Raleigh, NC (UNC SG-97-01).

Durán Lalaguna C., Anadón Marco, A. (2008). "The zebra mussel invasion in Spain and navigation rules." *Aquatic Invasions* 3.3: 315-324.

Effler, S.W. et al., (1996). Impact of Zebra Mussel Invasion on River Water Quality. *Water Environment Research*, 68(2), pp.205–214. Available at: <http://www.jstor.org/stable/25044708>.

Johnson L. E. (1995). Enhanced early detection and enumeration of zebra mussel (*Dreissena spp.*) veligers using cross-polarized light microscopy. *Hydrobiologia* 312: 139-146.

Karatayev A., Burlakova I.L.E., Padilla D.K. (1998). Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). *Journal of Shellfish Research*, 17(4), pp.1219–1235.

Keele JA, Carmon J, Hosler D. (2013). Polymerase chain reaction: preparation and analysis of veliger water samples, PCR standard operating procedure. Bureau of Reclamation - Technical Service Center U.S. Department of the Interior, Technical Memorandum No. 86-68220-13-13.

Keele JA, Carmon J, Hosler D. (2014). Optimization of Early Detection of Invasive Mussels with Polymerase Chain Reaction. Bureau of Reclamation - Research and Development Office, U.S. Department of the Interior, Technical Memorandum No. 86-68220-14-13.

Kozlowski S., Page C., Whetstone J. (2002). Zebra mussels in South Carolina: the potential risk of infestation. Prepared by South Carolina zebra mussel task force. pp. 15.

Kraemer LR., Galloway ML. (1986). Larval development of *Corbicula fluminea* (Müller) (Bivalvia: Corbiculacea): an appraisal of its heterochrony. *Am. Malacol. Bull.*, Special Edition 2: 61-79.

Marsden JE. (1992). Standard protocols for monitoring and sampling zebra mussels. Illinois Natural History Survey Biological Notes 138, 40 pp.

Mackie G. L., Claudi R. (2009). Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems. CRC Press.

Mackie G.L., Claudi R. (2010). Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems. CRC Press, Boca Raton, FL.

McComas S. (2010). Lake Minnetonka Habitat Suitability Assessment., pp.1–11. Available at: <http://www.minnehahacreek.org/sites/minnehahacreek.org/files/pdfs/education/LkMtkHabitatSuitability.pdf>.

Morton B. (1997) "The aquatic nuisance species problem: a global perspective and review." Zebra mussels and aquatic nuisance species: 1-54.

Nichols SJ., Black MG. (1994). Identification of larvae: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*), and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Canadian Journal of Zoology* 72: 406-417 doi:10.1139/z94-057.



7, 8 e 9
Março 2018
ÉVORA
Évora Hotel

GESTÃO DOS
RECURSOS HÍDRICOS:
**NOVOS
DESAFIOS**

Rochelle P, Johnson A, De Leon R. (2009). Early Detection of *Dreissena* spp. veligers using molecular methods. in "Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems" 2nd Edition Editors: Gerald L. Mackie, Renata Claudi New York: CRC Press. pp: 233-241.

Sorba, EA. Williamson DA. (1997). Zebra Mussel colonization potential in Manitoba, Canada. Water Quality Management Section, Manitoba Environment Report No. 97-07.

Sprung M. (1987). Ecological requirements of developing *Dreissena polymorpha* eggs. Arch Hydrobiol Suppl 79: 69-86.

Summers RB, Thorp JH, Alexander JE, Fell RD. (1996). Respiratory adjustment of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in response to chronic turbidity. Can J Fish Aquat Sci 53: 1626-1631.