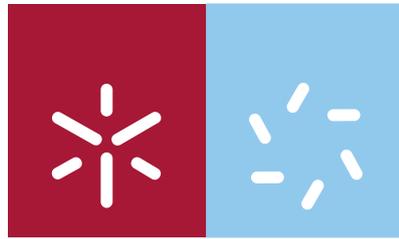


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Joana Oliveira Duarte

**Toxicidade de produtos fitofarmacêuticos
e metais sobre uma comunidade de
nemátodes do solo**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Joana Oliveira Duarte

**Toxicidade de produtos fitofarmacêuticos
e metais sobre uma comunidade de
nemátodes do solo**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

Trabalho realizado sob a orientação da
**Doutora Maria Teresa da Silva Craveiro
Martins de Almeida**

Outubro de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de várias formas, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia da Universidade do Minho pela oportunidade da realização do mestrado.

À minha orientadora Doutora Maria Teresa S.C. Martins de Almeida pelos ensinamentos, dedicação, apoio, paciência e amizade.

Ao Doutor José Paulo Sousa pelo seu apoio, por se ter mostrado sempre atencioso quando necessitava de ajuda e por ter sido tão prestável em me receber em Coimbra.

À Doutora Teresa Valente, do Departamento de Ciências da Terra, da Universidade do Minho, pela disponibilidade para a determinação da matéria orgânica dos solos.

Ao Dr. Tiago Natal-da-Luz pela disponibilidade e paciência para responder a todas as dúvidas na realização do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biodiversidade, que se mostraram sempre prestáveis quando foi necessário, nomeadamente o Arunava Pradhan, a Sofia Duarte e a Isabel Fernandes.

Ao Centro de Interpretação do Carvalho de Calvos, em particular à Eng^a Melisa Costa por atenciosamente nos ter recebido no Centro e à Eng^a Natália Costa pela permissão da colheita de solo nas hortas sociais do Centro e toda a disponibilidade prestada.

À D^a Aurora Calheiros pela amabilidade em permitir a colheita de solo na sua quinta (Palme).

A todos os amigos que tiveram palavras de encorajamento, em particular, à Andreia, amiga do coração, pela paciência e todo o apoio ao longo deste trabalho e, sobretudo amizade nestes 6 anos. Obrigada por estares comigo em tudo!

Ao Pedro, meu namorado, por todo apoio nos momentos mais difíceis, amor, dedicação e paciência neste longo caminho. Obrigada por estares sempre ao meu lado e ajudado a chegar até aqui, e sei que estarás no futuro que nos espera! Amo-te!!!

Finalmente, agradeço aos meus pais pela oportunidade de me formar academicamente e o compromisso, enquanto pais, de me formarem enquanto pessoa!

Obrigada a todos que me apoiaram
até à meta final deste longo caminho!!!

Toxicidade de produtos fitofarmacêuticos e metais sobre uma comunidade de nemátodes do solo

Resumo

Os nemátodes do solo desempenham um papel essencial no funcionamento deste ecossistema e não reflectem apenas as características do solo, da vegetação e do seu modo de gestão mas traduzem, também, os efeitos de contaminantes. A composição estrutural de uma comunidade pode dar indicação da intensidade do impacto resultante de diferentes agentes stressores nessa comunidade, sendo por isso útil na avaliação do efeito ecológico e toxicológico. Recentemente tem sido avaliado este efeito de forma mais relevante e completa, baseada não apenas numa abordagem taxonómica mas, também, ao nível da estrutura da comunidade, com base nos tipos tróficos.

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar o efeito de diferentes produtos de uso corrente como fitoquímicos e, ainda, de alguns metais, sobre uma comunidade nativa de nemátodes do solo, não só sob uma perspectiva taxonómica (ao nível da família) mas, também, estrutural. Para isso foi utilizada uma comunidade de nemátodes de um solo proveniente de uma horta cultivada em modo de produção biológica, num local sem qualquer aplicação de pesticidas químicos. Com o objectivo de se detectar alterações provocadas por contaminantes na comunidade dos nemátodes, conhecer a sensibilidade dos diferentes grupos tróficos e famílias e avaliar a sua utilidade como bioindicadores do solo, analisou-se o seu efeito na abundância total destes organismos, no número de famílias e na abundância dos diferentes grupos tróficos (estrutura da comunidade). Foram utilizados três compostos de natureza diversa (óleo de verão, abamectina e fosetil) e três metais (cádmio, zinco e cobre), em três doses diferentes. Os contaminantes, na forma de solução aquosa, foram adicionados ao solo (volume de 50 cm³), previamente desfaundado e, inoculado com aproximadamente 1000 nemátodes. Após 15 dias de exposição ao contaminante, com temperatura regulada (21 °C), os nemátodes foram extraídos do solo pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming, identificados ao nível da família e agrupados segundo os diferentes tipos tróficos; bacteriófagos; fungívoros; parasitas das plantas e predadores-omnívoros.

Os dados obtidos revelaram uma resposta dos nemátodes à toxicidade, provocada pelos contaminantes testados, que se traduziu a vários níveis e de forma diversa nesta comunidade. A abundância total dos nemátodes diminuiu significativamente após o tratamento com os metais, Cd, Zn e Cu e com os produtos fitofarmacêuticos óleo de verão e abamectina, nas concentrações mais elevadas, excepto no tratamento com abamectina que actuou mesmo na concentração mais baixa. A abamectina e o cádmio foram os contaminantes que mais afectaram significativamente o número de famílias de nemátodes nas concentrações de 0,0096 g a.i./Kg e 500 mg/Kg, respectivamente. A estrutura trófica sofreu, também, mudanças significativas por acção destes contaminantes, nas concentrações mais elevadas, excepto no tratamento com abamectina (que actuou na concentração mais baixa). O fosetil, entre os produtos fitofarmacêuticos e o zinco, entre os metais analisados, foram os contaminantes com menor efeito tóxico sobre a diversidade e estrutura da comunidade de nemátodes do solo estudado. Nos ensaios com Cd, Cu e abamectina, dominaram os nemátodes oportunistas. Os resultados obtidos neste estudo confirmam a possibilidade de utilização de uma abordagem com base nos efeitos sobre a estrutura da comunidade dos nemátodes do solo, em ecotoxicologia dos solos.

Palavras-chave: diversidade; ecotoxicologia; estrutura da comunidade; grupos tróficos; pesticidas; poluição

Toxicity of pesticides and metals on a soil nematode community

Abstract

Soil nematodes play an essential role in soil functioning ecosystems and reflect not only the characteristics of the soil, vegetation and its management but also reflect the effects of contaminants. The structural composition of the community can give an indication of the intensity of the resulting impact of different stressors and is therefore useful for evaluating the ecological and toxicological effects. Recently this effect has been evaluated in a more complete and relevant way using not only taxonomic, but also a trait approach of the structure community.

This work aimed to study the effect of different pesticides frequently used and yet, some metals on a native community of soil nematodes, not only by a taxonomic (at the family level), but also structural perspective. For this a nematode community from a soil of a vegetable garden grown under organic farming, in a field free of any chemical pesticide application. In order to detect changes in the nematode community caused by contaminants, the effect on the total abundance of organisms, number of families and abundance of different trophic groups (structure of the community) was analyzed. For the assays, three compounds of diverse nature (summer oil, abamectin and fosetyl) and the metals (cadmium, zinc and copper) were used in three different doses. Water solutions of the contaminants were added to the soil (50 cm³ volume), previously defaunated and inoculated with about 1000 nematodes. After 15 days of exposure to the contaminant, at regulated temperature (21 °C) the nematodes were extracted by the method of Whitehead and Hemming tray, identified to family level and grouped according to the different trophic traits (bacterivorous, plant-pasasitic, fungivorous and predators-omnivorous).

Data obtained showed a response of the soil nematodes to the toxicity caused by the tested contaminants at different levels and ways on the community. The total abundance of the nematodes decreased significantly after treatment with all metals, Cd, Zn and Cu and with the pesticides summer oil and abamectin, in the highest concentrations, except for the treatment with abamectin which also decreased with the lowest concentration. The abamectin and cadmium were the contaminants affecting more significantly the number of families of nematodes in concentrations of 0.0096 g a.i. / kg and 500 mg / kg, respectively. The trophic structure of the community also changed significantly under these contaminants in the highest concentrations, except for treatment with abamectin (lowest concentration). Fosetyl, among the pesticides, and zinc, were the contaminants showing less toxic effect on diversity and on the structure of the nematodes community. Opportunists were the dominant nematodes in the assays with Cd, Cu and abamectin. The results obtained in this study confirm the possibility of using an approach based on the effects of stressor agents on the structure of the community of soil nematodes, in soil ecotoxicology.

Key words: community structure; diversity; ecotoxicology; trophic groups; pesticides; pollution

Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras	x
Lista de tabelas	xi
I. Introdução	1
1. Considerações gerais	2
2. Estrutura da comunidade de nemátodes do solo	3
3. Os nemátodes como bioindicadores.....	5
4. Ecotoxicologia.....	8
4.1. Produtos fitofarmacêuticos.....	10
4.2. Metais.....	10
II. Material e Métodos	12
1. Obtenção do solo	13
1.1. Proveniência do solo e amostragem.....	13
1.2. Caracterização do solo.....	14
2. Extracção e identificação dos nemátodes do solo.....	14
2.1. Comparação de métodos de extracção.....	14
2.1.1. Método de sedimentação e crivagem	14
2.1.2. Método do tabuleiro de Whitehead e Hemming.....	15
2.2. Identificação dos nemátodes.....	16
2.3. Determinação da eficiência da taxa de recuperação	16
3. Ensaio laboratoriais	17
3.1. Preparação do solo.....	17
3.2. Extracção dos nemátodes	18
3.3. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos.....	18
3.4. Efeito dos metais.....	18
3.5. Identificação e quantificação dos nemátodes.....	19
4. Análise estatística	19
III. Resultados.....	21
1. Eficiência de extracção dos nemátodes do solo	22
1.1. Caracterização do solo.....	22
2. Extracção e identificação dos nemátodes do solo	22
2.1. Comparação dos métodos de extracção	22
2.1.1. Método de sedimentação e crivagem.....	22

2.1.2. Método do tabuleiro de Whitehead e Hemming.....	23
2.2. Identificação dos nemátodes.....	26
2.3. Determinação da eficiência da taxa de recuperação	26
3. Ensaio Ecotoxicológicos	27
3.1. Caracterização do solo.....	27
3.2. Ensaio com produtos fitofarmacêuticos	27
3.2.1. Avaliação da diversidade	27
3.2.2. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na abundância total de nemátodes	33
3.2.3. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na composição das famílias de nemátodes.....	33
3.2.4. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na abundância dos grupos tróficos	35
3.3. Ensaio com metais	38
3.3.1. Avaliação da diversidade	38
3.3.2. Efeito dos metais na abundância total de nemátodes.....	43
3.3.3. Efeito dos metais na composição das famílias de nemátodes.....	43
3.3.4. Efeito dos metais na abundância dos grupos tróficos	45
IV. Discussão.....	48
1. Eficiência do método de extração dos nemátodes.....	49
2. Ensaio ecotoxicológicos	50
2.1. Efeitos dos produtos fitofarmacêuticos	50
2.2. Efeitos dos metais.....	53
2.3. Conclusões.....	56
V. Referências bibliográficas	58
VI. Anexos.....	66

Lista de figuras

Figura 1 – Locais onde foi colhido o solo para o estudo. A - Horta com nabiça (<i>Brassica rapa</i> L.subsp. <i>rapa</i>) (Calvos); B – Pomar com macieiras (Palme)	13
Figura 2 – Esquema da montagem dos funis de Baermann para a clarificação final das suspensões de nemátodes obtidos por sedimentação e crivagem.....	15
Figura 3 – Tabuleiros montados com solo para a extração dos nemátodes	16
Figura 4 - Solo num saco de polietileno, no ciclo de congelamento - descongelamento, para a desfaunagem	17
Figura 5 – Copo preparado para um ensaio, contendo 50 g de solo (enriquecido com comunidade bacteriana), o Zn e os nemátodes	19
Figura 6 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos pelo método de sedimentação e crivagem, a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm ³ de solo (“a” indica ausência de diferenças significativas).....	22
Figura 7 - Número de nemátodes de cada família (média de 5 réplicas), extraídos pelo método de sedimentação e crivagem a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm ³ de solo.	23
Figura 8 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming, a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm ³ de solo (a e b indicam diferenças; letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre volumes do solo).....	24
Figura 9 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas,) em cada família, extraídos pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming a partir de volumes de solo de 30, 50 e 100 cm ³ de solo.....	25
Figura 10 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos, de 50 cm ³ de solo, pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming após 24 e 48 horas.	25
Figura 61 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) três dias após terem sido adicionados ao solo, no escuro, a temperatura controlada, (Ci, comunidade inicial; C, comunidade após 3 dias)	26

Figura 12 - Proporção dos diferentes grupos tróficos de nemátodes nas diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos	28
Figura 13 – Efeitos das diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos sobre grupos de nemátodes com diferentes valores c-p. A – Óleo de Verão; B Abamectina; C – Fosetil ..	30
Figura 14 – Efeitos das diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos (óleo de verão, fosetil e abamectina) sobre a abundância total de nemátodes (média de 5 réplicas).....	33
Figura 15 – Efeito das diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos no número de famílias dos nemátodes.....	35
Figura 16 – Efeito das diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos na abundância dos diferentes grupos tróficos (média de 5 réplicas) - BF: bacteriófagos; FF: fungívoros; POM: Predadores e omnívoros; PP: parasitas de plantas	36
Figura 17 - Proporção dos diferentes grupos tróficos de nemátodes nas diferentes concentrações de metais (cádmio, zinco e cobre)	38
Figura 18 - Efeitos das diferentes concentrações metais sobre grupos de nemátodes com diferentes valores c-p.A – Cádmio; B- Zinco; C – Cobre	40
Figura 19 – Efeitos das diferentes concentrações de metais (Cd, Zn e Cu) na abundância total de nemátodes (média de 5 réplicas).....	43
Figura 20 - Efeitos das diferentes concentrações de metais no número de famílias dos nemátodes	45
Figura 21 – Efeitos das diferentes concentrações de metais (Cd, Zn e Cu) na abundância dos diferentes grupos tróficos (média de 5 réplicas)	46

Lista de tabelas

Tabela I – Número de nemátodes (média de 5 réplicas) pertencentes às diferentes famílias de nemátodes nas diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos e respectivos valores c-p.....	29
Tabela II - Índices de diversidade para os diferentes produtos fitofarmacêuticos.....	32
Tabela III - Valores de EC50 (nível de confiança de 95%) para as famílias mais representativas, grupos tróficos, número de famílias de nemátodes e abundância total sujeitas às concentrações dos produtos fitofarmacêuticos.....	37
Tabela IV – Número de nemátodes (médias de 5 réplicas) pertencentes às diferentes famílias nas diferentes concentrações de metais e respectivos valores c-p.....	39
Tabela V - Índices de diversidade para os diferentes metais.....	42
Tabela VI - Valores de EC50 (nível de confiança de 95%) para as famílias mais representativas, grupos tróficos e número de famílias de nemátodes sujeitas às concentrações dos metais.....	47
Tabela VII – Contribuição (média e %) das famílias de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com produtos fitofarmacêuticos.....	67
Tabela VIII – Contribuição (média e %) dos grupos tróficos de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com produtos fitofarmacêuticos.....	67
Tabela IX – Contribuição (média e %) das famílias de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com metais.....	68
Tabela X – Contribuição (média e %) dos grupos tróficos de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com metais.....	68

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

1. Considerações Gerais

Os ecossistemas terrestres são altamente dependentes dos processos do solo e consequentemente das comunidades do solo (Sánchez-Moreno *et al.*, 2005). Estas comunidades são um elemento importante e vital para a compreensão do ecossistema do solo, pois estão envolvidas em muitos aspectos da decomposição da matéria orgânica, regulação parcial da actividade microbiana e ciclo dos nutrientes (Cortet *et al.*, 1999; Schová *et al.*, 2005). Grande diversidade de microrganismos, invertebrados e plantas mantêm o solo equilibrado constituindo um ecossistema complexo (Goulart, 2007). Tem sido demonstrado que os nemátodes do solo desempenham um papel essencial no funcionamento do ecossistema do solo, incluindo zonas agrícolas, em que muitas espécies de nemátodes podem causar danos à produção, mas outros, de vida livre, são importantes pelo seu efeito benéfico à agricultura (Höss *et al.*, 2009; Mulder *et al.*, 2005; Ritzinger & Fancelli, 2006).

Os nemátodes são os metazoários mais abundantes no solo (Schová *et al.*, 2005), classificados como microfauna ou mesofauna (Neher, 2010) e as suas comunidades são diversificadas (Yeates, 1999). Estes organismos vivem nos filmes de água entre as partículas do solo, pois o seu tamanho reduzido (40 µm a 1,0 mm de comprimento) permite o movimento entre os poros do solo (Bongers & Ferris, 1999; Neher 2010). Adaptaram-se a diferentes habitats como parasitas, predadores e de vida livre, apresentando, assim, grande diversidade de hábitos alimentares, levando, respectivamente, ao desenvolvimento de estilete e alterações morfológicas e fisiológicas do esófago (Gauler & Bilgrami, 2004). Apesar da sua dimensão e, geralmente pouca contribuição para a biomassa total do solo, os nemátodes podem desempenhar funções significativas nas comunidades e nos processos ecológicos do solo (Bernard, 1991; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005). Ao evoluírem para vários tipos de alimentação os nemátodes têm sido capazes de ocupar posições-chave nas cadeias alimentares do solo e nos processos de impacte ecológico directa, ou indirectamente (Höss *et al.*, 2009; Neher, 2010; Schová *et al.*, 2005), sendo importantes na transferência de energia (Guerene, 2006) e constituindo o elo essencial entre a reserva mineral de nutrientes e as plantas (Holgado & Magnusson, 2005).

Os organismos da cadeia alimentar do solo dependem dos recursos a partir de plantas ou de alterações de outras fontes, respondendo de forma característica ao enriquecimento do

ambiente em matéria orgânica (Ferris & Bongers, 2006). As comunidades de nemátodes mostram uma dinâmica sazonal, diferenciando a espécie dominante ao longo do tempo e entre ecossistemas, em função das plantas, propriedades do solo, microclimas e outros organismos (Neher, 2010). O solo é uma componente crucial dos ecossistemas, devido às suas funções essenciais na fertilidade, dos processos de decomposição, dos fluxos de energia e dos nutrientes, sendo apontado como uma das razões determinantes da distribuição de algumas espécies (Bilgrami, 2004; Schová *et al.*, 2005).

Existem muitos problemas na estimativa das populações de nemátodes do solo, visto que a distribuição de nemátodes varia horizontal e verticalmente devido à sua heterogeneidade (Schová *et al.*, 2005). Uma amostra de solo reflecte não só a população de campo na época e profundidade de amostragem mas, também, os efeitos de amostragem e procedimentos de extracção (Yeates & Bongers, 1995). A escolha de um método de extracção dependerá do material disponível e dos nemátodes que se pretende estudar (Coyne, 2007).

Actualmente a identificação dos nemátodes assenta sobretudo na caracterização baseada nas características morfológicas, como a cavidade bucal, o estilete nos parasitas de plantas, os órgãos quimiorreceptores (anfídios), o esófago (reflecte o método e a fonte de alimento), o oviducto nas fêmeas e as espículas nos machos e a cauda (Gauler & Bilgrami, 2004; Perry e Moens, 2006).

2. Estrutura da comunidade de nemátodes do solo

Os nemátodes do solo formam uma comunidade complexa, tendo as várias espécies diferentes funções na cadeia trófica; a composição relativa dos diferentes grupos tróficos reflecte a estrutura dessa comunidade. Por isso, a estrutura trófica é uma classificação funcional que contribui para compreender a estrutura da comunidade de nemátodes e como cada grupo afecta a transferência de matéria ou energia no ecossistema (Fu *et al.*, 2000). Uma das classificações mais utilizadas é baseada no hábito alimentar dos diferentes nemátodes (Yeates *et al.*, 1993), a qual inclui basicamente: nemátodes parasitas das plantas e nemátodes de vida livre (bacteriófagos, fungívoros, predadores e omnívoros) (Yeates, 1999; Yeates *et al.*, 1993). Os nemátodes parasitas das plantas possuem um estilete para perfurar as células das plantas e os nemátodes fungívoros possuem estilete para se alimentarem das hifas dos fungos. Os nemátodes bacteriófagos apresentam uma cavidade bucal cilíndrica ingerindo bactérias e os nemátodes predadores possuem uma cavidade bucal ampla com dentes, denticulos e/ou placas

cortantes alimentando-se de outros organismos do solo incluindo também, outros nemátodes (Goulart, 2007).

Os nemátodes parasitas das plantas podem ser encontrados na raiz, no caule ou nas folhas conforme a preferência alimentar (Weischer & Brown, 2000), podendo ser distinguidos em diferentes grupos funcionais: ectoparasitas, que permanecem no solo não penetrando nos tecidos da planta e endoparasitas, que penetram nos tecidos da raiz, podendo distinguir-se em endoparasitas migratórios (sem local fixo para alimentação no tecido vegetal) e endoparasitas sedentários (que também têm uma fase migratória antes de se fixarem no local de alimentação); e semi-endoparasitas, somente a parte anterior do nemátode penetra a raiz, permanecendo a parte posterior do corpo no solo (Perry & Moens, 2006). Os nemátodes parasitas das plantas são encontrados em associação com a maioria das plantas (Guerene, 2006).

Os nemátodes de vida livre podem ser encontrados a viver numa enorme diversidade de ambientes e desempenham um importante papel no ciclo dos nutrientes, com evidente influência na fertilidade dos solos (Weischer & Brown, 2000). Os nemátodes fungívoros e bacteriófagos contribuem para a decomposição da matéria orgânica. Os nemátodes bacteriófagos alimentam-se de decompositores primários (bactérias) influenciando consideravelmente as taxas de decomposição (Freckman, 1988), actuando nas primeiras fases de decomposição (resíduos recentes no solo logo menor relação carbono/azoto), predominantemente da família Rhabditidae, os quais são substituídos ao longo do tempo por nemátodes da família Cephalobidae (tolerantes a meios com escassez de água). A microfauna que se alimenta de bactérias faz aumentar directamente a libertação de nutrientes (Yeates, 2003). Posteriormente a decomposição da matéria orgânica (substratos de decomposição mais lenta) encontra-se maioritariamente a cargo dos nemátodes fungívoros; os nemátodes predadores e omnívoros encontram-se em maior número em comunidades mais maduras e ambientes estáveis (Whitford *et al.*, 1982).

Os nemátodes predadores, bacteriófagos e fungívoros podem aumentar a taxa de mineralização, enquanto que os nemátodes parasitas das plantas podem afectar gravemente as culturas e reduzir o rendimento e a qualidade das colheitas (Holgado & Magnusson, 2005). Os organismos do solo obtêm carbono e energia através da alimentação a partir de plantas, bactérias ou fungos em sucessivos níveis de parasitismo e predação (Ferris, 2010). Os nemátodes bacteriófagos apresentam uma relação carbono:azoto (C:N) maior do que as bactérias (Ferris *et al.*, 1997) e os fungívoros têm a relação C:N mais próxima da sua fonte de

alimento (Holgado & Magnusson, 2005). Os nemátodes predadores contribuem para a mineralização do nitrogénio através da alimentação a partir de outros nemátodes e de outros organismos do solo (Holgado & Magnusson, 2005) regulando a abundância de nemátodes oportunistas (Ferris, 2010). O aumento da actividade microbiana leva ao aumento da proporção de oportunistas bacteriófagos, seguindo-se os fungívoros e espécies bacteriófagas de crescimento mais lento (Bongers & Ferris, 1999).

O carbono é imobilizado na estrutura corporal dos organismos e durante a respiração é libertada energia ligada a hidratos de carbono complexos, afectando a sua disponibilidade, a estrutura, dinâmica e actividade da cadeia alimentar (Ferris, 2010). Na presença de bactérias como fonte adequada de alimento, os nemátodes bacteriófagos podem competir com as plantas por N, resultando na imobilização microbiológica deste elemento na superfície das raízes, podendo libertar N de células bacterianas e disponibiliza-lo, novamente, para as raízes das plantas (Holgado & Magnusson, 2005). Há evidências que sugerem que entre 30 e 50% de N presente nas culturas de plantas é disponibilizado pela actividade de nemátodes bacteriófagos (Guerene, 2006).

As alterações na estrutura e função das comunidades de nemátodes do solo podem ser causadas pelo pH do solo, adubação, culturas e poluição por metais e descargas de resíduos (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006). A classificação dos nemátodes em grupos tróficos pode melhorar a interpretação das mudanças nas comunidades induzidas por poluição (Korthals *et al.*, 1996). Qualquer perturbação do solo pode afectar a estrutura trófica dos nemátodes do solo e a sua abundância total (Fu *et al.*, 2000). O acompanhamento da composição da comunidade de nemátodes do solo através do conhecimento das alterações da sua estrutura pode ser particularmente útil em culturas em modo de produção biológica (Duarte & Almeida, 2011). As perturbações causadas por poluentes resultam em mudanças quantitativas e qualitativas da fauna afectando o funcionamento do solo, podendo os grupos da fauna do solo actuar como bioindicadores (Cortet *et al.*, 1999).

3. Os nemátodes como bioindicadores

A melhor compreensão dos conceitos ecológicos básicos, tais como interacção entre espécies, papel do distúrbio, estabilidade da diversidade e estrutura trófica aumentou a capacidade de prever os efeitos de contaminantes nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Clements & Rohr, 2009). A estrutura e a função das cadeias alimentares do solo são

perturbadas por hidrocarbonetos, contaminantes de metais pesados, fertilizantes, pesticidas e agentes físicos (Bongers & Ferris, 1999; Shanchéz-Moreno *et al.*, 2006). O solo é um importante reservatório para contaminantes uma vez que possui a capacidade de se ligar a vários produtos químicos (Dube *et al.*, 2000) sendo por isso, de interesse, a sua protecção relativamente a resíduos contaminantes. Vários tipos de perturbações do solo afectam a riqueza de espécies, a estrutura trófica e o estado de sucessão das comunidades de nemátodes afectando o seu funcionamento (Cortef *et al.*, 1999; Neher, 2000).

Desde que começou a perceber-se que as comunidades de nemátodes do solo são abundantes, diversificadas e que contribuem para o ciclo dos nutrientes, têm sido cada vez mais utilizadas como indicadores das condições do solo (Yeates, 2003). A composição estrutural de uma comunidade pode dar uma indicação da intensidade do impacto resultante de diferentes stressores nessa comunidade (Vand den Brink *et al.*, 2011). Durante muito tempo a nematologia centrou-se no controlo de espécies nocivas e parasitas. Contudo, actualmente os nemátodes são frequentemente vistos como parte integrante, e potencialmente úteis nos sistemas do solo (Neher, 2010), visto que respondem rapidamente às mudanças do ambiente (Holgado & Magnusson, 2005). Muitos estudos têm-se centrado na resposta dos nemátodes às alterações orgânicas, ou a poluentes, ciclos sazonais e distribuição espacial dos seus diferentes grupos tróficos em ecossistemas naturais e agrícolas (Fu *et al.*, 2000).

A estrutura da comunidade de nemátodes oferece um eficiente instrumento para a avaliação biológica da qualidade e funcionamento dos solos, pois os nemátodes estão presentes em todos os locais onde ocorre decomposição, a sua morfologia reflecte o tipo de alimentação, têm um tempo de resposta curto e são facilmente isolados do substrato e a identificação do género é relativamente simples (Bongers & Bongers, 1997; Neher, 2000). No entanto a descrição da resposta das comunidades ao stress é limitada se for baseada apenas em características morfológicas (Baird *et al.*, 2008). Como os nemátodes ocupam quase todos os habitats imagináveis, e exibem uma ampla gama de níveis tróficos, inevitavelmente são expostos à maioria das condições ambientais, incluindo os materiais mais tóxicos a partir de fontes naturais e humanas (Potter & McKeown, 2002). Por isso, a resposta ao nível da comunidade aos contaminantes pode não ser a mesma por parte de comunidades geograficamente distantes (Chelinho *et al.*, 2011). As comunidades de nemátodes de vida livre e as suas alterações estruturais foram consideradas como sendo uma das melhores ferramentas biológicas para avaliar os distúrbios do solo, incluindo a poluição por metais pesados, agrícolas e as actividades de pastoreio em sistemas terrestres. Devido à sua sensibilidade às mudanças no ecossistema do

solo e à sua capacidade de reflectir as diferenças entre ambientes sem perturbação e ambientes que sofreram impacte antrópico, os nemátodes de vida livre são considerados úteis e pouco dispendiosos como indicadores ecológicos (Pen-Mouratov *et al.*, 2010).

A abordagem dos nemátodes como bioindicadores sensíveis às condições do solo baseia-se nas suas estratégias de sobrevivência. As espécies de nemátodes podem ser categorizadas como “colonizadores” ou “persistentes” (c-p) (Bongers & Bongers, 1997; Schová *et al.*, 2005). Os nemátodes “colonizadores” são designados estrategistas-r (oportunistas), com um tempo de geração curto e elevada taxa de reprodução (e.g. os Rhabditidae) e os “persistentes” são designados estrategistas-k, tendo um tempo de geração longo e uma baixa taxa de reprodução (e.g. os Dorylaimidae). Podem ser distinguidos numa escala de valores de c-p de 1 a 5. Os nemátodes classificados com um valor c-p 1 dominam em condições de enriquecimento de nutrientes e são relativamente tolerantes ao stress introduzido por poluição (e.g. Rhabditidae); os c-p 2 são muito tolerantes aos poluentes e a outros distúrbios e dominam quando há stress induzido por metais (e.g. Tylenchidae e Cephalobidae); os c-p 3 são nemátodes relativamente sensíveis a perturbações (e.g. Tylenchidae e Diphtherophoridae); os c-p 4 são sensíveis aos poluentes (e.g. Alaimidae) e c-p 5 são muito sensíveis aos poluentes e outros distúrbios (e.g. Dorylaimidae) (Bongers & Bongers, 1997).

Recentemente foi realizado um estudo no sentido de ser possível avaliar os efeitos de químicos no solo de uma forma mais ampla e integral, através da análise dos seus efeitos não apenas na biodiversidade (ao nível da família), mas, também, através dos efeitos na comunidade, ao nível da estrutura trófica (Chelinho *et al.*, 2011). Enquanto os nemátodes individualmente podem ser bioindicadores dos ambientes em que vivem, as comunidades de nemátodes podem indicar alterações ambientais sendo, por isso, bons indicadores de diferentes solos (Gauler & Bilgrami, 2004). Uma das vantagens dos estudos ao nível da comunidade é que os efeitos indirectos dos poluentes são implicitamente contabilizados. A disponibilidade de alimento e as interacções competitivas entre as espécies e o ambiente abiótico, podem também ser influenciadas por poluentes e afectar a comunidade de forma indirecta (Korthals *et al.*, 1996). Por isso os nemátodes podem ser adequados para a monitorização de indicadores ecológicos e para a avaliação de áreas agrícolas (Neher, 2010). A manutenção da diversidade biológica e a garantia das funções de suporte da vida do solo são a principal base para a protecção e sustentabilidade do solo (Breuce *et al.*, 2005).

4. Ecotoxicologia

Os produtos químicos podem existir sob várias formas no solo e diferentes forças podem mantê-los ligados às partículas do solo. É essencial estudar essas interações porque a toxicidade das substâncias químicas pode depender da forma como elas ocorrem no meio ambiente (Dube *et al.*, 2000). A avaliação da toxicidade dos contaminantes do solo sobre os organismos que nele habitam é, então, necessária. (Höss *et al.*, 2009). Os invertebrados do solo, como os nemátodes, são bons organismos para avaliar os efeitos nocivos de substâncias tóxicas sobre a fauna do solo. Os nemátodes estão expostos a contaminantes do solo pelo contacto (possuem uma cutícula impermeável), pela ingestão directa de partículas do solo e de água e através das transferências pela cadeia alimentar do solo (Schová *et al.*, 2005).

A pesquisa ecotoxicológica pode ser realizada relativamente ao estatuto das comunidades num ecossistema real ou através da utilização de testes de toxicidade em laboratório (bioensaios) (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; Schová *et al.*, 2005). Utilizando testes de toxicidade do solo, a biodisponibilidade dos contaminantes pode ser tomada em conta, com organismos-teste expostos ao potencial risco sob condições experimentais realistas padronizadas, sendo a resposta comparada com um solo em condições controlo que é definido como um solo que não exerce efeito sobre o organismo a testar (Höss *et al.*, 2009). A avaliação do risco ecológico determina a probabilidade e extensão dos efeitos adversos que ocorrem nos sistemas ecológicos como resultado de elementos stressores, descrevendo os processos que determinam o nível de exposição dos indivíduos, efeitos directos e indirectos, eficiência de recuperação e como os efeitos nos indivíduos se propagam para níveis de comunidade, população e ecossistema (Van den Brink *et al.*, 2011).

Os ensaios com nemátodes são práticos, pois são organismos que exigem pouco espaço, têm ciclos de vida curtos, reprodução simples, a sua manipulação e a manutenção em culturas de laboratório pode ser relativamente fácil e podem ser identificados com alguma facilidade até ao género (Yeates, 1999). São por isso úteis na avaliação de risco ecológico com base nas suas características físicas, nicho ecológico e tipos ecológicos funcionais na descrição dos efeitos de substâncias tóxicas ou de outros factores de stress ao nível da comunidade (Baird *et al.*, 2008; Schová *et al.*, 2005). No entanto, um número limitado de espécies tem sido utilizados em bioensaios, como por exemplo, os nemátodes de vida livre, *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae) e *Plectus acuminatus* (Plectidae). Os metais são os mais amplamente testados usando ágar ou meios aquáticos e um número limitado de outros compostos (e.g. pesticidas) (Schová *et al.*,

2005). Em ecotoxicologia são gerados dados com base na dose-resposta. Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo e crônico), o tipo de efeito (morte, crescimento, reprodução) ou a resposta efectiva (letal ou subletal) (Kapanen & Itävaara, 2001). A toxicidade aguda abrange apenas um período relativamente curto do ciclo de vida dos organismos (Kapanen & Itävaara, 2001) e é expressa como a proporção ou a concentração que leva à morte de 50% dos indivíduos a serem testados (Cortet *et al.*, 1999). As respostas podem ser expressas em concentração efectiva (EC, com efeito de proporções específicas – 20%, 50% e 100%), que leva à inibição ou diminuição dos indivíduos (Cortet *et al.*, 1999; Kapanen & Itävaara, 2001; Warne & van Dam, 2008), em NOEC (concentração sem efeito observado) e em LOEC (menor concentração com efeito observado) (Cortet *et al.*, 1999; Warne & van Dam, 2008). Os valores de NOEC e LOEC, são geralmente determinados usando análises de variância seguidas de testes de comparação múltiplos (e.g. teste de Dunnett). As concentrações baixas deverão ser testadas, assim como as concentrações que causam efeitos em percentagens elevadas (e.g. EC50 – 50% ou mais) (Warne & van Dam, 2008).

O impacto dos poluentes e outros factores perturbadores sobre a estrutura e função das comunidades de nemátodes do solo são geralmente avaliados através da utilização de diversos índices ecológicos (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006) que são complementares à avaliação toxicológica. Por exemplo, o índice de Shannon (H') segundo o qual são atribuídos pesos iguais a todos os nemátodes, é uma medida da diversidade; o índice de Simpson (DS,) que atribui maior peso aos nemátodes mais abundantes, é uma medida de dominância; o índice de diversidade trófica (T) que é relativo à estrutura trófica (grupos tróficos) (Goulart, 2009); o índice de maturidade (IM), calculado com a média ponderada dos valores c-p para todos os nemátodes individualmente, com excepção dos parasitas das plantas que têm o seu próprio índice (PPI), o qual é calculado separadamente (Sochová *et al.*, 2005). O índice de maturidade (IM) e o índice dos nemátodes parasitas das plantas (PPI) reflectem mudanças reais na comunidade de nemátodes (Yeates, 1999). O IM foi proposto como um indicador da condição do ecossistema do solo e o PPI é baseado nos efeitos da distribuição geográfica dos nemátodes (Yeates & Bongers, 1995). A relação PPI/IM poderá reflectir o enriquecimento do ecossistema (Yeates & Bongers, 1995). Relativamente aos grupos tróficos poderá ser calculada a relação entre fungívoros (FF) e bacteriófagos (BF) – FF/BF – que revela qual a via de decomposição de matéria orgânica que prevalece no solo, e entre os fungívoros (FF) e bacteriófagos (BF) com parasitas das plantas (PP) – (FF+BF)/PP – relativa à dominância trófica (microrganismos ou plantas) (Goulart, 2009).

4.1. Produtos Fitofarmacêuticos

As práticas de gestão que incluem a aplicação frequente de produtos fitofarmacêuticos (pesticidas) para assegurar e proteger as culturas, afectam o cultivo, a qualidade e os processos do solo e muitas vezes alteram a composição da comunidade da fauna do solo (Neher and Barbercheck, 1998; Simões, 2005; Yeates, 1999). Estes produtos podem ser específicos para um dado organismo, mas os seus efeitos sobre outros organismos muitas vezes não são conhecidos (Riggs *et al.*, 1989). Por isso, as relações entre a estrutura do pesticida e os microrganismos do solo associadas à fertilidade do solo não são facilmente previsíveis (Lo, 2010). A designação dos produtos fitofarmacêuticos está de acordo com o fim a que se destinam (insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematodocidas) podendo ter acção em diferentes processos vitais dos organismos, incluindo os sistemas respiratório, enzimático e nervoso, de forma a tornarem-se letais (Henriques, 2010; Noling, 1997). Os efeitos dos pesticidas sobre os microrganismos do solo e a fertilidade do mesmo devem ser determinados (Lo, 2010).

A fumigação do solo com biocidas em geral diminui as populações microbianas e quase elimina os nemátodes. Embora posteriormente ocorra a recuperação, a densidade populacional de nemátodes do solo não consegue retomar os níveis anteriores à fumigação (Neher, 2010). O nível de toxicidade e o tempo a que o organismo fica exposto ao produto químico potenciam alguns riscos no que diz respeito à introdução de resíduos no solo causando intoxicações nos organismos, à persistência e acumulação na cadeia alimentar em consequência da sua difícil degradação e a riscos para a biodiversidade e indução de resistência em alguns organismos (Simões, 2005). Como o funcionamento dos ecossistemas do solo é dependente dos processos biológicos torna-se importante assegurar que as novas gerações de nemátodes não fiquem comprometidas com a utilização excessiva de produtos fitofarmacêuticos (Simões, 2005).

4.2. Metais

Os metais podem ser encontrados em diversas quantidades, em todos habitats e locais: solos, água, sedimentos e plantas. Geralmente, os solos contêm uma grande variedade de metais (e.g. Fe, Zn, Cu, Cd, Pb) numa gama variada de concentrações, dependendo do ambiente geológico circundante e das actividades naturais e antrópicas que ocorrem (Dube *et al.*, 2000). Há, assim, metais de diferentes proveniências, principalmente da indústria, da

deposição húmida ou seca, do lodo do esgoto, da fertilização e da aplicação de pesticidas responsáveis pela poluição dos agroecossistemas (Bakonyi *et al.*, 2002).

A presença de metais nos solos representa um risco ambiental significativo e um dos problemas de contaminação mais difícil de resolver. Tal deve-se a duas razões principais: por um lado, o carácter químico dos metais - não sendo submetidos a processos de biodegradação acumulando-se no ambiente e, por outro, devido à complexidade da matriz do solo (Dube *et al.*, 2000). Uma vez introduzidos no ambiente por qualquer via, os elementos químicos com metais podem espalhar-se para várias das componentes ambientais, dependendo da natureza das interacções que ocorrem nesse sistema natural. Os metais podem ainda interagir química ou fisicamente com os compostos naturais, alterando a sua forma de apresentação no meio ambiente (Dube *et al.*, 2000). Há indicação de que os metais podem encontrar-se parcialmente adsorvidos ao solo, tornando-se menos tóxicos para os nemátodes do que se estivessem expostos a estes directamente na água (Sánchez-Moreno *et al.*, 2005).

Diversos estudos comprovaram que os metais contribuem para o decréscimo da densidade de nemátodes, influenciando negativamente a comunidade de nemátodes do solo (Bakonyi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009; Khortals *et al.*, 1996; Sanchez-Moreno *et al.*, 2005). Os metais têm efeito negativo sobre a composição dos diversos grupos tróficos de nemátodes, afectando a reprodução, a proporção dos sexos, o desenvolvimento e a sobrevivência (Pen-Mouratov *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve como objectivo principal estudar os efeitos de diversos compostos fitofarmacêuticos e de metais sobre os nemátodes do solo a um nível funcional, ou seja, ao nível da comunidade.

Pretendemos, mais especificamente, com esta investigação:

- 1) conhecer a reacção da comunidade de nemátodes a insecticidas e fungicidas (óleo de verão, abamectina e fosetil) e a metais (cádmio, zinco e cobre) ao nível da abundância total de nemátodes, abundância dos diferentes grupos tróficos e da composição das famílias de nemátodes;
- 2) conhecer a sensibilidade dos diferentes grupos e famílias de nemátodes à contaminação directa do solo por estes compostos e elementos;
- 3) avaliar a utilização dos nemátodes como bioindicadores do solo.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. Material e Métodos

1. Obtenção do solo

1.1. Proveniência do solo e amostragem

O trabalho foi realizado com solo colhido no norte de Portugal. O solo usado para os ensaios toxicológicos foi colhido no Centro Interpretativo do Carvalho de Calvos, Póvoa de Lanhoso, numa horta em que é praticada agricultura biológica certificada, numa parcela com nabiça (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) semeada recentemente. Nesta horta é utilizada unicamente fertilização orgânica, através de um composto produzido localmente com estrume (de cavalo) e resíduos verdes (resultantes dos cortes de relva e das folhas provenientes da limpeza dos jardins) (Figura 1A).

O estudo prévio da eficiência de dois métodos de extracção de nemátodes foi realizado em Outubro, com solo colhido em Palme (Barcelos), numa quinta onde não são aplicados pesticidas ou fertilizantes químicos há pelo menos dois anos, num sector onde estavam plantadas macieiras. A fertilização orgânica utilizada é obtida localmente com estrume (de galinha) e resíduos verdes (provenientes de restos de outras culturas e de cortes de relva) (Figura 1B).

As amostras de solo foram colhidas em diferentes pontos ao longo dos sectores, a cerca de 10-20 cm de profundidade, após ter sido retirada a vegetação superficial. As diversas amostras foram posteriormente misturadas com cuidado e este solo foi mantido em sacos de polietileno numa câmara frigorífica a 4 °C , no escuro, até ao seu processamento (Bongers & Bongers, 1997).

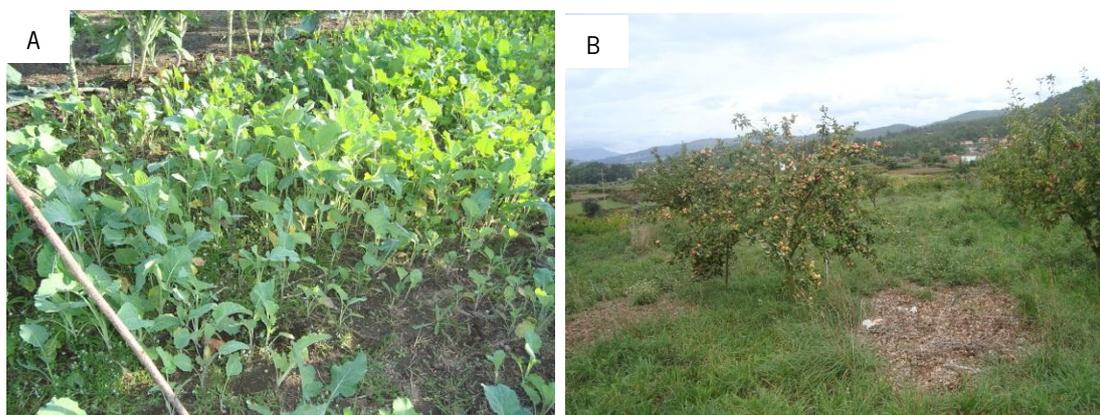


Figura 1 – Locais onde foi colhido o solo para o estudo. A - Horta com nabiça (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) (Calvos); B – Pomar com macieiras (Palme).

1.2. Caracterização do solo

Foram determinados alguns parâmetros abióticos do solo. Foi medido o pH (Brenes *et al.*, 1995), avaliado o teor de matéria orgânica através do método da perda à ignição a 550 °C ± 25 °C (Allen, 1989; Margensin & Schinner, 2005) e determinada a capacidade de retenção de água (WHC; ISO, 1999).

2. Extracção e identificação dos nemátodes do solo

2.1. Comparação de métodos de extracção

Foram comparados dois métodos de extracção de nemátodes do solo para avaliação da sua eficiência de extracção para os ensaios. Para este efeito foi utilizado o solo proveniente de Palme.

2.1.1. Método de sedimentação e crivagem

Para este ensaio foram utilizados volumes de 30, 50 e 100 cm³ de solo (5 réplicas de cada).

Uma parte do solo colhido foi processada segundo um método de sedimentação e crivagem (Almeida, 1993; Coyne *et al.*, 2007), com algumas modificações introduzidas.

Num balde de aproximadamente 5 litros de capacidade foi colocado o solo peneirado através de um crivo de 5 mm de malha para retirar pedras e material mais grosseiro, que foi seguidamente misturado com água da torneira através de movimentos circulares com a mão, deixando-se depois assentar durante 25 segundos. Verteu-se então a mistura, através de um crivo de 2 mm inclinando cuidadosamente o crivo de forma a que os nemátodes rolassem sobre este sem ficarem esmagados. Os resíduos e os nemátodes retidos na malha foram lavados com um esguicho de água para um copo de 250 ml de capacidade. O balde, com o restante solo voltou a ser enchido com água da torneira e fez-se rodopiar novamente a mistura, deixando-se repousar novamente, mas agora durante apenas 15 segundos, repetindo-se o processo de crivagem e lavagem para o copo com a mistura anterior. A suspensão foi colocada num funil com papel absorvente suportado por uma rede e deixou-se escorrer. O funil foi fechado no fundo com uma pinça de Mohr e foi enchido com água da torneira de forma a que o papel absorvente ficasse em contacto com a água (Figura 2). Após 18 horas, os nemátodes que se acumularam no fundo do funil foram recolhidos, retirando-se cerca de 25 ml daquela água, para outro copo de vidro. A suspensão com os nemátodes ficou a repousar durante, aproximadamente 15

minutos e a água sobrenadante foi aspirada até cerca de 10-15 ml. Após este período, foi possível observar os nemátodes para a identificação e sua quantificação.



Figura 2 – Esquema da montagem dos funis de Baermann para a clarificação final das suspensões de nemátodes obtidas por sedimentação e crivagem.

2.1.2. Método do tabuleiro de Whitehead e Hemming

Outra parte do solo colhido também em Palme foi utilizado para a extracção dos nemátodes segundo uma adaptação do método do tabuleiro de Whitehead e Hemming (Abrantes *et al.*, 1976). Foram utilizados os mesmos volumes referidos no ponto anteriores (secção 2.1.1.) e o mesmo número de réplicas.

Inicialmente procedeu-se à remoção de pedras e detritos volumosos do solo (Coyne *et al.*, 2007), tendo este sido seguidamente espalhado cuidadosamente sobre uma película de papel permeável, não muito denso, suportado por uma rede e colocado num tabuleiro de plástico, sem tocar no fundo. Foi então adicionada água da torneira ao fundo do tabuleiro, de forma a ficar em contacto com o solo, mantendo a sua superfície apenas humedecida. Os tabuleiros foram mantidos numa sala isolada, sem agitação, duante 48 horas. Após este tempo, a rede com o solo foi retirada cuidadosamente e a água do tabuleiro foi vertida para um copo de 500 ml, onde a suspensão de nemátodes ficou a assentar durante 4 horas para que estes se concentrassem no fundo. Após este tempo a água sobrenadante foi aspirada cuidadosamente até obtenção de um volume de apenas 100 ml (Abrantes *et al.*, 1976) (Figura 3). Este método foi previamente testado para se determinar o número de nemátodes extraídos após 24 horas e passadas 48 horas.



Figura 3 – Tabuleiros montados com solo para a extracção dos nemátodes.

2.2. Identificação dos nemátodes

De cada uma das réplicas dos vários volumes (ver secção 2.1) foram observadas 3 alíquotas de 10 ml de suspensão em placas de contagem de perspex de Wageningen[®] (Wageningen Agricultural University), recorrendo a um microscópio invertido (Olympus CK 40-F200) para a identificação ao nível da família e grupos tróficos e para a quantificação dos nemátodes presentes. Este volume foi dividido por volumes menores para facilitar a observação. Sempre que necessário os nemátodes foram retirados da suspensão, e separados, com o auxílio de uma pestana aderente a uma vareta de vidro fina, e montados entre uma lâmina e uma lamela, numa gota de água limpa, para a identificação através de um microscópio óptico. Por vezes foi necessário matar os nemátodes pelo calor, para a sua imobilização, para esclarecer a sua identificação em ampliações superiores.

A identificação taxonómica foi realizada recorrendo a bibliografia diversa (em particular Bongers, 1994) e foi feita com base em aspectos morfológicos de estruturas como a região da cabeça e peças bucais, esófago, cutícula, sistema reprodutor e cauda.

2.3. Determinação da eficiência da taxa de recuperação

Todos os ensaios foram realizados em copos de plástico pequenos (com capacidade de aproximadamente 100 cm³). Em cada copo (5 réplicas), perfurado na parte superior e tapado com tampa de vidro (metade de uma caixa de Petri pequena), foram colocados 50g de solo previamente desfaunado.

Antes do início dos ensaios foi verificada a eficiência da taxa de recuperação dos nemátodes após 3 dias. De forma a que o ajuste de humidade não ultrapassasse 50% da sua WHC foi adicionado um volume de solução contendo 330 nemátodes e 3 ml de solução de enriquecimento preparada previamente (secção 3.1.). Os copos foram colocados numa estufa a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 3 dias. Após este tempo os nemátodes foram identificados ao nível da família, e quantificados, através de um microscópio invertido e, quando necessário, recorrendo a um microscópio óptico.

3. Ensaio ecotoxicológico

3.1. Preparação do solo

Inicialmente o solo foi peneirado através de um crivo (5 mm de malha); em seguida foi desfaunado (Figura 4) por meio de três ciclos de congelamento (a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas) e descongelamento (à temperatura ambiente, durante 48 horas) (Natal-da-Luz *et al.*, 2009).

Entretanto o solo foi enriquecido com comunidade microbiana através da adição de uma solução obtida a partir de outra amostra de solo fresco (solo fresco: água destilada na proporção de 1:5, misturado, num agitador, durante 30 minutos) (Natal-da-Luz *et al.*, 2009), de forma a não ultrapassar a capacidade de retenção de água. A humidade do solo foi ajustada a aproximadamente 50% da sua WHC, antes de se proceder à inoculação com nemátodes (Amorim *et al.*, 2007; Natal-da-Luz *et al.*, 2009).



Figura 4 - Solo num saco de polietileno, no ciclo de congelamento - descongelamento, para a desfaunagem.

3.2. Extracção dos nemátodes

Para os ensaios ecotoxicológicos foi utilizado o solo colhido no Centro Interpretativo do Centro do Carvalho de Calvos.

Para a extracção da comunidade de nemátodes do solo, este foi utilizado fresco. Os nemátodes foram extraídos do solo pelo método do tabuleiro, como descrito anteriormente (secção 2.1.2.). Para este efeito foram utilizados cerca de 100 cm³ de solo em cada tabuleiro.

3.3. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos

Os produtos com propriedades fitofarmacêuticas usados nesta investigação foram os seguintes: o hidrocarboneteo insecticida óleo de verão (Soleol – Agroquisa, 80%), a avermectina acaricida – insecticida abamectina (Boreal – SAPEC AGRO, 1,8%) e o fosfanato fungicida fosetil (Maestro M – SAPEC AGRO, 35%).

As concentrações do ingrediente activo (a.i.) para cada produto foram respectivamente: 0 (controlo), 0,24 g a.i./Kg, 0,36 g a.i./Kg e 0,48 g a.i./Kg; 0 (controlo), 0,0064 g a.i./Kg, 0,0096 g a.i./Kg e 0,0128 g a.i./Kg; 0 (controlo), 0,5 g a.i./Kg, 0,75 g a.i./Kg e 1 g a.i./Kg.

Os ensaios decorreram utilizando copos de plástico, tal como já descrito na secção anterior. Em cada copo foram colocados 50 g de solo desfaunado. A humidade do solo foi mantida a 50% da sua WHC, adicionando-se 5 ml de solução para enriquecimento do solo com comunidade microbiana, juntamente com o produto fitofarmacêutico. Seguidamente, a meio do solo, foi adicionado um volume de suspensão de nemátodes proporcionando um inóculo de cerca de 1000 indivíduos e de modo a que a WHC não fosse ultrapassada. Para o controlo procedeu-se de igual forma, sem produto químico. Os copos foram colocados numa estufa a 20 °C ± 2 °C, no escuro, durante 15 dias (adaptado de Kolar *et al.*, 2007) (Figura 5).

3.4. Efeito dos metais

Para testar o efeito dos metais na comunidade de nemátodes procedeu-se da mesma forma que anteriormente para os produtos fitofarmacêuticos. Os metais usados foram o cádmio, o zinco e o cobre, nas seguintes concentrações: 0 (controlo), 100 mg/Kg, 500 mg/Kg e 1000 mg/Kg.



Figura 5 – Copo preparado para um ensaio, contendo 50 g de solo (enriquecido com comunidade bacteriana), Zn e os nemátodes.

3.5. Identificação e quantificação dos nemátodes

Recorrendo a um microscópio invertido (Olympus CK 40-F200) os nemátodes foram observados (com ampliações de 100x e 200x) e identificados ao nível da família, e quantificados. Quando os nemátodes na placa de contagem eram muito numerosos, foram contados em metade da placa, estimando-se o seu número total por extrapolação. Os nemátodes, sempre que necessário, foram retirados da suspensão e separados, com o auxílio de uma pestana e transferidos para fixador TAF, após morte rápida por calor, à chama (Coyne *et al.*, 2007). Por vezes os nemátodes foram fotografados (400x ou 100x) através do microscópio óptico (Leica-DM 5000B), recorrendo ao programa LAS AF.

Relativamente a cada tratamento (diferentes concentrações dos três compostos fitofarmacêuticos e dos três metais), foi registado o número de indivíduos de cada família sendo estes depois agrupados segundo os diferentes tipos tróficos.

4. Análise estatística

A eficiência dos métodos de extracção dos nemátodes foi submetida a uma análise de variância (ANOVA) e de similaridade (ANOSIM).

Os efeitos de cada composto fitofarmacêutico e de cada metal sobre a abundância total dos nemátodes, a abundância de cada grupo trófico e o número de famílias foram avaliados submetendo os dados à análise de variância ANOVA, seguida de comparações com o controlo (testes de Dunnet e Tykey) para obtenção dos valores de NOEC (concentração sem efeito

observado), LOEC (menor concentração com efeito observado) e EC50 (concentração efectiva com efeito a 50%).

Através do software PRIMER 5.0 foram efectuadas análises de similaridade (ANOSIM) e dissimilaridade (SIMPER). Cada análise permite conhecer que tratamentos são mais semelhantes entre si e que famílias e grupos tróficos contribuem para as diferenças entre os tratamentos.

Para a estimativa da diversidade e nível de perturbação de cada tratamento foram determinados os seguintes índices de diversidade: Shannon-Weaver (H') e Simpson (DS) (Yeates & Bongers, 1995), índice de maturidade (IM) e índice para parasitas de plantas (PPI) (Bongers, 1990), a razão PPI/IM (Bongers, 1997), diversidade trófica (T) (Freckman & Ettema, 1993) e as razões entre fungívoros ("fungal feeders") e bacteriófagos ("bacterial feeders") (FF/BF) e entre fungívoros mais bacteriófagos e parasitas de plantas ("plant-parasitic") ((FF+BF)/PP) (Wasilewska, 1994) que revelam quais os grupos tróficos que prevalecem na decomposição da matéria orgânica e qual o grupo que domina em cada tratamento, respectivamente.

III. RESULTADOS

III. Resultados

1. Eficiência de extracção dos nemátodes do solo

1.1. Caracterização do solo

O solo colhido para o estudo da eficiência de extracção dos nemátodes tinha uma capacidade de retenção de água de 44,5%, pH 6,0 e 10,6% de matéria orgânica.

2. Extracção e identificação dos nemátodes do solo

2.1. Comparação dos métodos de extracção

2.1.1. Método de sedimentação e crivagem

Os resultados do método de sedimentação e crivagem demonstraram que a extracção de nemátodes não diferiu significativamente (ANOVA; $p > 0,05$) entre as diferentes quantidades de solo e que o número de nemátodes extraídos variou, em média, entre 700 e 900 indivíduos (Figura 6).

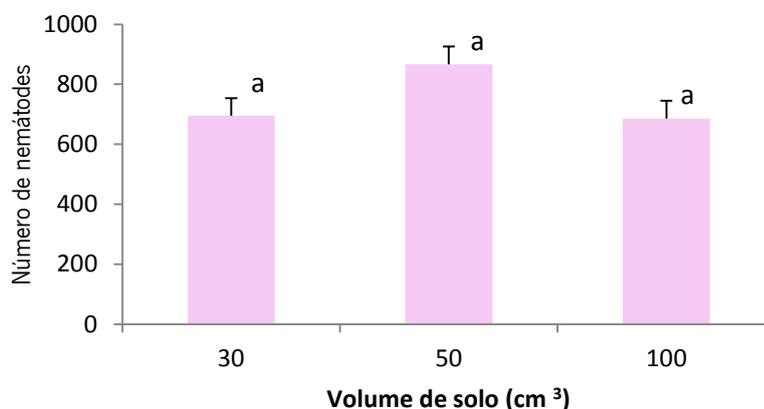


Figura 6 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos pelo método de sedimentação e crivagem, a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm³ de solo ("a" indica ausência de diferenças significativas).

No volume de 100 cm³ de solo as famílias com maior representatividade foram Rhabditidae (249); para 50 cm³ de solo as famílias que mais se destacaram foram Cephalobidae (157), Tylenchidae (138) e Pratylenchidae (85); no volume de 30 cm³ de solo a família mais representada foi a Hoplolaimidae, com 157 indivíduos. Quanto às restantes famílias, foram extraídos números muito baixos de indivíduos (Figura 7).

Em média, os nemátodes bacteriófagos (Alaimidae, Bastianiidae, Plectidae, Prismatolaimidae, Rhabditidae, Thornematidae) apareceram melhor representados em relação

aos restantes grupos tróficos, no volume de 100 cm³ e nos 30 e 50 cm³, os nemátodes parasitas das plantas (Criconematidae, Hemicycliophoridae, Hoplolaimidae, Longidoridae, Paratylenchidae, Pratylenchidae, Trichodoridae e Tylenchidae) foram os que estiveram presentes em número mais elevado (Figura 7).

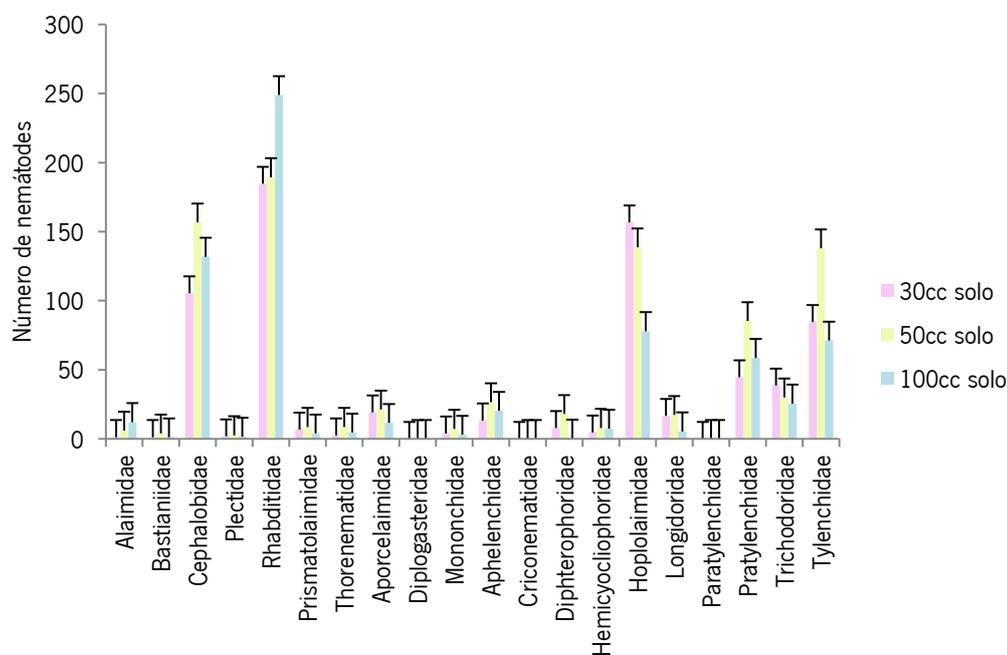


Figura 7 - Número de nemátodes de cada família (média de 5 réplicas), extraídos pelo método de sedimentação e crivagem a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm³ de solo.

2.1.2. Método do tabuleiro de Whitehead e Hemming

O método do tabuleiro de Whitehead e Hemming demonstrou diferenças significativas (ANOVA; $p < 0,05$) na abundância de nemátodes extraídos nas diferentes quantidades de solo. Especificamente, verificou-se que a extracção de nemátodes em 100 cm³ (967 indivíduos) era superior às restantes fracções de solo que, por sua vez, eram semelhantes entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$) (Figura 8).

Verificou-se que existiram diferenças entre os dois métodos de extracção no perfil de similaridade da comunidade das diferentes quantidades de solo (ANOSIM; $R_{global} = 0,487$; ANOVA: $p < 0,005$). Os resultados dos dois métodos mostraram que o método de sedimentação e crivagem permitiu extrair maior número de indivíduos em 30 e 50 cm³ de solo (695 e 867, respectivamente) do que o método do tabuleiro (318 e 462 indivíduos). Por sua vez, foram

extraídos mais indivíduos (967) a partir de em 100 cm³ de solo, pelo método do tabuleiro que o método de sedimentação e crivagem (686) (Figuras 6 e 8).

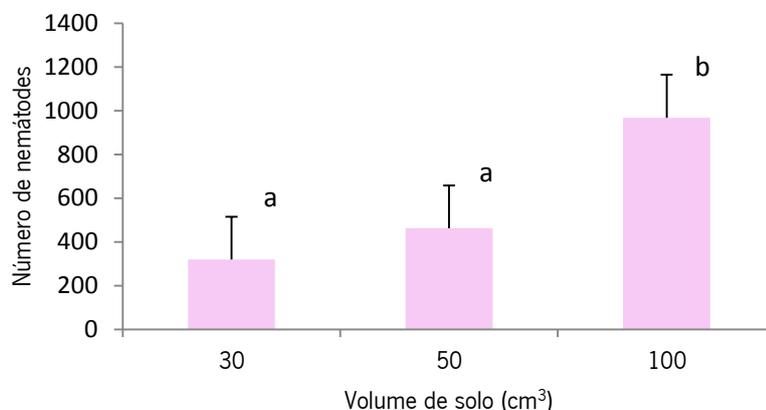


Figura 8 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming, a partir de volumes de 30, 50 e 100 cm³ de solo (a e b indicam diferenças; letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre volumes do solo).

Pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming foi possível extrair do solo nemátodes pertencentes a 18 famílias. Na generalidade todas as famílias estiveram presentes com um maior de indivíduos superior quando extraídos de 100 cm³ de solo, não havendo grandes diferenças no número de nemátodes entre 30 e 50 cc de solo (ANOVA; $p > 0,05$).

As famílias com um maior número de indivíduos extraídos, nos três volumes de solo, foram: Rhabditidae (226), Tylenchidae (205), Cephalobidae (150) e Pratylenchidae (97) (Figura 9). Foi observado que os nemátodes das famílias Bastianiidae (67), Pristomatolaimidae (67) e Alaimidae (59) encontraram-se em maior número através da extração pelo método do tabuleiro do que pelo método de sedimentação e crivagem, e segundo este, praticamente ausentes (Figuras 7 e 8). As restantes famílias estavam representadas por um número muito baixo de indivíduos.

Em média os nemátodes bacteriófagos encontraram-se, em todos os volumes de solo, em maior número em relação aos restantes grupos tróficos. De 100 cc de solo foram extraídos cerca de 500 nemátodes bacteriófagos (Figura 9).

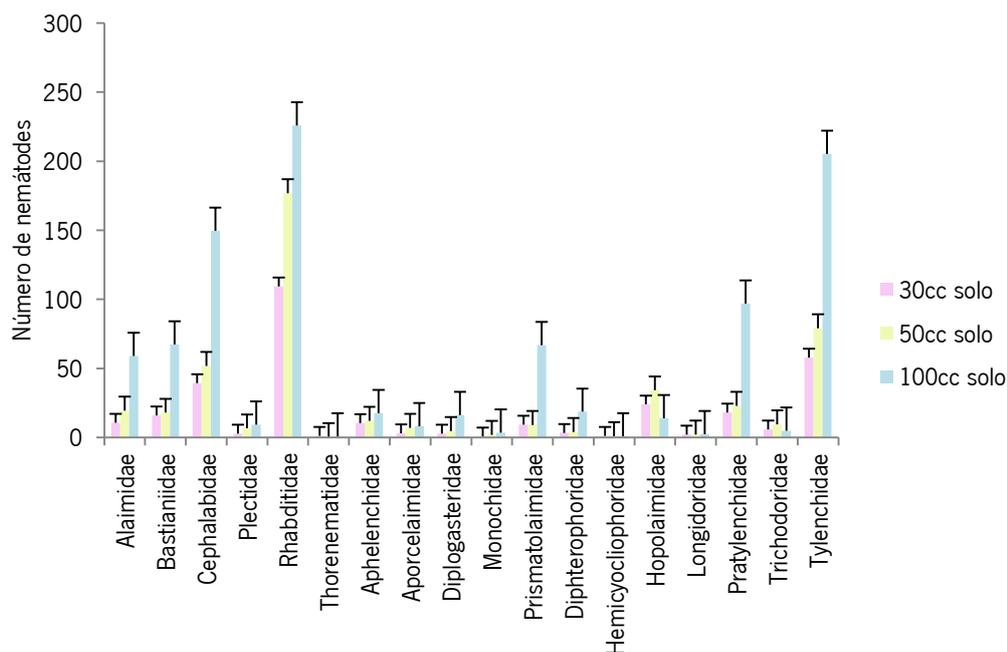


Figura 9 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas,) em cada família, extraídos pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming a partir de volumes de solo de 30, 50 e 100 cm³ de solo.

Os resultados obtidos em diferentes tempos de extracção de nemátodes pelo método do tabuleiro não revelaram diferenças significativas entre as 24 e 48 horas (Two-Way ANOVA; $p > 0,05$). Na generalidade, nas primeiras 24 horas grande parte dos nemátodes tinha sido extraída do solo e, nas 24 horas seguintes, foi extraído um número de nemátodes inferior (≈ 150) (Figura 10).

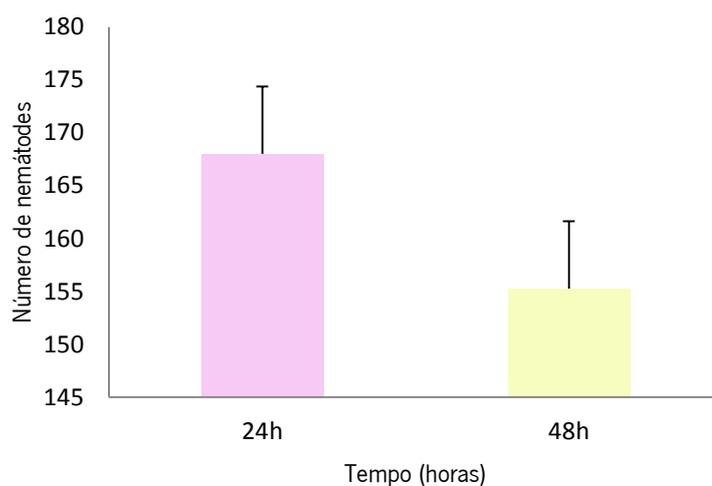


Figura 10 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) extraídos, de 50 cm³ de solo, pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming, após 24 e 48 horas.

2.2. Identificação dos nemátodes

Neste solo foi possível identificar nemátodes pertencentes a 20 famílias. Destas, sete representavam nemátodes bacteriófagos (Alaimidae, Bastianiidae, Cephalobidae, Plectidae, Rhabditidae, Prismatolamidae e Thorneimataidae), outras três famílias eram nemátodes predadores e omnívoros (Aporcelaimidae, Diplogasteridae e Mononchidae), duas englobavam nemátodes fungívoros (Aphelenchidae e Diphterophoridae) e os nemátodes parasitas das plantas estavam representados por oito famílias (Criconeimatidae, Hemicyclophoridae, Hoplolaimidae, Longidoridae, Paratylenchidae, Trichodoridae e Tylenchidae) (Figura 7 e 9).

2.3. Determinação da eficiência da taxa de recuperação

A extração dos nemátodes do solo, três dias após terem sido adicionados ao solo, e mantidos num estufa com temperatura controlada, revelou que o número de nemátodes (em média) era aproximadamente 30% da abundância inicial (Figura 11).

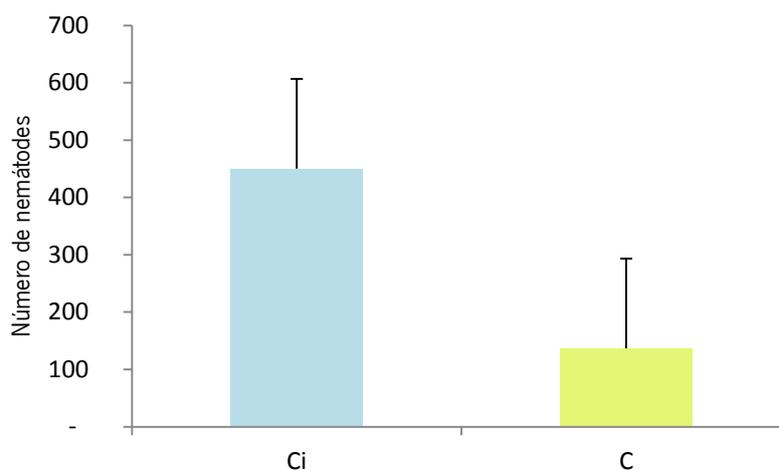


Figura 11 - Número de nemátodes (média de 5 réplicas) três dias após terem sido adicionados ao solo, no escuro, a temperatura controlada, (Ci, comunidade inicial; C, comunidade após 3 dias).

3. Ensaio ecotoxicológicos

3.1. Caracterização do solo

O solo colhido para os ensaios ecotoxicológicos tinha uma capacidade de retenção de água de 30,5%, pH 6,0 e 6,2% de matéria orgânica. Deste solo foram extraídos em média 2000 nemátodes por 100 cm³ de solo, pertencentes a 18 famílias. Cinco famílias de nemátodes bacteriófagos, oito de parasitas de plantas, três de predadores e omnívoros e duas de fungívoros (Tabela I).

3.2. Ensaio com produtos fitofarmacêuticos

3.2.1. Avaliação da diversidade

Nos ensaios com produtos fitofarmacêuticos verificou-se que a comunidade diminuiu com o aumento da concentração do produto. A abamectina foi de longe o produto que provocou maior mortalidade, reduzindo drasticamente a população de nemátodes em todas as concentrações (Tabela I). As famílias Cephalobidae, Rhabditidae, Aphelenchidae, Paratylenchidae e Pratylenchidae, relativamente ao controlo, diminuíram cerca de 50% o número de indivíduos na concentração mais elevada de óleo de verão e fosetil (Tabela I).

As proporções dos diferentes grupos tróficos de nemátodes (Figura 12) demonstraram que nas diferentes concentrações de óleo de verão os nemátodes parasitas das plantas (55%) encontraram-se em número superior, seguindo-se os bacteriófagos (35%). Os nemátodes fungívoros e predadores-omnívoros apresentaram-se em menor número, 10% e 1%, respectivamente.

No tratamento com fosetil os nemátodes parasitas das plantas e bacteriófagos encontraram-se em proporções semelhantes. Os nemátodes fungívoros aumentaram ligeiramente nas concentrações mais elevadas e os predadores-omnívoros não estiveram presentes nas três concentrações (C1, C2 e C3).

Apesar da elevada mortalidade no tratamento com abamectina a proporção de nemátodes bacteriófagos (60%) é maior em relação aos nemátodes parasitas das plantas (20%). Os nemátodes predadores-omnívoros (15%) estiveram presentes numa percentagem mais alta nas concentrações C1, C2 e C3, em comparação com o controlo (C0), em que são quase inexistentes. Os nemátodes fungívoros deixaram de estar presentes na concentração mais elevada (C3) (Figura 12).

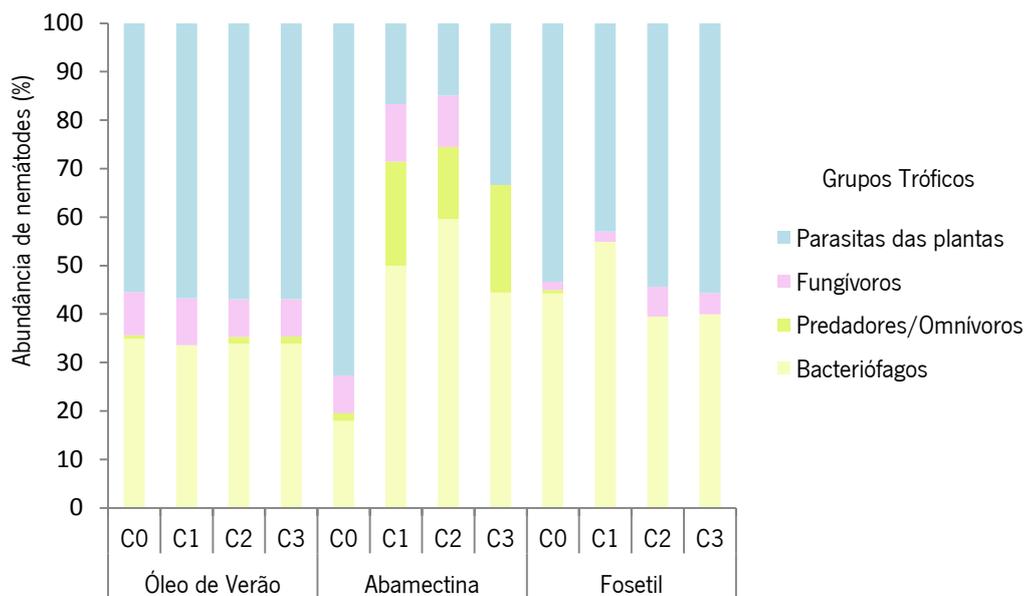


Figura 12 - Proporção dos diferentes grupos tróficos de nemátodos nas diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos.

Tabela I – Número de nemátodes (média de 5 réplicas) pertencentes às diferentes famílias de nemátodes, nas diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos e respectivos valores c-p.

	c-p	Óleo de Verão				Abamectina				Fosetil			
		C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
Bacteriófagos													
Alaimidae	4	6	4	7	1	5	0,2	-	-	1	4	-	-
Bastianiidae	3	6	1	1	-	5	-	-	-	8	-	-	-
Cephalobidae	2	93	59	42	30	81	3	2,4	1	106	77	66	58
Rhabditidae	1	29	22	21	14	19	5	3,2	0,2	28	6	4	5
Prismatolaimidae	3	2	1	-	-	1	0,2	-	-	1	-	-	-
Fungívoros													
Aphelenchidae	2	35	25	16	9	45	2	0,8	0,2	6	6	11	7
Diphterophoridae	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Predadores/Omnívoros													
Aporcelaimidae	5	2	-	2	1	3	3	1,4	0,4	2	-	-	-
Diplogasteridae	1	1	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mononchidae	4	-	-	-	-	0,2	1	-	-	1	-	-	-
Parasitas de Plantas													
Criconematidae	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heteroderidae	3	2	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoplolaimidae	3	-	-	-	-	0,2	-	-	-	0,4	0,4	-	-
Longidoridae	5	-	-	0,4	-	0,4	1	0,2	-	0,4	-	-	-
Paratylenchidae	2	23	14	9	2	14	-	0,2	0,2	28	-	-	-
Pratylenchidae	3	172	120	98	62	81	1	1	0,4	131	107	93	86
Trichodoridae	4	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Tylenchidae	2	18	9	8,8	5	9	1	-	-	14	7	4	2

C0 – controlo; Óleo de Verão: C1 – 0,24 g a.i./Kg, C2 – 0,36 g a.i./Kg, C3 – 0,48 g a.i./Kg; Abamectina: C1 – 0,0064 g a.i./Kg, C2 – 0,0096 g a.i./Kg, C3 – 0,0128 g a.i./Kg; Fosetil: C1 – 0,5 g a.i./Kg, C2 – 0,75 g a.i./Kg, C3 – 1 g a.i./Kg.

Todas as famílias de nemátodes foram classificadas com valores c-p relativamente às suas estratégias de sobrevivência. Os valores c-p mais frequentes foram c-p 3 (Pratylenchidae, Bastianiidae, Pristomatolaimidae, Heteroderidae e Hoplolaimidae) e c-p 2 (Cephalobidae, Aphelenchidae, Paratylenchidae e Tylenchidae) (Tabela I).

Nas diferentes concentrações de óleo de verão e fosetil, os nemátodes classificados com c-p 2 e c-p 3 surgiram em maior número (mais de 90%) (Figura 13 A e C).

No tratamento com abamectina os nemátodes com valores c-p 1 e c-p 2 numa proporção de mais de 60%, e os nemátodes com classificação c-p 5 apareceram numa percentagem de aproximadamente 20% (Figura 13 B).

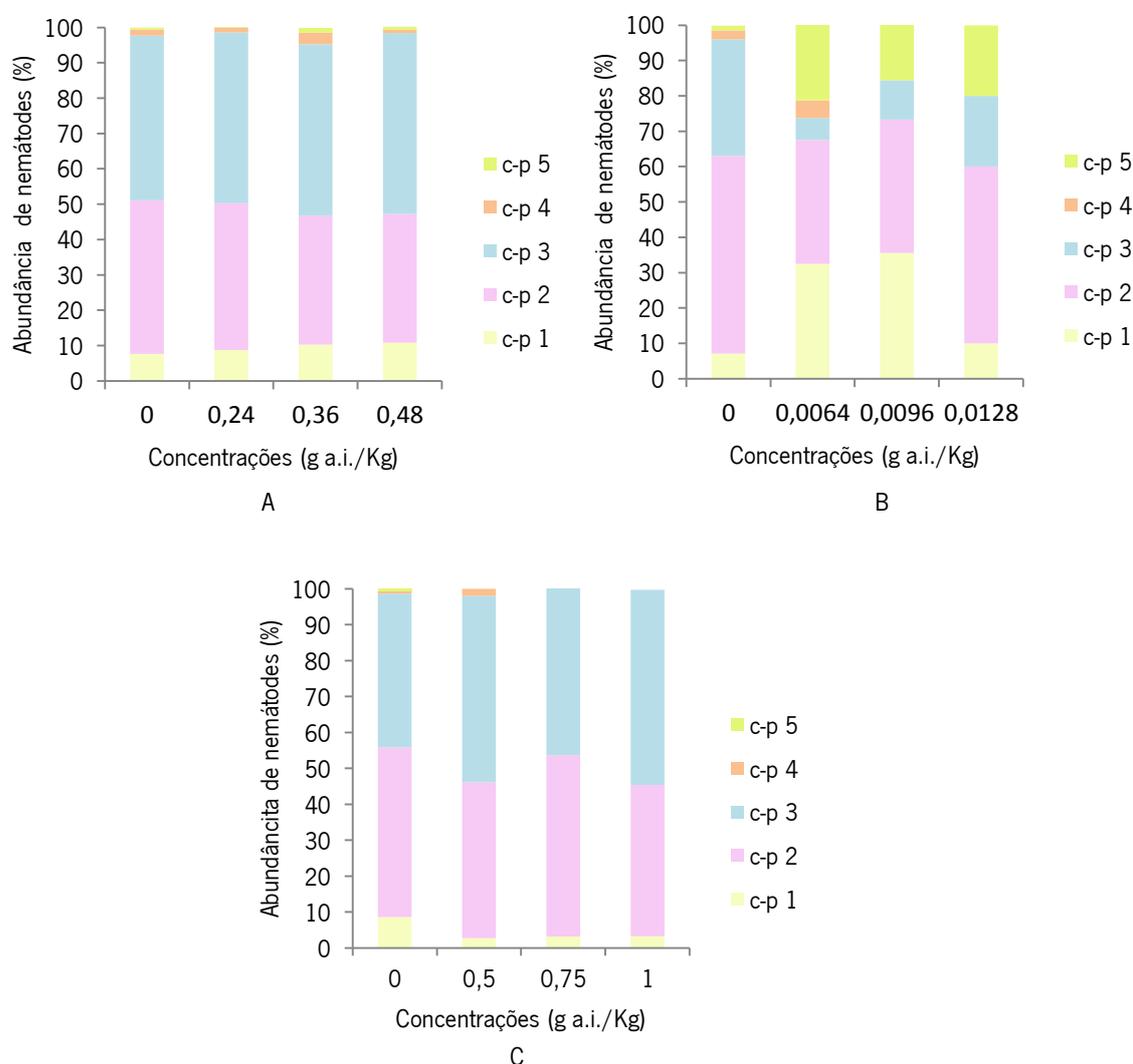


Figura 13 – Efeitos das diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos sobre grupos de nemátodes com diferentes valores c-p. A – Óleo de verão; B Abamectina; C – Fosetil.

A diversidade de nemátodes, avaliada pelo índice de Shannon (H') diferiu entre tratamentos com os diferentes produtos fitofarmacêuticos.

O tratamento com óleo de verão não afectou a diversidade em nenhuma das concentrações aplicadas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$), variando o valor de H' entre 1,40 e 1,60. Nos tratamentos efectuados com abamectina e fosetil os valores de H' exibiram diferenças significativas entre concentrações (one-way, ANOVA; $p < 0,05$). Para ambos os produtos, o índice de Shannon apresentava significativamente valores mais elevados no controlo (1,68 e 1,51, respectivamente) do que nos tratamentos com as concentrações C3 (0,3) e C2 (0,93) (teste de Dunnett; $p > 0,05$) (Tabela II).

Os índices de Simpson (DS) mostraram que não existiam diferenças entre as concentrações dos diferentes produtos (one-way, ANOVA; $p > 0,05$). No entanto, no tratamento com fosetil, verificou-se uma maior dominância das diferentes famílias, apresentando maiores valores de DS, comparativamente com o óleo de verão e a abamectina, que são similares (Tabela II).

Os valores dos índices de diversidade trófica (T) obtidos para os três produtos fitofarmacêuticos, encontraram-se muito próximos entre si e entre as diferentes concentrações de cada produto, não existindo, assim, diferenças significativas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$) (Tabela II).

Os índices de maturidade (IM) também não foram significativamente afectados pelo aumento da concentração de cada produto fitofarmacêutico (one-way, ANOVA; $p > 0,05$) (Tabela II). Em relação aos valores dos índices dos parasitas das plantas (PPI), no tratamento com abamectina foram mais baixos e no tratamento com óleo de verão foram mais elevados. Nenhum dos três tratamentos afectou significativamente os valores dos índices dos parasitas das plantas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$) (Tabela II). Por sua vez, a relação PPI/IM mostrou diferenças significativas no tratamento com abamectina (one-way, ANOVA; $p < 0,05$), com valores entre 3,0 e 0,20. Nos tratamentos com óleo de verão e fosetil não se verificaram diferenças significativas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$), sendo os valores muito semelhantes entre si (Tabela II).

As relações FF/BF e (FF+BF)/PP não diferem significativamente entre os tratamentos com óleo de verão, abamectina e fosetil (one-way, ANOVA; $p > 0,05$). Os valores de FF/BF eram inferiores a 1 em todos os tratamentos e os valores de (FF+BF)/PP eram superiores no tratamento com abamectina (1,67 a 4,51), e menores, no tratamento com óleo de verão, oscilando em torno de 0,70 (Tabela II).

Tabela II - Índices de diversidade para os diferentes produtos fitofarmacêuticos.

Índices	Óleo de Verão				Abamectina				Fosetil			
	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
H'	1,60	1,54	1,49	1,57	1,68	1,47	0,90	0,30	1,51	1,07	0,99	0,93
Ds	0,28	0,28	0,29	0,33	0,23	0,15	0,20	0,03	0,28	0,41	0,42	0,46
IM	1,24	1,21	1,20	1,20	0,76	2,30	2,36	1,94	1,30	1,58	1,27	1,23
PPI	1,73	1,76	1,77	1,77	2,27	0,53	0,48	0,94	1,67	1,35	1,70	1,74
PPI/IM	1,39	1,45	1,48	1,48	3,00	0,23	0,20	0,48	1,29	0,85	1,34	1,42
BF	8x10 ³	9x10 ³	9x10 ³	8x10 ³	6x10 ³	4x10 ³	3x10 ³	6x10 ³	5x10 ³	6x10 ³	6x10 ³	6x10 ³
FF	1x10 ²	1x10 ³	2x10 ³	2x10 ³	4x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ²	3x10 ¹	1x10 ¹	3x10 ²	5x10 ²
T												
P/OM	1,95	0	0,55	2,50	0,61	2x10 ³	4x10 ³	3x10 ³	1,86	0	0	0
PP	3x10 ³	3x10 ³	3x10 ³	3x10 ³	6x10 ³	3x10 ³	4x10 ³	1x10 ³	4x10 ³	3x10 ³	3x10 ³	3x10 ³
FF/BF	0,26	0,29	0,23	0,20	0,43	0,19	0,14	0,25	0,04	0,04	0,15	0,11
(FF+BF)/PP	0,79	0,77	0,73	0,74	0,35	3,57	4,57	1,67	0,86	1,32	0,84	0,79

H' - índice de Shannon-Weaver; J' - índice de Simpson; IM - índice de maturidade; PPI - índice de maturidade para parasitas de plantas; T - índice de diversidade trófica; BF - Bacteriófagos; FF - Fungívoros; P/OM - Predadores e Omnívoros; PP - Parasitas de Plantas.

3.2.2. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na abundância total dos nemátodes

A abundância total de nemátodes diminuiu em todos os tratamentos (Figura 14), variando a rapidez com que cada produto afecta a comunidade. A concentração mais baixa que provocou um decréscimo significativo da abundância total (LOEC) nos tratamentos com abamectina e fosetil correspondeu aos valores de 0,0064 g a.i./Kg e 0,5 g a.i./Kg, respectivamente (teste de Dunnett, $p > 0,05$). Por sua vez, no tratamento com óleo de verão a abundância total decresceu significativamente na concentração 0,36 g a.i./Kg (LOEC) (one-way, ANOVA; teste de Dunnett; $p < 0,05$). Os valores de EC50 foram baixos nos tratamentos com óleo de verão e abamectina, sugerindo uma toxicidade significativa (teste de Dunnett; $p < 0,05$) no decréscimo da abundância total de nemátodes, e no tratamento com fosetil o valor de EC50 para a abundância total não foi significativo (teste de Dunnett, $p > 0,05$) (Tabela III).

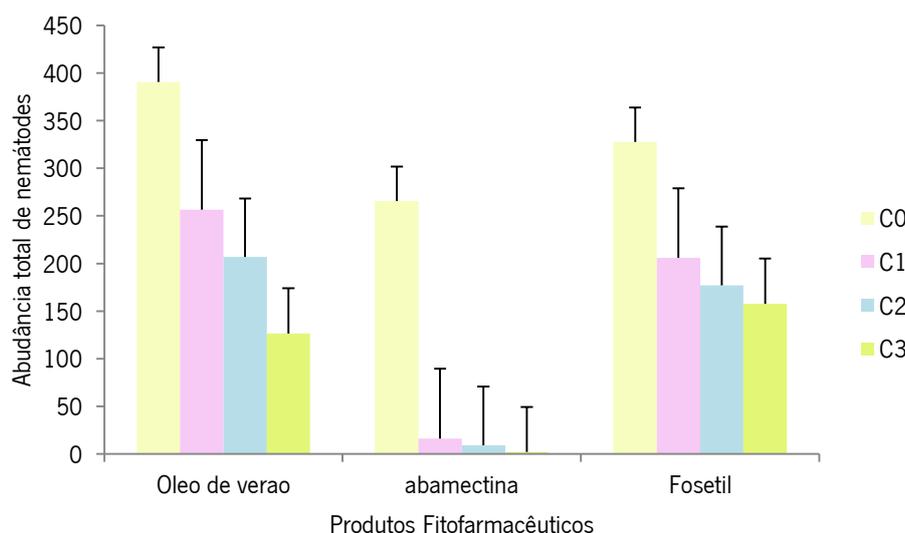


Figura 14 – Efeitos das diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos (óleo de verão, fosetil e abamectina) sobre a abundância total de nemátodes (média de 5 réplicas).

3.2.3. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na composição das famílias de nemátodes

Os produtos utilizados mostraram ser muito tóxicos ao nível da diversidade de famílias na comunidade (Figura 15).

No tratamento com óleo de verão o decréscimo do número de famílias não foi significativo (one-way, ANOVA; $p > 0,05$). Porém, a diminuição de número de indivíduos das famílias mais representativas foi significativa (one-way, ANOVA; $p < 0,05$) (Tabela III). A

concentração de óleo de verão de 0,24 g a.i./Kg correspondeu ao valor de LOEC para as famílias Cephalobidae e Tylenchidae (teste de Dunnett; $p < 0,05$). Nas famílias Rhabditidae, Aphlenechidae e Pratylenchidae, o valor de LOEC (i.e. que provocou um decréscimo significativo na abundância das famílias) foi observado na concentração mais elevada (one-way ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$; NOEC=0,36 ga.i./Kg). Nas restantes famílias não foi observado efeito (one-way ANOVA, teste de Dunnett: $p > 0,05$).

No tratamento com abamectina o número de famílias sofreu um decréscimo significativo, assim como a abundância total das diferentes famílias (one-way, ANOVA; $p < 0,05$) (Tabela III). Grande parte das famílias sofreu um decréscimo significativo do seu número de indivíduos em concentração mais baixa testada, 0,0064 g a.i./Kg (Alaimidae, Aphelenchidae, Bastianiidae, Cephalobidae, Paratylenchidae, Pratylenchidae, Rhabditidae, e Trichodoridae Tylenchidae) (LOEC; teste Dunnett, $p < 0,05$).

A diminuição do número de famílias e nas famílias mais representativas não foi significativa no tratamento com fosetil (teste Dunnett; $p > 0,05$) (Tabela III). O decréscimo do número de nemátodes nas famílias Aporcelaimidae, Bastianiidae, Paratylenchidae, Pristomatolaimidae, Rhabditidae e Tylenchidae foi observado na concentração mais baixa testada de fosetil (0,5 g a.i./Kg; teste Dunnett, $p < 0,05$). Cephalobidae sofreu um decréscimo dos seus indivíduos na concentração a partir de 1 g a.i./Kg que correspondeu ao valor de LOEC (one-way, ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Através de análises de similaridade e dissimilaridade (ANOSIM e SIMPER) foram observadas diferenças nos três tratamentos, tanto nas diferentes famílias como nos grupos tróficos de nemátodes.

A maior dissimilaridade verificada no tratamento com óleo de verão ($R_{\text{global}}=0,277$; ANOSIM, $p < 0,05$) foi entre o controlo e C3 ($R=0,796$), o controlo e C2 ($R=0,496$). Com R_{global} de 0,405 o tratamento com abamectina apresentou maior dissimilaridade entre o controlo e C1 ($R=0,728$) e o controlo e C3 ($R=0,692$). No tratamento com fosetil ($R_{\text{global}}=0,419$; ANOSIM, $p < 0,05$) as maiores diferenças foram entre o controlo e C2 ($R=0,996$) e controlo e C1 ($R=0,956$).

Na generalidade, as diferenças entre o controlo e as concentrações (C1, C2 e C3) e entre as diferentes concentrações foram da responsabilidade das famílias Pratylenchidae, Cephalobidae, Rhabditidae e Aphlenechidae, em todos os tratamentos (Tabela VII, em anexos).

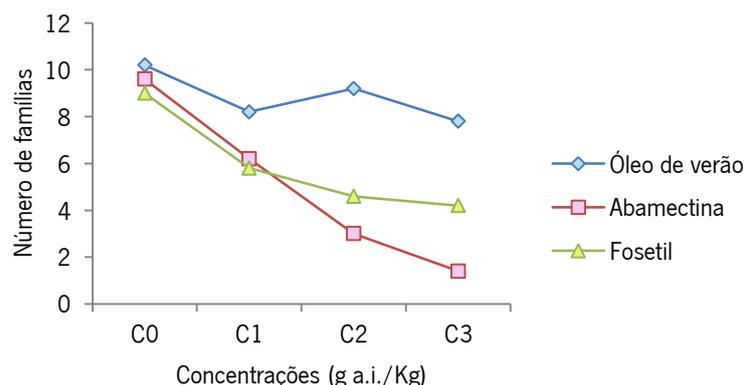


Figura 15 – Efeito das diferentes concentrações dos produtos fitofarmacêuticos no número de famílias dos nemátodos.

3.2.4. Efeito dos produtos fitofarmacêuticos na abundância dos grupos tróficos

A abundância total de todos os grupos tróficos diminuiu em todos os tratamentos (Figura 16). O decréscimo de indivíduos foi significativo (teste Dunnett; $p < 0,05$) nos nemátodes bacteriófagos, fungívoros e parasitas das plantas no tratamento com óleo de verão. Por sua vez, no tratamento com abamectina o decréscimo mostrou-se significativo nos nemátodes bacteriófagos (teste de Dunnett; $p < 0,05$) e no tratamento com fosetil o decréscimo de indivíduos nos grupos tróficos não foi significativo (teste Dunnett; $p > 0,05$) (Tabela III).

O efeito do óleo de verão foi observado em todos os grupos tróficos (excepto nos predadores e omnívoros). Nos nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas o efeito da toxicidade foi observado a partir da concentração 0,36 g a.i./Kg (one-way ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$). Nos nemátodes fungívoros o efeito da toxicidade foi observado a partir da concentração de 0,48 g a.i./Kg (one-way ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$). No tratamento com abamectina o efeito da toxicidade foi observado na concentração mais baixa testada (LOEC= 0,0064 g a.i./Kg) para os nemátodes bacteriófagos, parasitas de plantas e fungívoros (one-way ANOVA, $p < 0,05$). Para os predadores e omnívoros não foi observado efeito (one-way ANOVA, teste de Dunnett: $p > 0,05$).

No tratamento com fosetil o efeito da toxicidade foi observado na concentração 0,5 g a.i./Kg, excepto para os nemátodes fungívoros (one-way ANOVA, teste de Dunnett: $p < 0,05$ e $p > 0,05$, respectivamente).

Nos grupos tróficos a tendência de dissimilaridade foi semelhante à das famílias, havendo maiores diferenças entre o controlo e C3 ($R=0,916$) e controlo e C2 ($R=0,88$) no

tratamento com óleo de verão ($R_{\text{global}}=0,476$; ANOSIM, $p<0,05$). No tratamento com abamectina ($R_{\text{global}}=0,557$; ANOSIM, $p<0,05$) controlo e C1 e controlo e C2 mostraram maior dissimilaridade entre si com $R=0,8$ e $R=0,88$, respectivamente. Por sua vez, no tratamento com fosetil ($R_{\text{global}}=0,252$; ANOSIM, $p<0,05$) as maiores dissimilaridades verificaram-se entre o controlo e C2 ($R=0,852$) e o controlo e C3 ($R=0,632$).

Os grupos tróficos com uma maior contribuição para as dissimilaridades nos tratamentos, em muitos casos ultrapassando os 60%, foram os nemátodes parasitas das plantas, seguidos dos nemátodes bacteriófagos (Tabela VIII, em anexo).

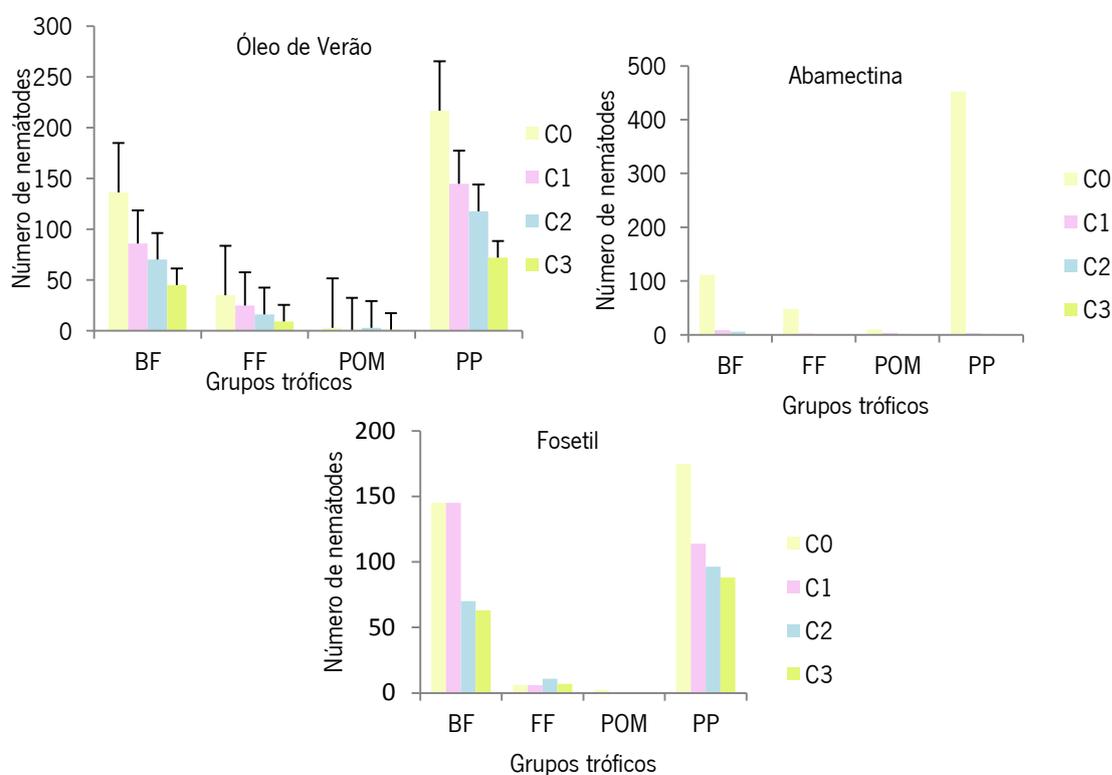


Figura 16 – Efeito das diferentes concentrações (C1 - C3) dos produtos fitofarmacêuticos na abundância dos diferentes grupos tróficos (média de 5 réplicas) - BF: bacteriófagos; FF: fungívoros; POM: Predadores e omnívoros; PP: parasitas de plantas

Tabela III - Valores de EC50 (nível de confiança de 95%) para as famílias mais representativas, grupos tróficos, número de famílias de nemátodes e abundância total, sujeitas às concentrações dos produtos fitofarmacêuticos.

	g a.i./Kg		
	Óleo de Verão	Abamectina	Fosetil
Famílias			
Cephalobidae	0,324 (0,17-0,47)**	0,001 (0,0002-0,0021)**	0,81 (-4,4-6,0)*
Rhabditidae	0,478 (0,26-0,70)**	0,005 (-0,001-0,01)*	0,11 (-0,07-0,28)*
Aphelenchidae	0,339 (0,13-0,35)**	0,001 (-0,004-0,007)*	0,45 (-7,9-8,8)*
Aporcelaimidae	0,500 (0,5-0,5)**	0,009 (-2,5x10 ⁻² -2,5x10 ⁻¹)*	0,03 (-34,8-34,9)*
Paratylenchidae	0,292 (0,17-0,41)**	0,00005 (-19,4-19,4)*	0,03 (-15-15,1)*
Pratylenchidae	0,38 (0,22-0,55)**	0,0007 (-0,012-0,014)*	1,4 (1,4-19,5)*
Grupos Tróficos			
Bacteriófagos	0,348 (0,2-0,49)**	0,002 (0,0009-0,002)**	0,38 (-0,46-1,2)*
Fungívoros	0,34 (0,13-0,55)**	0,001 (-0,004-0,007)**	0,46 (-7,8-8,7)*
Predadores/Omnívoros	0,006 (-6,8x10 ⁻⁶ -6,8x10 ⁻¹)*	0,01 (0-0,5)**	0,04 (-9,2-9,3)*
Parasitas das Plantas	0,366 (0,21-0,52)**	0,001 (-0,001-0,003)**	0,39 (-0,57-1,37)*
Nº de famílias	0,003 (3x10 ⁻³ -3x10 ⁻³)*	0,008 (0,006-0,01)**	0,47 (-0,18-1,11)*
Abundância total	0,354 (0,21-0,50)**	0,002 (0,0003-0,0027)**	0,914 (0,3-1,5)*

*p>0,05; **p<0,05

3.3. Ensaio com metais

3.3.1. Avaliação da diversidade

Os ensaios com metais demonstraram a mesma tendência dos produtos fitofarmacêuticos. A comunidade diminuiu com o aumento da concentração do elemento químico (Tabela IV).

O cádmio (Cd) foi o metal que causou maior mortalidade na concentração mais elevada (C3), eliminando quase por completo todos os indivíduos, seguindo-se o cobre (Cu), em que as famílias como Paratylenchidae e Rhabditidae diminuíram mais de 50% e, Cephalobidae, mais de 80% dos seus indivíduos. Comparativamente com o Cd e o Cu, o Zn revelou menor efeito, havendo maior diversidade na concentração mais elevada (C3) (Tabela VI).

No tratamento com Cd verificou-se que com as concentrações C1 e C2 as proporções dos grupos tróficos foram equivalentes ao controlo e que na concentração C3 a proporção de bacteriófagos (80%) foi muito superior à dos restantes grupos tróficos (20% de fungívoros e parasitas de plantas). No tratamento com Zn nas concentrações C0 e C1 os nemátodes bacteriófagos mostraram uma proporção de cerca de 70% em relação aos parasitas das plantas (26%), fungívoros e predadores e omnívoros (4%). Os nemátodes parasitas das plantas aumentaram na concentração C3 (45%) e os bacteriófagos (50%) diminuíram. Na generalidade, verificou-se maior proporção de bacteriófagos em todas as concentrações, com cerca de 70%, no tratamento com Cu. Na concentração mais elevada (C3) os nemátodes parasitas das plantas aumentaram ligeiramente e os predadores e omnívoros deixaram de estar presentes (Figura 17).

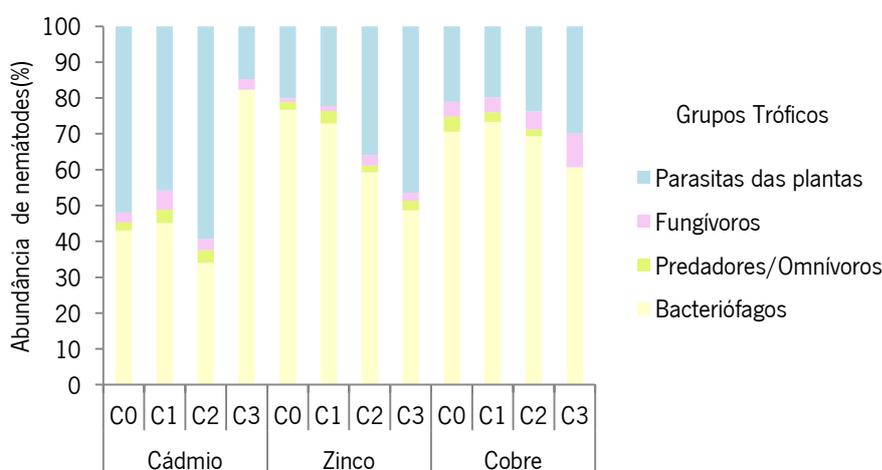


Figura 17 - Proporção dos diferentes grupos tróficos de nemátodes nas diferentes concentrações de metais (cádmio, zinco e cobre).

Tabela VI – Número de nemátodos (médias de 5 réplicas) pertencentes às diferentes famílias nas diferentes concentrações de metais e respectivos valores c-p.

Grupos Tróficos/Famílias	c-p	Cádmio				Zinco				Cobre			
		C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
Bacteriófagos													
Alaimidae	4	6	5	-	-	8	6	3	2	8	9	-	1
Bastianiidae	3	8	4	-	-	4	2	2	2	10	9	-	-
Cephalobidae	2	83	93	11	-	124	134	72	32	208	221	95	27
Rhabditidae	1	44	47	6	6	47	24	20	26	144	113	58	65
Prismatolaimidae	3	4	4	-	-	4	4	4	2	9	8	-	-
Fungívoros													
Aphelenchidae	2	9	18	2	0,2	10	14	15	5	22	20	11	14
Predadores/Omnívoros													
Aporcelaimidae	5	8	10	2	-	4	7	2	4	14	13	0	-
Diplogasteridae	1	-	0,2	0,2	-	0,4	0,4	-	-	6	-	4	-
Mononchidae	4	-	1	-	-	1	0,4	1	-	2	-	-	-
Parasitas das Plantas													
Criconematidae	3	2	0,4	-	0,4	4	3	2	3	8	2	1	-
Hoplolaimidae	3	1	0,4	-	-	1	2	0,4	1	3	2	0,4	0,2
Longidoridae	5	-	-	0,2	-	0,4	-	-	-	3	0,4	-	-
Paratylenchidae	2	29	37	6	1	50	46	67	32	33	27	15	6
Pratylenchidae	3	126	111	23	-	127	144	111	78	47	46	26	35
Trichodoridae	4	6	-	-	-	3	6	-	1	5	4	-	-
Tylenchidae	2	11	6	1	1	10	8	8	2	15	16	10	4

C0 – controlo; C1 – 100 mg/Kg; C2 – 500 mg/Kg; C3 – 1000 mg/Kg.

Relativamente à estratégia de sobrevivência, verificou-se que os nemátodes classificados com c-p 3 (Bastianiidae, Aphelenchidae, Paratylenchidae e Tylenchidae) foram os mais representativos (Tabela VI).

No tratamento com Cd os nemátodes classificados com c-p 2 (45%) e c-p 3 (50%) encontraram-se em maior proporção, tanto no controlo, como em C1 e C2. Na concentração C3 os nemátodes classificados com c-p 1 surgiram em maior proporção, cerca de 80% (Figura 18A). Sob a acção do Zn os nemátodes classificados com c-p 2 e c-p 3 encontraram-se em maior proporção em todas as concentrações (Figura 18B). No tratamento com Cu os nemátodes com valores c-p 2, c-p 1 e c-p 3 mantiveram-se em maiores proporções. Os nemátodes com valores c-p 2 dominavam, com cerca de 50 a 60%, nas concentrações C0, C1 e C2. Na concentração C3 os nemátodes com valores c-p 1 (40%) aumentaram ligeiramente em relação às outras concentrações e com c-p 2 diminuíram para 30% (Figura 18C).

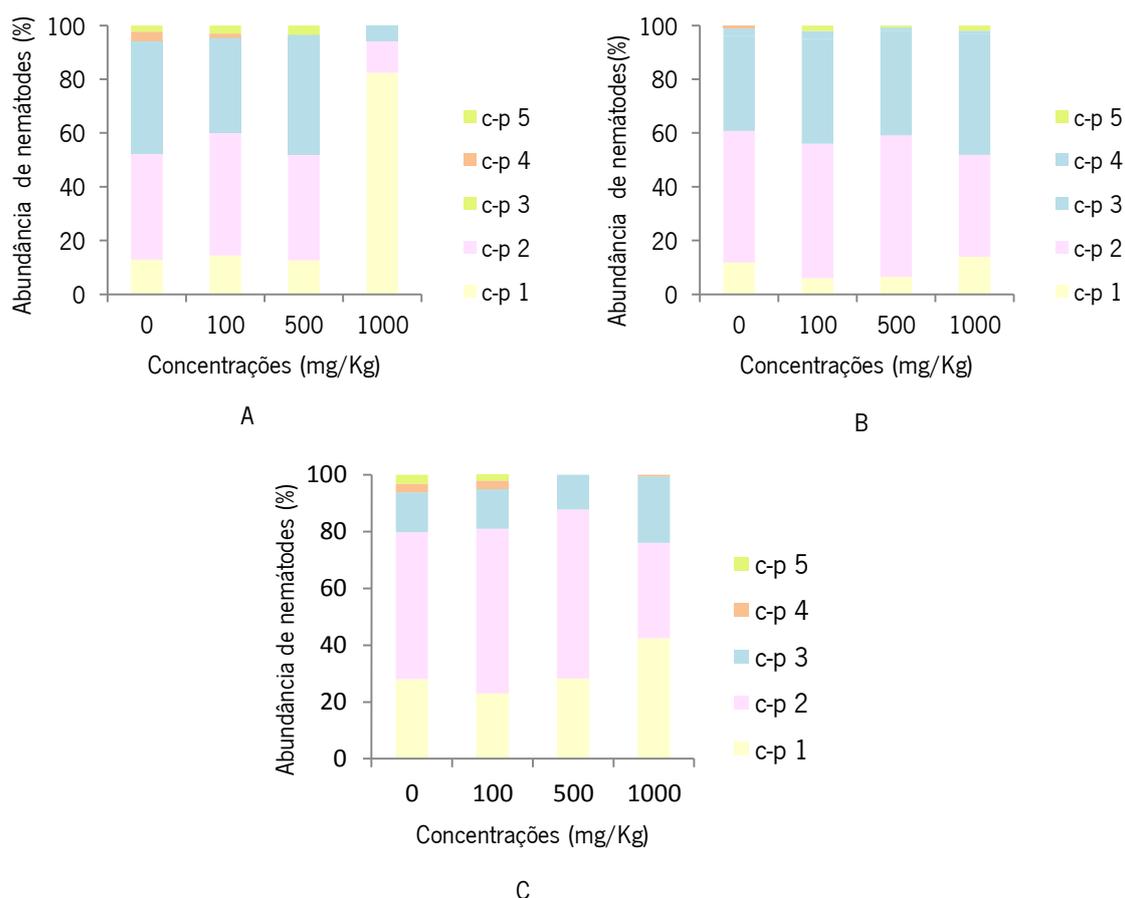


Figura 18- Efeitos das diferentes concentrações dos metais sobre os grupos de nemátodes com diferentes valores c-p .A – Cádmiio; B- Zinco; C – Cobre.

Os índices de Shannon (H') revelaram diferenças significativas entre as concentrações de cada tratamento com os metais. Os tratamentos feitos com Cd e Cu mostraram que existiram diferenças significativas entre concentrações (one-way, ANOVA; $p < 0,05$). No tratamento com zinco não existiram diferenças significativas na diversidade (one-way, ANOVA; $p < 0,05$) (Tabela V).

Os índices de Simpson (DS) mostraram que existiram diferenças significativas entre as concentrações de Cd (one-way, ANOVA; $p < 0,05$), em que a concentração C3 apresenta maior dominância (0,64) de famílias. Nos tratamentos com zinco e cobre não foram observadas diferenças significativas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$), apresentando valores de DS similares entre as concentrações (Tabela V).

Relativamente aos índices de diversidade trófica (T) verificaram-se diferenças nos valores para os bacteriófagos (BF) no tratamento com Cd (one-way, ANOVA; $p < 0,05$) e nos valores dos predadores e omnívoros nos tratamentos com Cd e Cu (one-way, ANOVA; $p < 0,05$). Quanto aos valores dos índices dos fungívoros (FF) e dos parasitas de plantas (PP) não se verificaram diferenças entre si (Tabela V).

O tratamento com Cd afectou significativamente os índices de maturidade (IM) (teste de Dunnett; $p < 0,05$), cujos valores variaram de 1,2 a 2,37. Sob a acção de Cu e Zn não existiram diferenças significativas (one-way, ANOVA; $p > 0,05$) (Tabela V).

Quanto aos índices dos parasitas das plantas (PPI), estes foram afectados pelos tratamentos com Cd e com Zn (one-way, ANOVA; $p < 0,05$), mas não pelo tratamento com Cu (one-way ANOVA; $p > 0,05$) (Tabela 5). A relação PPI/IM mostrou diferenças nos tratamentos com Cd (1,22 - 0,20) e Zn (variou de 0,28 a 0,98) (one-way, ANOVA; $p < 0,05$). Para o tratamento de cobre não foram registadas diferenças na relação PPI/IM, entre as concentrações (one-way, ANOVA; $p > 0,05$).

As relações FF/BF e (FF+BF)/PP foram significativamente afectadas pelo tratameto com Zn mas não pelos tratamentos com Cd e Cu (one-way, ANOVA; $p < 0,05$ para Zn; $p > 0,05$ para Cd e Cu).

Nos tratamentos de Cd, Zn e Cu a relação FF/BF apresentou valores inferiores a 1, não existindo diferenças significativas entre as concentrações (one-way, ANOVA; $p > 0,05$). Para o tratamento com Cd os valores de (FF+BF)/PP variaram entre 0,63 e 5,80, e para os tratamentos com Zn e Cu os valores são superiores a 1, existindo diferenças significativas entre o controlo e as concentrações C2 e C3 do Zn (one-way, ANOVA; $p < 0,05$) (Tabela V).

Tabela V- Índices de diversidade para os diferentes metais.

Índices	Cádmio				Zinco				Cobre			
	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
H'	1,82	1,79	1,54	0,65	1,69	1,69	1,69	1,70	1,70	1,72	0,55	1,49
Ds	0,23	0,22	0,27	0,64	0,23	0,26	0,24	0,25	0,24	0,27	0,27	0,27
IM	1,33	2,37	1,13	1,51	1,40	1,30	1,10	1,0	2,20	2,23	2,12	1,95
PPI	1,63	1,44	1,87	0,46	1,5	1,60	1,90	2,0	0,66	0,62	0,75	0,94
PPI/IM	1,22	0,96	1,65	0,20	1,1	1,3	2,1	0,98	0,30	0,28	0,35	0,48
BF	5×10^{-3}	5×10^{-3}	9×10^{-3}	1×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	4×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
FF	1×10^{-1}	4×10^{-2}	1×10^{-1}	1×10^{-1}	9×10^{-1}	5×10^{-1}	1×10^{-1}	2×10^{-1}	6×10^{-2}	6×10^{-2}	4×10^{-2}	1×10^{-2}
T P/O M	2×10^{-1}	7×10^{-2}	8×10^{-2}	0	2×10^{-1}	9×10^{-2}	3×10^{-1}	1×10^{-1}	6×10^{-1}	1×10^{-1}	3×10^{-1}	0
PP	4×10^{-4}	5×10^{-4}	3×10^{-4}	5×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}	8×10^{-4}	5×10^{-4}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}	1×10^{-3}
FF/BF	0,06	0,12	0,09	0,04	0,01	0,02	0,05	0,04	0,06	0,06	0,07	0,15
(FF+BF)/ PP	0,88	1,10	0,63	5,80	3,87	3,35	1,73	1,09	3,55	3,91	3,13	2,34

H' – índice de Shannon-Weaver; J' – índice de Simpson; IM – índice de maturidade; PPI – índice de maturidade para parasitas de plantas; T – índice de diversidade trófica; BF – Bacteriófagos; FF – Fungívoros; P/OM – Predadores e Omnívoros; PP – Parasitas de Plantas.

3.3.2. Efeito dos metais na abundância total dos nemátodes

Todos os metais afectaram a comunidade de nemátodes, diminuindo a sua abundância total à medida que a concentração aumentou (Figura 19).

Os valores de EC50 demonstraram que o decréscimo do número de nemátodes foi significativo (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$) em todos os tratamentos (Tabela VI).

Nos tratamentos com Cd e Cu foi observado decréscimo do número de nemátodes a partir da concentração de 500 mg/Kg (one-way ANOVA, teste de Dunnett; $p < 0,05$) e, no tratamento com Zn, foi observado um decréscimo significativo da abundância total de nemátodes a partir da concentração de 1000 mg/Kg (one-way ANOVA, teste de Dunnett; $p < 0,05$).

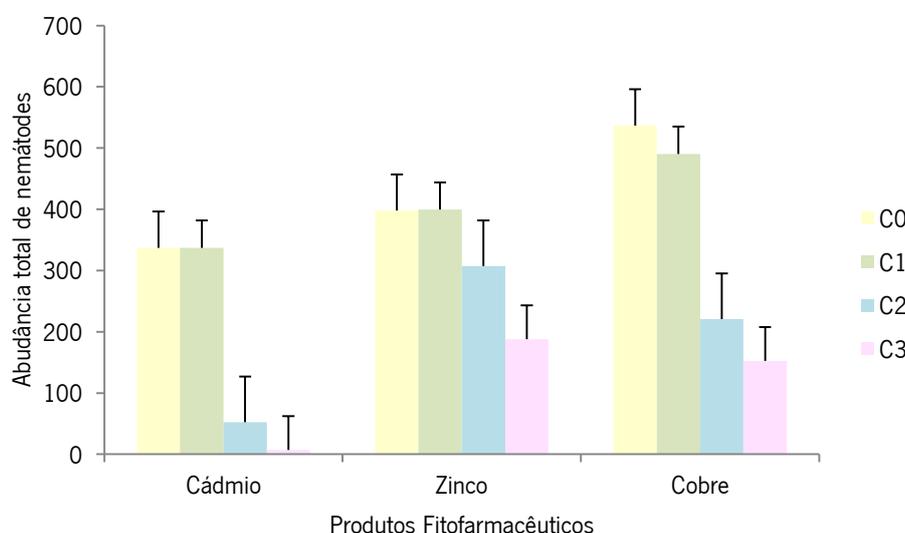


Figura 19 – Efeitos das diferentes concentrações dos metais (Cd, Zn e Cu) na abundância total dos nemátodes (média de 5 réplicas).

3.3.3. Efeito dos metais na composição das famílias de nemátodes

Os metais testados demonstraram ser muito tóxicos para as famílias de nemátodes, variando na rapidez de actuação do químico e tolerância do nemátode ao metal (Figura 20).

O decréscimo do número de famílias foi significativo nos tratamentos com Cd e Cu (one-way, ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$). Porém, nestes dois tratamentos, o decréscimo de nemátodes na maioria das famílias não foi significativo (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p > 0,05$). O número de famílias no tratamento com Zn não revelou ser significativo (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p > 0,05$) mas nas famílias Aphelenchidae e Paratylenchidae a diminuição foi significativa (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$) (Tabela VI).

No tratamento com Cd o efeito da toxicidade foi observado na concentração de 500 mg/Kg (One Way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$) para todas as famílias, com excepção das famílias Trichodoridae (one-way ANOVA, teste Dunnett: LOEC=100 mg/Kg) e Aphelenchidae (one-way ANOVA, teste Dunnett: $p > 0,05$).

O efeito da toxicidade de Zn foi observado nas famílias Alaimidae, Cephalobidae (LOEC=1000 mg/Kg) e Rhabditidae (LOEC=100 mg/Kg) (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$).

No tratamento com Cu foi observado efeito na maioria das famílias, a partir das concentrações de 500 mg/kg (LOEC; one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$), excepto nas famílias Diplogasteridae e Tylenchidae (LOEC= 1000 mg/Kg; one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$), nas famílias Mononchidae, Criconematidae e Longidoridae (LOEC=100 mg/Kg; one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$), e na família Aphelenchidae onde não foi observado efeito (one-way, ANOVA, teste Dunnett; $p > 0,05$).

Ao nível das famílias a maior dissimilaridade verificada sob a acção do Cd ($R_{\text{global}}=0,642$; teste Dunnett; $p < 0,05$) foi entre o controlo e C1 e C1 e C3, com $R=1$, e entre as concentrações C1 e C2 ($R=0,88$). Com um R global de 0,135 o tratamento com zinco apresentou maior dissimilaridade entre o controlo e C2 ($R=0,34$) e o controlo e C1 ($R=0,308$), e sob a acção de cobre ($R_{\text{global}}=0,699$; teste Dunnett; $p < 0,05$) as maiores diferenças encontradas foram entre o controlo e C2 e C2 e C3 com $R=1$, e entre o controlo e C1 e C1 e C3 também se verificaram dissimilaridades significativas com $R=0,708$ e $R=0,656$, respectivamente.

Na generalidade, em todos os tratamentos, as diferenças entre as diversas concentrações (C0, C1, C2 e C3) foram da responsabilidade das famílias Pratylenchidae, Cephalobidae, Rhabditidae, Paratylenchidae e Aphelenchidae, variando a sua importância e contribuição nos diferentes tratamentos. A percentagem das suas contribuições encontra-se na tabela IX.

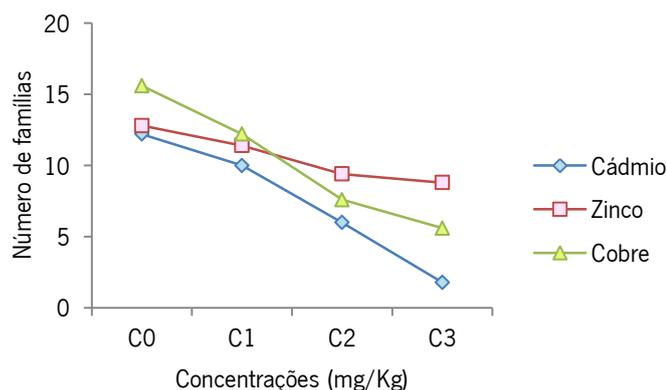


Figura 20- Efeitos das diferentes concentrações de metais no número de famílias dos nemátodes.

3.3.4. Efeito dos metais na abundância dos grupos tróficos

Em todos os tratamentos verificou-se um decréscimo dos nemátodes de todos os grupos tróficos (Figura 21).

No tratamento com Cd o decréscimo de nemátodes foi significativo (teste Dunnett; $p < 0,05$) nos nemátodes bacteriófagos e, no tratamento com Zn, nos nemátodes parasitas das plantas. Por sua vez, no tratamento com Cu houve uma diminuição significativa de indivíduos nos nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas (teste Dunnett; $p < 0,05$) (Tabela VI).

O efeito da toxicidade do Cd foi observado na concentração a partir de 500 mg/Kg nos grupos tróficos dos nemátodes bacteriófagos, parasitas das plantas e dos predadores e omnívoros (one-way ANOVA, teste Dunnett: $p < 0,05$). Nos nemátodes fungívoros não se observou efeito (one-way, ANOVA; teste Dunnett; $p > 0,05$). No tratamento com Zn só foi observado efeito nos nemátodes bacteriófagos na concentração a partir de 500 mg/Kg (one-way ANOVA, teste Dunnett; $p < 0,05$). No tratamento com Cu o decréscimo da abundância foi observado nos nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas a partir da concentração de 500 mg/Kg. Nos nemátodes predadores e omnívoros o efeito começou a ser observado na concentração mais baixa testada (LOEC=100 mg/Kg; one-way ANOVA, teste Dunnett: $p < 0,05$). Nos nemátodes fungívoros não foi observado qualquer efeito (one-way ANOVA; teste Dunnett; $p > 0,05$).

Nos grupos tróficos as dissimilaridades encontradas foram maiores entre o controlo e C1 e entre o controlo e C2 ($R=0,732$; ANOSIM; $p < 0,05$) para o tratamento com cádmio ($R_{global}=0,598$; ANOSIM; $p < 0,05$). No tratamento com zinco ($R_{global}=0,144$; ANOSIM; $p < 0,05$) o controlo e C2 ($R=0,364$) e o controlo e C1 ($R=0,34$) apresentaram maior dissimilaridade entre

si. Sob a acção de cobre ($R_{\text{global}}=0,598$; ANOSIM; $p<0,05$) as maiores dissimilaridades verificaram-se entre o controlo e C2 ($R=1$) eo controlo e C1 ($R=0,696$).

Na generalidade os nemátodes com um maior contributo para as dissimilaridades existentes foram nemátodes parasitas de plantas, que em muitos casos ultrapassaram os 50% na sua contribuição, seguidos dos nemátodes bacteriófagos, que no tratamento com Cu, pode ultrapassar 70% da sua contribuição para as diferenças nos tratamentos (Tabela X, em anexo).

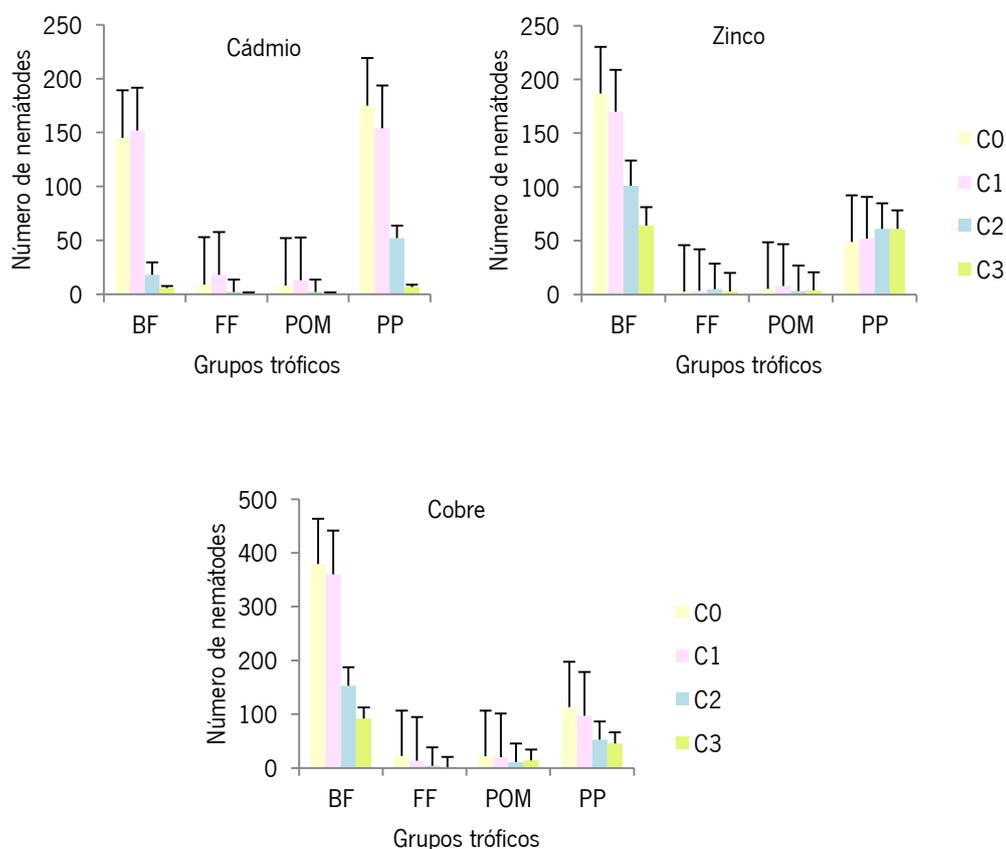


Figura 21 – Efeitos das diferentes concentrações de metais (Cd, Zn e Cu) na abundância dos diferentes grupos tróficos (média de 5 réplicas).

Tabela VI- Valores de EC50 (nível de confiança de 95%) para as famílias mais representativas, grupos tróficos e número de famílias de nemátodes sujeitas às concentrações dos metais.

	mg/Kg		
	Cádmio	Zinco	Cobre
Famílias			
Cephalobidae	360,4 (-32-753)*	1701 (15073-18476)*	911,5 (-1124-2947)*
Rhabditidae	277,3 (25-529)**	54,9 (-19,8-129,7)*	126,9 (-31,4-285,3)*
c Aphelenchidae	697,8 (-3351-4747)*	987,8 (-300,2-302,2)**	140,9 (-362-644)*
Aporcelaimidae	524,6 (-945-1994)*	377,5 (-2134-2889)*	230,8 (-8,87-471)*
Paratylenchidae	485,4 (-610-1581)*	1012 (-1084-1086)**	426,6 (-125-978)*
Pratylenchidae	304,3 (-31,9-640,5)*	1127 (262,4-1990,8)*	146,4 (-319,7-612,5)*
Grupos Tróficos			
Bacteriófagos	299,7 (17,8-581,5)**	441,2 (762-1644,9)**	361,9 (24,4-681,7)**
Fungívoros	701,4 (-3261-4663)*	987,8 (-3,0-3022,1)*	140,9 (-364,6-646)*
Predadores/Omnívoros	759,8 (-2120-3640)*	477,9 (-2635-3590,7)*	174,9 (51,1-248,6)**
Parasitas de Plantas	294,7 (14,9-574)*	1071,3 (628-1515)**	209,2 (-59,04-477,7)*
Nº de famílias	789,6 (-416-1996)**	176,1 (-3781-1030,4)*	204,1 (121,2-287,1)**
Abundância Total	316,1 (13,4-618,8)**	937,1 (440-1434,7)**	265,3 (8,76-521,9)**

*p>0,05; **p<0,05

IV. DISCUSSÃO

IV. Discussão

1. Eficiência da extracção dos nemátodes do solo

A quantidade de nemátodes extraídos do solo pelo método do tabuleiro foi significativamente diferente a partir dos diferentes volumes de solo. Este foi ainda o método que permitiu extrair um número superior de nemátodes a partir do volume de 100 cm³ de solo. Este resultado poderá dever-se ao número de nemátodes mais filiformes (e.g. Alaimidae, Bastianiidae, Pristomatolaimidae e Tylenchidae. Segundo, Bueno *et al.* (2002) o método do tabuleiro é mais adequado à extracção deste tipo de nemátodes. Contrariamente, pelo método de sedimentação e crivagem, o número de nemátodes extraídos dos diferentes volumes de solo foi muito diferente e permitiu extrair um menor número de nemátodes, devido ao baixo número de nemátodes filiformes e ao domínio de nemátodes de maiores dimensões (e.g. Cephalobidae, Hoplolaimidae e Rhabditidae). van Bezooijen (2006) refere que neste método são aplicadas diferenças de gravidade entre as partículas do solo e os nemátodes, permitindo a acumulação destes no fundo do funil e, talvez por isso, os nemátodes filiformes fiquem retidos no solo.

A maior parte dos nemátodes foi extraída, pelo método do tabuleiro, nas primeiras 24 horas de extracção e nas 24 horas seguintes foram extraídos os nemátodes que talvez estivessem retidos nas partículas do solo (Figura 10). Segundo Bell & Watson (2000) a extracção de nemátodes ao longo de 48 horas permite a obtenção da quase totalidade dos nemátodes desse solo.

Neste estudo, apesar do método do tabuleiro permitir extrair maior número de nemátodes a partir de um volume de 100 cm³, foi utilizado o volume de 50 cm³ de solo porque nos pareceu uma quantidade adequada quer em termos de número de nemátodes extraídos, quer para adição do número de nemátodes nos ensaios. Bell & Watson (2000) referem que uma amostra de 50 cm³ de solo é mais eficiente para a extracção de nemátodes, devido ao menor tempo de contagem, pois o número de nemátodes que são extraídos é menor neste volume de solo, pelo método do tabuleiro.

Ao querermos conhecer previamente a taxa de recuperação dos nemátodes a partir do solo para os ensaios nas condições estabelecidas (ver secção II, 3.3), verificámos que após três dias se conseguia recuperar apenas 30% a 35% dos nemátodes adicionados ao solo. Este resultado está de acordo com Chelinho *et al.* (2011), que referem que o manuseamento durante todo o processo de extracção e inoculação dos nemátodes pode ter provocado efeitos directos

sobre estes, podendo ter ocorrido mortalidade à partida, e ser limitante nestes ensaios com nemátodes.

2. Efeitos ecotoxicológicos

2.1. Efeitos dos produtos fitofarmacêuticos

A informação disponível é ainda escassa, pouco se sabendo sobre os efeitos de contaminantes, como pesticidas e metais sobre os nemátodes do solo, quando encarados sob o ponto de vista da comunidade.

No presente estudo a contaminação do solo por produtos fitofarmacêuticos provocou uma diminuição da abundância total de nemátodes nas concentrações mais elevadas (Chelinho *et al.* 2011). Foi verificada maior mortalidade no tratamento com abamectina, o que está de acordo com os resultados obtidos por Kolar *et al.* (2007), que referem que a abamectina foi muito tóxica para os nemátodes do solo.

De um modo geral, neste estudo, verificou-se maior proporção de nemátodes parasitas das plantas e bacteriófagos, enquanto que os nemátodes fungívoros, e predadores e omnívoros estiveram em pequenas proporções. O número elevado de indivíduos da família Pratylenchidae, que se mostraram menos sensíveis ao óleo de verão, contribuiu para proporções mais elevadas de nemátodes parasitas das plantas neste tratamento. Em contrapartida, no ensaio com abamectina os nemátodes bacteriófagos encontraram-se em maior proporção devido à elevada mortalidade dos parasitas das plantas e ao número de indivíduos da família Rhabditidae, verificando-se a tolerância ao stress, por parte destes nemátodes, já referida em Bongers & Bongers (1997). Contudo, no tratamento com fosetil os nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas encontraram-se em proporções semelhantes. A maior representatividade das famílias Cephalobidae e Rhabditidae contribuiu para o número de bacteriófagos e a família Pratylenchidae foi a que mais contribuiu para o número de nemátodes parasitas das plantas. Estes resultados estão de acordo com o referido em Porazinka *et al.* (1999) e Wen-Ju *et al.* (2005) e com a classificação destes nemátodes como tolerantes ou relativamente tolerantes ao stress, em Bongers & Bongers (1997).

A proporção dos nemátodes com diferentes estratégias de sobrevivência demonstrou que os nemátodes com valores c-p 2 e c-p 3 encontravam-se em proporções maiores no solo, tal como foi também citado no estudo de Tomazini *et al.* (2008) (Figura 12). A proporção de nemátodes classificados com valores c-p 2 e c-p 3 foi maior, em relação aos outros nemátodes,

com valores c-p 1, c-p 4 e c-p 5, nos tratamentos com óleo de verão e fosetil, não havendo diferenças significativas relativamente ao controlo. Isto indica que os nemátodes presentes no solo contaminado eram os mais tolerantes aos contaminantes, como é mencionado no estudo de Bongers & Bongers (1997). Contrariamente, no tratamento com abamectina, existiram diferenças significativas relativamente ao controlo. Houve uma elevada diminuição de nemátodes com valores c-p 3 e c-p 4 e um ligeiro decréscimo de nemátodes c-p 2. Os nemátodes com valores c-p 1 tiveram um aumento, devido à tolerância da família Rhabditidae ao stress, já referida (Figura 12), demonstrando assim maior toxicidade da abamectina.

A diminuição da diversidade de nemátodes no solo, nos três tratamentos foi verificada através do índice de Shannon (H'). No tratamento com óleo de verão não foram verificadas diferenças significativas na diversidade, no entanto, no tratamento com abamectina e fosetil, foram verificadas diferenças, havendo menor diversidade nas concentrações mais elevadas. No estudo de Yeates (2003) é referido que o valor de H' diminui em locais com distúrbios.

Em nenhum dos tratamentos houve diferenças significativas na dominância por parte de alguma família em particular. Os valores menores do índice de Simpson (DS) foram verificados no tratamento com abamectina devido à maior mortalidade provocada em todas as famílias de nemátodes. Como referido anteriormente o fosetil mostrou ser menos tóxico para os nemátodes e, por isso, os valores de DS foram maiores. Este resultado pode dever-se ao número elevado de indivíduos das famílias Cephalobidae e Rhabditidae (devido à incorporação de composto no solo) e Pratylenchidae, como foi também verificado nos estudos realizados por Bongers & Ferris (1999) e Figueira *et al.* (2011).

Relativamente à diversidade dos grupos tróficos não foram observadas mudanças significativas nos três tratamentos, como nos é mostrado pelos valores do índice de diversidade (T) (Tabela II). Isto foi também observado no estudo de Tomazini *et al.* (2008), onde T não contribuiu para verificar diferenças entre tratamentos. Em todos os tratamentos, o valor do índice de maturidade (IM) não mostrou diferenças significativas, mas revelou maior nível de perturbação do solo pelos contaminantes nas concentrações mais elevadas. Segundo Bongers *et al.* (1997) o valor de IM corresponde ao maior nível de perturbação. O elevado número de nemátodes da família Pratylenchidae pode ter influenciado os valores do índice dos parasitas das plantas (PPI). No tratamento com óleo de verão e fosetil estes nemátodes estavam presentes em elevado número, e daí os maiores valores de PPI. No tratamento com abamectina o número de Pratylenchidae foi bastante reduzido, conduzindo a valores PPI menores. Segundo Bongers

(1990) os valores de IM e PPI, têm uma relação inversa. A relação PPI/IM encontrada reflectiu maior enriquecimento do solo nos tratamentos com óleo de verão e fosetil.

A prevalência na decomposição da matéria orgânica, nos três tratamentos, foi por parte dos nemátodes bacteriófagos como nos mostrou os valores da relação FF/BF (Tabela II). Isto pode dever-se à tolerância dos nemátodes pertencentes às famílias Cephalobidae e Rhabditidae, como referido em Bongers & Bongers (1997) e ao número elevado de bacteriófagos em relação aos fungívoros. Na horta onde o solo foi colhido tinha sido incorporado composto pouco tempo antes, o que terá levado ao aumento da actividade microbiana que, por sua vez, levou certamente a uma resposta rápida e ao aumento de nemátodes bacteriófagos, como é sugerido em Porazinka *et al.* (1999).

A dominância dos grupos tróficos diferiu significativamente dentro de cada tratamento, no entanto, variou entre tratamentos, como se pode verificar na relação (FF+BF)/PP (Tabela II). Os nemátodes parasitas das plantas e os nemátodes bacteriófagos dominaram de forma semelhante, tanto no tratamento com óleo de verão como com fosetil devido à presença das famílias Cephalobidae, Paratylenchidae, Pratylenchidae e Rhabditidae, representadas em maior número. Estas famílias demonstraram ser tolerantes aos contaminantes, estando de acordo com a classificação feita por Bongers & Bongers (1997) relativamente à estratégia de sobrevivência dos grupos de nemátodes. Por outro lado, os nemátodes (FF+BF) dominaram no tratamento com abamectina, visto que esta foi muito tóxica para a generalidade das famílias e em particular para as famílias de nemátodes parasitas das plantas. As famílias Cephalobidae e Rhabditidae estiveram em maior número nas concentrações mais elevadas, o que também como foi verificado em alguns estudos (Porazinka *et al.*, 1999; Korthals *et al.*, 1996; Yeates, 2003).

De modo a conhecer melhor os efeitos destes contaminantes foram realizadas análises de similaridade e dissimilaridade, observando-se mudanças no número de famílias, abundância de cada família e abundância dos grupos tróficos à medida que a concentração do produto aumentou. Outros estudos revelaram que a aplicação de produtos fitofarmacêuticos provoca distúrbios no ecossistema do solo, afectando negativamente a estrutura da comunidade de nemátodes do solo (Baines & Small, 1976; Bongers (1990); Chelinho *et al.*, 2011; Fallahi *et al.*, 1998; Freckman e Ettma (1993); Indirani & Jayakumar, 2006). Uns produtos actuaram mais rapidamente que outros e cada família e grupos tróficos mostraram reacções diferentes à toxicidade em cada tratamento. Algumas famílias e grupos tróficos desapareceram totalmente; noutros verificou-se que a sua abundância total foi reduzida drasticamente. O número de famílias diminuiu em todos os tratamentos, ocorrendo, por isso um decréscimo de diversidade, como se

tinha verificado pelo índice de Shannon (H'), o que foi mais significativo no ensaio com abamectina. A diferente toxicidade dos produtos e a sensibilidade dos nemátodes foi observada em concentrações diferentes. O efeito tóxico do óleo de verão e do fosetil só foi observado na concentração mais elevada. No entanto, o ensaio com abamectina comprovou a sua maior toxicidade, tendo provocado efeito nas famílias e grupos tróficos na concentração mais baixa.

As mudanças verificadas na abundância total dos nemátodes deveram-se principalmente às famílias Aphelenchidae, Cephalobidae, Pratylenchidae e Rhabditidae, talvez pelo seu número elevado de nemátodes à partida, relativamente às restantes famílias. Os nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas, pela sua abundância em relação aos outros, foram os que mais contribuíram para as mudanças na estrutura trófica. Recentemente, Chelinho *et al.* (2011) verificaram reacções diferentes dos nemátodes ao contaminante (carbofuran) e que a contaminação do solo afectou o número e a composição das famílias e os grupos tróficos levando à sua diminuição. Neste mesmo estudo foi verificado que foram as famílias referidas acima que tiveram maior contribuição para as mudanças da abundância dos nemátodes.

2.2. Efeitos dos metais

O efeito da aplicação de metais na comunidade de nemátodes revelou um decréscimo significativo da abundância total de nemátodes, estando de acordo com outros estudos realizados (Bakonyi & Kádár, 2003; Chen *et al.*, 2009; Korthals *et al.*, 1996; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005). A diminuição da abundância dos nemátodes foi mais significativa no tratamento com Cd e com Cu. Por sua vez, o Zn foi o metal com menor efeito tóxico, mostrando até um efeito positivo, na concentração mais baixa, nas famílias Aphelenchidae, Cephalobidae e Pratylenchidae, que aumentaram o seu número de indivíduos, este efeito positivo foi também referido por Chen *et al.* (2009). Apesar deste efeito positivo por parte do Zn, a abundância total sofreu um decréscimo, um resultado não concordante com o aumento da abundância de nemátodes observado por Bakonyi & Kádár (2003).

Os nemátodes presentes em proporções mais elevadas foram os bacteriófagos, seguidos dos nemátodes parasitas das plantas (Figura 10), resultado idêntico, observado também por Chen *et al.* (2009). Os nemátodes fungívoros, predadores e omnívoros mantiveram-se em baixo número. No tratamento com cádmio, o aumento da concentração levou ao aumento da proporção de nemátodes bacteriófagos, devido aos nemátodes da família Rhabditidae que foram também os mais tolerantes a este metal. Contrariamente, os nemátodes bacteriófagos

diminuíram ligeiramente no ensaio com Zn. As famílias Cephalobidae, Paratylenchidae, Pratylenchidae e Rhabditidae contribuíram para a abundância dos nemátodes bacteriófagos e parasitas das plantas, indo de encontro com a classificação feita, destas famílias, como tolerantes ou relativamente tolerantes ao stress, por Bongers & Bongers (1997).

Considerando as estratégias de sobrevivência dos nemátodes, verificou-se uma dominância por parte dos nemátodes c-p 2 e c-p 3 (Figura 17), como já tinha sido verificado nos ensaios com os produtos fitofarmacêuticos. Os nemátodes com valores c-p 3, 4 e 5 foram afectados pela contaminação dos metais, da mesma forma como é referido por Shao *et al.* (2008). No tratamento com Zn os grupos tróficos dos nemátodes, relativamente à estratégia de sobrevivência, mantiveram-se em proporções semelhantes em todas as concentrações, comprovando o menor efeito tóxico nos grupos tróficos dos nemátodes, como já foi referido anteriormente. Os nemátodes c-p 1 encontraram-se em maior proporção à medida que aumentou a concentração nos ensaios com Cu e principalmente Cd, quando comparado com o controlo. Isto demonstrou que a tolerância dos nemátodes variou nos diferentes tratamentos. A sensibilidade foi maior relativamente ao Cd, tal como foi comprovado pela presença de nemátodes com valores c-p 1 tolerantes a contaminantes, segundo Bongers & Bongers (1997). No entanto Korthals *et al.* (1996) referem que os nemátodes com o mesmo valor c-p podem ter sensibilidades diferentes e que o conhecimento actual pode não ser suficiente para distribuir os nemátodes em grupos c-p. São por isso ainda, necessários muitos estudos sobre a sensibilidade dos nemátodes a diferentes contaminantes.

Os efeitos tóxicos dos metais levaram a uma diminuição da diversidade, como foi possível verificar pelos valores do índice de Shannon (H') (Tabela V). Estes efeitos também foram encontrados por Chen *et al.* (2009). A maior perda de diversidade foi sem dúvidas, registada no tratamento com Cd à medida que aumentou a concentração. O Zn não causou mudanças significativas na diversidade, o mesmo tendo sido verificado por Bakonyi & Kádár (2003). Pelos valores do índice de Simpson (DS) não se verificou uma dominância significativa de qualquer família de nemátodes do solo, nos tratamentos com Cu e Zn. O aumento da concentração de Cd reflectiu a dominância (verificada por Ds) da família Rhabditidae, classificada por Bongers & Bongers (1997) com valores c-p 1 (tolerante ao stress por metais).

A diminuição da diversidade, registada por H' , verificou-se na concentração mais elevada dos três metais, e por isso, onde existiu maior perturbação do solo. Os valores do índice de maturidade (IM) não mostraram diferenças significativas quanto à perturbação do solo por parte de Cu e Zn, podendo ser justificado pelo maior número de nemátodes com valores c-p 1, 2 e 3.

O mesmo foi verificado por Korthals *et al.* (1996). O nível de perturbação do solo aumentou à medida que a concentração de Cd também aumentou, o que foi verificado pela diminuição ou pela total ausência da maior parte das famílias de nemátodes.

A abundância das famílias de nemátodes parasitas das plantas, Paratylenchidae e Pratylenchidae, justifica o maior valor do índice de parasitas das plantas (PPI) no tratamento com Zn e Cu (Tabela V), o que também foi referido por Chen *et al.* (2009), ao obterem o valor de PPI mais elevado para maiores concentrações de Zn e Cu. Em contrapartida, o valor de PPI mais baixo, foi obtido com Cd na concentração mais elevada, visto que causou maior mortalidade à maior parte das famílias de nemátodes parasitas das plantas. A família Rhabditidae foi a mais tolerante e, por isso, estes nemátodes foram encontrados em maior número. O maior enriquecimento do solo foi observado no tratamento com Zn, verificando-se, assim, uma menor influência negativa na comunidade de nemátodes.

A prevalência dos nemátodes bacteriófagos foi maior em todos os tratamentos, podendo dever-se ao maior número destes nemátodes é à maior sensibilidade por parte dos parasitas das plantas. A dominância dos nemátodes fungívoros e bacteriófagos, revelada pela relação $(FF+BF)/PP$, em todos os tratamentos, continua a poder dever-se ao maior número destes nemátodes e à tolerância das famílias Aphelenchidae, Cephalobidae e Rhabditidae, referida por Bongers & Bongers (1997).

O efeito manifestado por Cd, Zn e Cu traduziu-se num decréscimo da abundância total dos nemátodes (Figura 18). Segundo Sánchez-Moreno *et al.* (2005) os metais influenciam negativamente a comunidade de nemátodes do solo. O Cd foi o metal que provocou mais mudanças significativas na abundância total de nemátodes, seguindo-lhe o Cu. Estes metais provocaram maior efeito a partir de 500 mg/Kg. O Zn teve um efeito menos acentuado na comunidade de nemátodes, tendo sido o metal com menor efeito negativo. As diferentes sensibilidades dos nemátodes ao Cd, Cu e Zn foram comprovadas pelos valores de EC50. O Cd e Cu necessitaram de uma dose mais baixa para reduzir a abundância dos nemátodes a 50%, por sua vez o Zn, só reduziu o número de nemátodes para metade, num valor próximo da concentração mais elevada (937 mg/Kg).

As famílias de nemátodes mostraram sensibilidades diferentes aos diferentes metais. No nosso estudo, a maioria das famílias diminuiu a sua abundância a uma concentração próxima dos 500 mg/Kg de Cd; contudo segundo Korthals *et al.* (1996) o Cd só provoca efeito acima dos 160 mg/Kg. A menor toxicidade ao Zn, volta a ser confirmada, visto que as famílias só reduziram o seu número a 50%, acima dos 1000 mg/Kg. O número de famílias reduziu mais

rapidamente no tratamento de Cu (204 mg/kg) e no tratamento com Cd (789 mg/kg), verificando-se, assim, uma baixa diversidade em solos contaminados com estes metais, afectando a estrutura a este nível. Assim como para os produtos fitofarmacêuticos, as famílias de nemátodes mais representativas (Cephalobidae, Paratylenchidae, Pratylenchidae e Rhabditidae) foram as que contribuíram mais fortemente para as diferenças nos tratamentos e dominaram, mesmo com a contaminação por metais, o que está de acordo com resultados de um estudo anterior (Chen *et al.*, 2009).

Considerando a abundância total de cada grupo trófico, nos três tratamentos, esta diminuiu com o aumento da concentração dos metais (Figura 20). O Cd foi o metal que provocou maior decréscimo em todos os grupos, sendo mais significativo a partir dos 500 mg/Kg. No tratamento com Cu os nemátodes bacteriófagos, parasitas das plantas e fungívoros reduziram o seu número a partir de 100 mg/Kg, não estando de acordo com o referido por Korthals *et al.* (1996) tendo o Cu afectado estes grupos tróficos, apenas com uma dose de 1600 mg/Kg. O efeito da toxicidade do Zn manifestou-se mais lentamente, induzindo menor mortalidade nos grupos tróficos, como foi, também observado por Chen *et al.* (2009). Podemos dizer que a maioria dos grupos tróficos é mais sensível ao Cd e ao Cu do que ao Zn. Segundo Korthals *et al.* (1996) os grupos tróficos apresentam sensibilidades diferentes a cada químico. A contribuição de cada grupo trófico para as mudanças na estrutura trófica, em cada tratamento, deveu-se por um lado ao número de nemátodes em cada grupo e à sensibilidade dos nemátodes que pertencem a cada grupo e que estavam presentes na comunidade, tendo sido, os nemátodes bacteriófagos e os parasitas das plantas os que mais contribuíram para as mudanças verificadas na estrutura trófica. Segundo Bakonyi & Kádár (2003), Bongers & Bongers (1997) e Chen *et al.* (2009) os grupos tróficos com maior número de nemátodes e mais sensíveis (neste caso os fungívoros, predadores e omnívoros) tendem a reduzir, ou deixam mesmo de existir, com a contaminação do solo.

2.3. Conclusões

Dos resultados obtidos durante esta investigação é possível destacar que todos os produtos fitofarmacêuticos usados (óleo de verão, abamectina e fosetil) tiveram efeito sobre a abundância total dos nemátodes; a abamectina foi o fitofarmacêutico mais tóxico, tendo provocado efeito sobre a abundância total, número de famílias e grupos tróficos, mesmo na dose mais baixa (0,0064 g a.i./Kg). O fosetil apenas teve efeito a partir da concentração de 0,75 g

a.i./Kg. Os nemátodes classificados com valores c-p 2 e 3 foram encontrados em maior proporção após tratamento com óleo de verão e fosetil, enquanto que no ensaio com abamectina foram os nemátodes com valores c-p 1 e c-p 2 que dominaram. Os metais (Cd, Zn e Cu) tiveram efeito sobre a abundância total, o número de famílias e os nemátodes bacteriófagos, a partir de 500 mg/Kg; o efeito do Cd sobre os nemátodes parasitas das plantas foi observado, também, a partir dos 500 mg/kg; no entanto, não foram obtidas diferenças significativas por parte deste grupo de nemátodes aos outros dois metais. Os nemátodes colonizadores e mais resistentes a situações de pressão, estavam presentes em maior número nos ensaios com Cd e Cu; no tratamento com zinco não ocorreram variações significativas.

Os resultados obtidos durante esta investigação, mostraram assim, genericamente, que as comunidades de nemátodes do solo responderam aos vários níveis, de modo mais ou menos sensível, aos efeitos tóxicos dos compostos testados, indicando assim, que poderão ser usadas como bioindicadores do solo.

O estudo realizado indica que o recurso a uma abordagem deste tipo, baseada nas alterações ao nível das famílias de nemátodes presentes, e nos grupos tróficos, é possível e poderá ser considerado em estudos ecotoxicológicos, o que está de acordo com as conclusões de outros autores (Chelinho *et al.*, 2011). Fica evidenciada a importância da realização de mais estudos para um melhor conhecimento das alterações ao nível da estrutura das comunidades de nemátodes do solo em resposta ao stress induzido por contaminantes, para que possam ser usados de uma forma sistematizada.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. Referências bibliográficas

- Abrantes, I.M. de O., Morais, M.M.N. de, Paiva, I.M.P. de F.R. & Santos, M.S.N. de A. 1976. Análise Nematológica de Solos e Plantas. *Ciência Biológica (Portugal) I*, 139-155.
- Almeida, M.T.S.C.M. 1993. *Caracterização e ecologia de populações portuguesas de Trichodorus spp. e Paratrichodorus spp. (Nematoda: Trichodoridae)*. PhD. Thesis, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 567 pp.
- Amorim, M.J.B., Novais, S., Römbke., J. & Soares., A.M.V.M. 2007. Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): Effects of different exposure time and soil properties. *Elsiver. Environmental Pollution*, 155:112-116.
- Bakonyi, G., Nagy, P. & Kádár, I. 2002. Long-term effects of heavy metals and microelements on nematode assemblage. *Toxicology Letters*, 140-141:391-401.
- Baines, R.C. & Small, R.H. 1976. Effects of oxamyl on the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, and on infection of sweet orange. *Journal of Nematology*, 8:122-129.
- Baird, D.J., Rubach, M.N. & Van den Brink, P.J. 2008. Trait-Based ecological risk assessment (TERA): The new frontier?. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4:2-3.
- Bell, N.L. & Watson, R.N. 2001. Optimising the Whitehead and Hemming tray method to extract plant parasitic and other nematodes from two soils under pasture. *Nematology*, 3:179-185.
- Bernard, E. 1991. Soil nematode biodiversity. *Biology and Fertility of Soils*, 14:99-103.
- Bongers, T. 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83:14-19.
- Bongers, T. 1994. *De Nematoden van Nederland*. Natuurhistorische Bibliotheek van de KNNV, nr. 46. Pirola, Schoorl.
- Bongers, T. & Bongers, M. 1997. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, 10:239-251.
- Bongers, T. & Ferris, H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Elsevier Science*, 14:225-228

- Brenes, N., Quigley, M.N. & Reid, W.S. 1995. Determination of soil pH using a laboratory robot. Elsevier. *Analytica Chimica Acta*, 310:319-327.
- Breuce, A.M., Mulder, C., Römbke, J. & Ruf, A. 2005. Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62:211-229.
- Bueno, E.R.V., Prates, M. & Tenente, R.C.V. 2002. Avaliação de métodos tradicionais de extracção de nematóides aplicados às sementes de *Pantium maximums* infestados por *Aphelenchoides besseyi*. *Nematologia brasileira*, 26: 213-217.
- Chelinho, S., Sautter, K.D., Cachada, A., Abrantes, I., Brown, G., Duarte, A.C. & Sousa, J.P. 2011. Carbofuran effects in soil nematode communities: Using trait and taxonomic based approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74:2002-2012.
- Chen, G., Quin, J., Shi, D., Zhang, Z. & Ji, W. 2009. Diversity of soil nematodes in areas polluted with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Lanzhou, China. *Environmental Management*, 44:163-172.
- Clements, W.H. & Rohr, J.R. 2009. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicology effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:789-1800.
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C. & Cluzeau, D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35:115-134.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M. & Claudius-Cole, B. 2007. *Nematologia prática: um guia de campo e de laboratório*. Trad. Isabel Abrantes. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonos, Benin.
- Duarte, J. & Almeida, M.T.M. 2011. Comunidade de nemátodes do solo associada a *Brassica rapa*, em regime de agricultura biológica. *In: 17^{as} Actas Portuguesas de Horticultura* (Eds. Mourão, I. & Brito, L.M.). Associação Portuguesa de Horticultura, Lisboa: 98-103.
- Dube, A., Zbytniewski, R., Kowalkowski, T., Cukrowska, E. & Buszewski, B. 2000. Adsorption and Migration of Heavy Metals in Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10:1-10.

- Fallahi, E., Hafez, S.L., Colt, W.M. & Seyedbagheri, M.M. 1998. Effects of metam sodium and rootstock on plant-parasitic nematodes, tree growth, yield, fruit quality, and leaf minerals in 'Braeburn' Apple. *Nematopica*, 28:71-79.
- Ferris, H. 2010. Contribution of nematodes to the structure and function of the soil food web. *Journal of Nematology*, 42:63-67.
- Ferris, H., Venette, R.C. & Lau, S.S. 1997. Population energetics of bacterial-feeding nematodes: carbon and nitrogen budgets. *Soil Biology & Biochemistry*, 29:1183-1194.
- Ferris, H & Bongers, T. 2006. Nematode indicators of organic enrichment. *Journal of Nematology*, 38:3-12.
- Figueira, A.F., Berbara, R.L.L & Pimentel, J.P. 2011. Estrutura da população de nemátodos do solo numa unidade de produção agroecológica no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33:223-229.
- Freckman, D. W. & Ettema, C. H. 1993. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. *In* Goulart, A.M.C. 2009. *Análise de dados em estudos de diversidade de nematóides*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 46pp. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111).
- Fu, S., Coleman, D.C., Hendrix, P.F. & Crossley Jr., D.A. 2000. Responses of trophic groups of soil nematodes to residue application under conventional tillage and no-till regimes. *Soil Biology & Biochemistry*, 32:1731-1741.
- Gaugler, R. & Bilgrami, A. 2004. *Nematode Behaviour*. CABI Publishing.
- Guerene, M. 2006. Nematodes: alternative controls. ATTRA – National Sustainable Agriculture Information service, 1-1800:346-9140.
- Goulart, A.M.C. 2007. *Diversidade de nematóides em agroecossistemas e ecossistemas naturais*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 71p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111:191).
- Goulart, A.M.C. 2009. *Análise de dados em estudos de diversidade de nematóides*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 46p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111).

- Henriques, M. 2010. *Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada*. Ministério da Agricultura, do desenvolvimento e das pescas. Direcção-geral de agricultura e desenvolvimento rural.
- Holgado, R. & Magnusson, C. 2005. Importance of nematodes in organic farming. NJF report, ISSN 1653-2015.
- Höss, S., Jänsch, S., Mosu, T., Junker, T. & Römbke, J. 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1811-1818.
- Indirani, A. & Jayakumar, R. 2006. Bioefficacy of dazomet in tomato nursery. *Indian Journal of Crop Science*, 1:165-167.
- ISO, 1999. Soil Quality – Inhibition of reproduction of *Collembola (Folsomia candida)* by soil Pollutants. ISO 11267. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Korthals, W.G., van de End, A., van Megen, H., Lexmond, T. M., Kammenga, J. E. & Bongers, T. 1996. Short-term effects of cadmium, copper, nickel and Zinc on soil nematodes from different feeding and life-history strategy groups. *Applied soil ecology*, 4:107-117.
- Kapanen, A. & Itävaara, M. 2001. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49:1-16.
- Kolar, L., Eržen, N.K., Hogerwerf, L. & Gestel, C.A.M. 2007. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, 152:182-189.
- Lo, C.-C. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health Parte B*, 45:248-359.
- McSorley, R. & Frederick, J.J. 2004. Effect of extraction method on perceived composition of the soil nematode community. *Applied Soil Ecology*, 27:55-63.
- Mulder, C., Schouten, A.J., Hund-Renke, K. & Breure, A.M. 2005. The use of nematodes in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62:278-289.

- Natal-da-Luz, T, Tidona, S., Van Gestel, C.A.M, Morais, P.V. & Sousa, J.P. 2009. The use of Collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. Elsevier. *Chemosphere*, 77:1526-1533.
- Neher, D.A. 2000. Nematode communities as ecological indicators of agroecosystem health. In: Gliessman, S. R. and Ellis, E. (editors). *Advances in Agroecology*, CRC/Lewis Press, Boca Raton, FL (in press).
- Neher, D.A. 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology*. 48:371-94.
- Neher, D. A., and Barbercheck, M. E. 1998. Diversity and role of soil mesofauna. 27-47pp in: Collins, W. and Qualset, C. O. *Biodiversity in Agroecosystems*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Noling, J. 1997. Movement and toxicity of nematicides in the plant root zone. Part 1. Nematicides: Toxicity and Mode of Action. Florida Cooperative Extension Service Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. SS-ENY-906; NPP-32.
- Pen-Mouratov, S., Shukurov, N. & Steinberger, Y. 2008. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population. *Environmental pollution*, 152:172-183.
- Pen-Mouratov, S., Shukurov, N. & Steinberger, Y. 2010. Soil free-living nematodes as indicators of both industrial pollution and livestock activity in Central Asia. *Ecological Indicators*, 10:955-967.
- Perry, R. & Moens, M. 2006. *Plant Nematology*. CABI.
- Potter, J.W. & McKeown, A.W. 2002. Nematode biodiversity in Canadian agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 83:289-302.
- Porazinka, D.L. Duncan, L., McSorley, R. & Graham, J.H. 1999. Nematode communities as indicators of status and processes of a soil ecosystem influenced by agricultural management practices. *Applied Soil Ecology*, 13:69-86.
- Riggs, R.D., Hamblen, M.L. & Rakes, L. 1989. Effects of fertilizer and pesticides on Soybean growing in *Heterodera glycines* – infested soil. Supplement to *Journal of Nematology*, 4S:635-639.

- Ritzinger, C.H.S. & Fancelli, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28:331-338.
- Sánchez-Moreno, S., Camargo, J. & Navas, A. 2005. Ecotoxicological Assessment of The Impact of Residual Heavy Metals on Soil Nematodes in the Guadiamar River Basin (Southern Spain). *Environmental Monitoring and Assessment*, 116: 245–262.
- Shao, Y., Zhang, W., Shen, J., Zhou, L., Xia, H., Shu, W., Ferris, H. & Fu, S. 2008. Nematodes as indicators of soil recovery in Tailings of a lead/Zinc mine. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 2040-2046.
- Simões, J. 2005. *Utilização de produtos fitofarmacêuticos na gricultura*. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação.
- Sochová, I., Hofman, J. & Holoubek, I. 2005. Using nematodes in soil ecotoxicology, Elsevier. *Environment international*, 32:374-383.
- Tomazini, M.D., Ferraz, L.C.C.B. & Monteiro, A.R. 2008. Estrutura trófica e índices de maturidade de comunidades de nemátodes em áreas contíguas de vegetação e submetidas a diferentes tipos de uso agrícola. *Nematologia Brasileira*, 32:220-230.
- Van Bezooijen, J. 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen University. Disponível na Web: <http://www.nem.wur.nl/NR/rdonlyres/CC0A519F-3ADD-4FFA-B473-959062BC9C7F/47004/MethodsandTechniquesforNematology.pdf>
- Van den Brink, P.J., Aleandre, A.C., Desrosiers, M., Goedkoop, W., Goethals, P.L.M., Liess, M. & Dyer, S.D. 2011. Traits-Based Approaches in Bioassessment and Ecological Risk Assessment: Strengths, Weaknesses, Opportunities and threats. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7:198-208.
- Warne, M. St.J. & van Dam, R. 2008. Noec and Loec data should no longer be generated or used. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 14:1-5.
- Wasilewska, L. 1994. The effect of agr of meadows on succession and diversity in soil nematode communities. In Goulart, A.M.C. 2009. *Análise de dados em estudos de diversidade de nematóides*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 46p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111).

- Weischer, B. & Brown, D. 2000. *An introduction to Nematodes*. General Nematology. A student's textbook. Pensoft.
- Wen-Ju, L., Lavian, I., Pen.Mouratov, S. & Steinberger, Y. 2005. Diversity and dynamics of soil free-living nematode populations in a Mediterranean agroecosystem. *Pedosphere*, 15: 204-215.
- Whitford, W.G.; Freckman, D.W.; Santos, P.F.; Elkins, N.Z.; Parker, L.W. 1982. The role of nematodes in decomposition in desert ecosystems. *In: Goulart, A.M.C. 2007. Diversidade de nematóides em agroecossistemas e ecossistemas naturais*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 71p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111:191).
- Yeates, G.W. 1999. Effects of Plants on Nematode Community Structure. *Annual Review of Phytopathology*, 37:127- 49
- Yeates, G.W. & Bongers, T. 1995. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74:113-135.
- Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G. M., Freckman, D.W. & Georgieva, S. S. 1993. Feeding habits in soil Nematode families and genera – An outline for soil Ecologists. *Journal of Nematology*, 25: 315-331.
- Yeates, G.W. 2003. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils*, 37:199-210.

VI. ANEXOS

Tabela VII – Contribuição (média e %) das famílias de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com produtos fitofarmacêuticos.

Produto Fitofarmacêutico	Família	C0 - C1			C0 - C2			C0 - C3		
		Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	DISS/SD
Óleo de Verão	Pratylenchidae	15,02	40,76	1,44	12,91	37,53	1,75	20,87	40,51	2,73
	Cephalobidae	9,18	24,9	1,57	8,79	25,57	3,75	12,59	24,44	4,05
	Aphelenchidae	3,82	10,37	1,17	3,76	10,92	1,18	4,67	9,07	1,18
Abamectina	Pratylenchidae	28,1	30,92	4,72	28,98	30,76	10,4	30,12	30,78	12,36
	Cephalobidae	28,05	30,87	12,56	28,77	30,53	4,72	29,5	30,14	4,79
	Aphelenchidae	14,8	16,28	1,9	15,33	16,27	1,87	-	-	-
Fosetil	Pratylenchidae	8,02	25,98	1,26	9,06	26,56	1,66	11,42	28,07	1,22
	Cephalobidae	7,56	24,47	1,4	8	23,46	1,32	11,36	27,9	1,24
	Paratylenchidae	5,47	17,72	2,5	5,74	16,84	2,57	6,1	14,98	2,36

C0 – controlo; Óleo de Verão: C1 – 0,24 g a.i./Kg, C2 – 0,36 g a.i./Kg, C3 – 0,48 g a.i./Kg ; Abamectina: C1 – 0,0064 g a.i./Kg, C2 – 0,0096 g a.i./Kg, C3 – 0,0128 g a.i./Kg; Fosetil: C1 – 0,5 g a.i./Kg, C2 – 0,75 g a.i./Kg, C3 – 1 g a.i./Kg

Tabela VIII – Contribuição (média e %) dos grupos tróficos de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com produtos fitofarmacêuticos.

Produto Fitofarmacêutico	Grupos tróficos	C0 - C1			C0 - C2			C0 - C3		
		Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	DISS/SD
Óleo de Verão	PP	18,69	48,00	1,44	17,09	46,76	1,76	27,50	50,23	2,93
	BF	12,30	31,57	1,57	11,16	30,53	3,12	17,78	32,39	4,22
	FF	-	-	-	7,64	20,90	1,71	8,82	16,12	1,70
Abamectina	PP	62,17	69,63	13,70	65,29	69,78	14,09	68,19	69,62	17,95
	BF	18,59	20,82	9,97	19,60	20,99	8,84	20,84	21,88	12,83
Fosetil	PP	12,71	48,95	1,6	15,85	48,97	2,31	19	49,13	1,64
	BF	11,77	45,32	1,76	14,44	44,69	2,29	17,71	45,79	1,56

PP – parasitas das plantas; BF – bacteriófagos; FF – fungívoros. C0 – controlo; Óleo de Verão: C1 – 0,24 g a.i./Kg, C2 – 0,36 g a.i./Kg, C3 – 0,48 g a.i./Kg ; Abamectina: C1 – 0,0064 g a.i./Kg, C2 – 0,0096 g a.i./Kg, C3 – 0,0128 g a.i./Kg; Fosetil: C1 – 0,5 g a.i./Kg, C2 – 0,75 g a.i./Kg, C3 – 1 g a.i./Kg

Tabela IX – Contribuição (média e %) das famílias de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com metais.

Produto Fitofarmacêutico	Famílias	C0 - C1			C0 - C2			C0 - C3		
		Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	DISS/SD
Cádmio	Pratylenchidae	6,6	33,77	1,41	26,74	35,91	3,41	36,42	38,01	9,71
	Cephalobidae	2,52	12,9	1,17	18,88	25,36	4,33	24,44	25,43	7,94
	Rhabditidae	-	-	-	9,76	13,11	5,26	11,18	11,63	8,16
	Aphelenchidae	1,8	9,23	1,13						
Zinco	Cephalobidae	5,44	25,54	1,51	10,45	34,83	1,83	18,59	36,88	1,7
	Pratylenchidae	6,24	29,29	1,67	6,2	20,68	1,18	13,99	27,76	1,33
	Paratylenchidae	-	-	-	4,49	14,95	1,13	6,41	12,71	1,43
	Rhabditidae	2,98	13,98	2,13	-	-	-			
Cobre	Cephalobidae	4,01	26,06	1,11	15,02	35,42	2,94	27	44,8	3,37
	Rhabditidae	3,96	25,73	1,11	11,33	26,72	1,95	12,15	20,16	1,49
	Paratylenchidae	-	-	-	-	-	-	4,04	6,7	2,55
	Aphelenchidae	1,04	6,73	1,82	2,92	6,89	1,68	-	-	-

C0 – controle; C1 – 100 mg/Kg; C2 – 500 mg/Kg; C3 – 1000 mg/Kg.

Tabela X – Contribuição (média e %) dos grupos tróficos de nemátodes para as dissimilaridades nos tratamentos com metais.

Produto Fitofarmacêutico	Grupos tróficos	C0 - C1			C0 - C2			C0 - C3		
		Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	Diss/SD	Cont. Média	Cont. (%)	DISS/SD
Cádmio	PP	7,87	51,69	1,47	37,48	50,46	3,68	50,36	52,47	15,72
	BF	4,64	30,47	1,37	33,34	44,89	5,45	40,87	42,58	12,60
	FF	1,80	11,85	1,14	-	-	-	-	-	-
Zinco	BF	6,42	42,40	1,03	13,97	55,17	1,73	25,10	47,23	1,55
	PP	7,54	49,80	1,43	9,77	38,60	1,73	22,06	45,08	1,37
Cobre	BF	5,26	54,57	1,01	29,92	71,28	4,57	42,98	72,85	3,27
	PP	2,37	24,63	1,56	8,13	19,36	2,82	10,55	17,88	1,65
	FF	1,04	10,74	1,82	-	-	-	-	-	-
	POM	0,97	10,05	1,85	-	-	-	-	-	-

PP – parasitas das plantas; BF – bacteriófagos; FF – fungívoros; POM – predadores e omnívoros.

C0 – controle; C1 – 100 mg/Kg; C2 – 500 mg/Kg; C3 – 1000 mg/Kg

A realização deste trabalho, com solo cedido pelo Centro de Interpretação de Carvalho de Calvos, onde é mantida uma horta em modo de produção biológica, permitiu a participação num Congresso Internacinal de Nematologia (XLIII ONTA Annual Meeting, que decorreu de 4 a 8 de Setembro de 2011, em Coimbra) com a apresentação de uma comunicação em painel (Anexo I) e a participação num Colóquio (3º Colóquio Nacional de Horticultura Biológica e 1º Colóquio Nacional de Produção Animal Biológica, que decorreu, entre 22 a 24 de Setembro de 2011, em Braga), com a apresentação de uma comunicação em painel (Anexo II) e a publicação do trabalho nas 17^{as} Actas Portuguesas de Horticultura (Anexo III).

Anexo I

Soil nematodes associated with *Brassica rapa* under organic farming



Joana Duarte and Maria Teresa Martins de Almeida
Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga



mtalmeida@bio.uminh.pt



A vegetable garden is maintained under organic farming in northern Portugal. Plant-parasitic nematodes are generally associated with intensive agriculture resulting in reduced yields. Their control is not always easy, often being based on the application of chemical pesticides, a practice not permitted in certified organic farming. In the present vegetable garden only natural organic fertilization is applied using locally produced compost. The present study aimed to determine the nematofauna associated with *Brassica rapa* grown in such production system.

MATERIALS and METHODS



Fig.1. *Brassica rapa* cultivated under organic farming



Fig.2. Natural compost production for local organic fertilization

- **Locality:** Centro de Interpretação do Carvalho de Calvos, Póvoa de Lanhoso, Braga
- **Study conditions:** *Brassica rapa* cultivated under organic farming; fertilization: only natural organic compost (Figs. 1 and 2)
- **Samples:** soil collected from the rhizosphere, at 10-30 cm deep
- **Nematodes:** extracted by the Whitehead and Hemming tray method
- **Nematodes identification:** to family level and trophic groups
- Mean numbers refer to three replicates of each sample
- The percentage of nematodes of each trophic group was calculated

RESULTS

Table I. Percentage of nematodes* of each family in the various trophic groups, in the soil, associated with *Brassica rapa*.

Trophic Group	Family	Percentage [%]*
Bacteriophagous	Alaimidae	4.5
	Bastianiidae	1.3
	Cephalobidae	19.5
Fungivorous	Rhabditidae	27.6
	Aphelenchidae	1.3
Predators/ omnivorous	Aporcelaimidae	3.2
	Prismatolaimidae	0.9
Plant parasitic	Heteroderidae	4.1
	Hoplolaimidae	1.3
	Longidoridae	0.5
	Pratylenchidae	10.4
	Trichodoridae	0.5
	Tylenchidae	24.9

* Per 250 cc soil

Nematode families diversity/ trophic group: 13

- 6 - plant parasitic nematodes
- 4 - bacteriophagous
- 2 - predators/omnivorous
- 1 - fungivorous

Nematodes dominance in the different families and trophic groups

- Bacteriophagous: Rhabditidae (**27.6%**)
- Plant parasites: Tylenchidae (**24.9%**)
- Predators and omnivorous: Aporcelaimidae (**3,2%**)
- Fungivorous: Aphelenchidae (1.3%) (just one family)

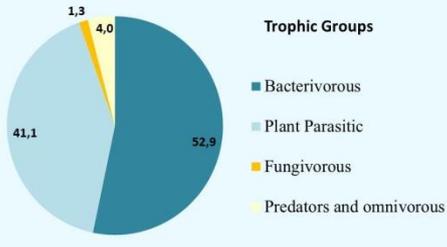


Figura 3. Percentages of the different trophic groups of nematodes present in the soil, associated with *Brassica rapa*.

CONCLUSIONS and PERSPECTIVES

- ✓ Bacteriophagous nematodes were the dominant nematodes, however, plant parasitic nematodes were also present in a high percentage.
- ✓ The use of local organic fertilization (natural compost) seems be a healthy practice for the organic farming system.
- ✓ It would be important to apply this study to the rest of the vegetable garden and follow results along time.
- ✓ For long-term sustainability populations of plant parasitic and beneficial nematodes should be regularly monitored.

ACKNOWLEDGEMENTS

- ❖ To CBMA of Universidade do Minho
- ❖ To Centro de Interpretação do Carvalho de Calvos, in particular to Eng. Natália Costa






The work was funded by FEDER through COMPETE Program and National Funds through FCT (Portuguese Foundation for Science and Technology), under the project Pest-C/BIA/U14050/2011

Duarte, J. & Almeida, M.T.M. 2011. Soil nematodes associated with *Brassica rapa* under organic farming. *XLIII Onta Annual Meeting, Coimbra, Portugal. September 4-8, 2011*: 117. (Abstr.)

Anexo II



Comunidade de nemátodes do solo associada a *Brassica rapa*, em regime de agricultura biológica



joana.jod@hotmail.com

Joana Duarte e Maria Teresa Martins de Almeida



Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga

No Centro Interpretativo do Carvalho de Calvos, no norte de Portugal, é mantida uma horta em regime de agricultura biológica. Geralmente estão associados à agricultura intensiva nemátodes fitoparasitas com impacto negativo sobre a produção. O seu controlo nem sempre é fácil, recorrendo-se frequentemente à aplicação de pesticidas químicos; contudo, em agricultura biológica esta prática está interdita. Nesta horta é utilizada unicamente fertilização orgânica, resultante de compostagem praticada localmente. O presente estudo teve como objectivo o conhecimento da nematofauna associada a nabiça, *Brassica rapa*, cultivada neste regime.

MATERIAL e MÉTODOS



Fig. 1. *Brassica rapa* cultivada em regime de agricultura biológica.



Fig. 2. Composto natural produzido localmente para a fertilização.

- **Localidade:** Centro de Interpretação do Carvalho de Calvos, Póvoa de Lanhoso, Braga
- **Condições do estudo:** *Brassica rapa* cultivada em regime de agricultura biológica; fertilização: apenas composto orgânico natural (Figs. 1 e 2)
- **Amostras:** solo colhido na rizosfera, a 10-30 cm de profundidade
- **Nemátodes:** extraídos pelo método do tabuleiro, de Whitehead e Hemming
- **Identificação dos nemátodes:** ao nível da família e grupos tróficos
- Os números médios referem-se a três réplicas de cada amostra
- Para cada amostra foi calculada a percentagem de nemátodes de cada grupo trófico

RESULTADOS

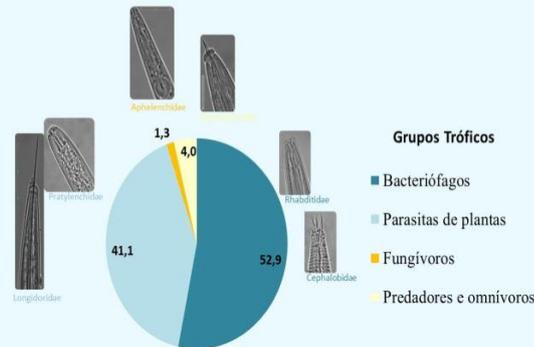
Tabela I. Percentagem de nemátodes* de cada família, dos vários grupos tróficos, no solo, associados a *Brassica rapa*.

Grupo trófico	Família	Percentagem (%) ^a
Bacteriófagos	Alaimidae	4.5
	Bastianidae	1.3
	Cephalobidae	19.5
	Rhabditidae	27.6
Fungívoros	Aphelenchidae	1.3
Predadores/ omnívoros	Aporcelaimidae	3.2
Parasitas das plantas	Prismatolaimidae	0.9
	Heteroderidae	4.1
	Hoplolaimidae	1.3
	Longidoridae	0.5
	Pratylenchidae	10.4
	Tylenchidae	24.9

* Por 250 cc de solo

Diversidade de famílias de nemátodes/ grupo trófico: 13

- 6 – nemátodes parasitas das plantas
- 4 - bacteriófagos
- 2 – predadores/ omnívoros
- 1 - fungívoros



Famílias de nemátodes dominantes em cada grupo trófico

- Bacteriófagos: Rhabditidae (27.6%)
- Parasitas das plantas: Tylenchidae (24.9%)
- Predadores e omnívoros: Aporcelaimidae (3,2%)
- Fungívoros: Aphelenchidae (1.3%) (apenas uma família)

CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

- ✓ Os nemátodes bacteriófagos constituíram o grupo dominante; no entanto, os nemátodes fitoparasitas estavam presentes e, também, numa percentagem elevada.
- ✓ O uso de fertilização orgânica natural (composto) parece ser uma prática com resultados satisfatórios no presente sistema de agricultura biológica.
- ✓ Seria importante estender este estudo à restante parte da horta, bem como acompanhar a evolução da situação ao longo do tempo.
- ✓ Para uma boa gestão do sistema, as populações de nemátodes fitoparasitas e dos nemátodes benéficos deveriam ser monitorizadas com regularidade.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao CBMA da Universidade do Minho
- ❖ Ao Centro de Interpretação do Carvalho de Calvos, em particular à Eng.ª Natália Costa



O Trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional de Fundos de Competitividade - COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projecto PEst- C/BIA/UI14050/2011

Duarte, J. & Almeida, M.T.M. Comunidade de nemátodes do solo associada a *Brassica rapa*, em regime de agricultura biológica. 3^o Colóquio Nacional de Horticultura Biológica e 1^o Colóquio Nacional de Produção Animal Biológica, Braga, Portugal, 2011: 104. (Abstr.)

Comunidade de nemátodes do solo associada a *Brassica rapa*, em regime de agricultura biológica

Joana Duarte & Maria Teresa Martins de Almeida

Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, mtalmeida@bio.uminho.pt

Resumo

No Centro Interpretativo do Carvalho de Calvos é mantida uma horta em regime de agricultura biológica. Geralmente estão associados à agricultura intensiva nemátodes fitoparasitas com impacto negativo sobre a produção. O seu controlo nem sempre é fácil, recorrendo-se frequentemente à aplicação de pesticidas químicos; contudo, em agricultura biológica esta prática está interdita. Nesta horta é unicamente utilizada fertilização orgânica, resultante de compostagem praticada localmente, com sucesso. O presente estudo teve como objectivo o conhecimento da nematofauna associada a nabica, *Brassica rapa*, cultivada neste regime, uma vez que os nemátodes do solo são também considerados bioindicadores. Foram colhidas diversas amostras de solo, na zona da rizosfera, entre 10 a 30 cm de profundidade, ao longo do talhão cultivado. O solo (sub-amostras de 100 cc) foi posteriormente processado no laboratório, pelo método do tabuleiro. As suspensões aquosas obtidas foram observadas ao microscópio óptico invertido para a extracção e isolamento dos nemátodes, os quais foram quantificados e identificados ao nível da família e segundo o grupo trófico (bacteriófagos, fungívoros, omnívoros, predadores e parasitas das plantas). Foram identificadas 13 famílias, das quais seis eram de nemátodes fitoparasitas, quatro de bacteriófagos, duas de predadores e uma de nemátodes fungívoros. Apesar da incidência de nemátodes fitoparasitas (41%), o grupo trófico dominante (52,9%) foi o de nemátodes bacteriófagos. Os resultados obtidos indicam que a fertilização orgânica natural parece ser uma prática saudável na horta biológica.

Palavras-chave: biodiversidade, controlo, fitopatologia, melhoramento de plantas, produção biológica.

Abstract

Community of soil nematodes associated to *Brassica rapa* under organic farming.

A vegetable garden is maintained under organic farming at Carvalho de Calvos Interpretive Center. Phytoparasitic nematodes are generally associated to intensive agriculture with a negative effect on crop production. Their control is not always easy, being often based on the application of chemical pesticides that are forbidden in organic farming. In this vegetable garden only natural organic fertilizer is used, resulting from organic manure locally produced. The present study describes the nematofauna associated with turnip, *Brassica rapa*, grown in such a scheme, without chemical compounds application, since the nematodes in soil are also considered as bioindicators. Several samples of soil were collected in the rhizosphere of turnip, at 10 to 30 cm deep, along the cultivated plot. The soil was subsequently processed in the laboratory by the tray method. Aqueous suspensions obtained were later observed under an inverted microscope for the extraction of nematodes, which were quantified and identified at the family level and considering the trophic group (bacteriophagous, fungivorous, omnivores and carnivores, and plant parasites). Thirteen families were registered: six were plant parasitic nematodes, four were bacteriophagous, two were predators and one was of fungivorous nematodes. Although the incidence of phytonematodes (41%), bacteriophagous were the dominant group (52.9%). The results indicate that natural organic fertilization seems to be a healthy practice in the organic vegetable garden.

Keywords: biodiversity, control, organic manure, plant breeding, plant pathology.

Introdução

A fauna é uma parte importante dos ambientes do solo, estando envolvida em muitos aspectos da decomposição da matéria orgânica, regulação parcial da actividade microbiana, ciclos dos nutrientes e estrutura fraccionada (Cortez et al., 1999). Particularmente os nemátodes, são uma

componente importante destes ecossistemas (Holgado & Magnusson, 2005). A estrutura da comunidade de nemátodes oferece um eficiente instrumento para a avaliação biológica da qualidade e funcionamento dos solos (Bongers & Bongers, 1997), devido à sua diversidade e abundância. Os nemátodes são organismos pequenos que dependem da fina película de água em torno das partículas e que em contacto com a solução do solo utilizam uma grande variedade de recursos alimentares, tendo um tempo de geração curto e sendo facilmente amostrados e identificados ao nível de grupos taxonómicos significativos, ou de grupos funcionais (Yeates, 1999; Yeates & Bongers, 1999). No solo existem, em proporções variáveis, nemátodes com diferentes regimes alimentares. Yeates et al., (1993) propuseram uma classificação baseada no modo de alimentação para facilitar a interpretação das mudanças na estrutura da comunidade de nemátodes que inclui, de modo simplificado: nemátodes de vida livre (bacteriófagos, fungívoros, predadores e omnívoros) e nemátodes parasitas de plantas. Uma análise da presença e abundância de espécies e grupos tróficos pode reflectir a actividade dos processos de decomposição, e indicar os efeitos das práticas agrícolas e de contaminantes e resíduos sobre o funcionamento da cadeia alimentar do solo, fornecendo uma base para a gestão ambiental, reabilitação e conservação (Bongers & Bongers, 1999; Bongers & Ferris, 1999; Fu et al., 2000).

A agricultura biológica procura fortalecer as reservas de nutrientes no solo reduzindo, ao mesmo tempo, as entradas de produtos químicos de síntese. Os microrganismos do solo são o elo essencial entre as reservas de nutrientes minerais e as plantas sendo os nemátodes componentes importantes deste ecossistema (Holgado & Magnusson, 2005). Os nemátodes de vida livre, concretamente, são vitais na decomposição da matéria orgânica e na reciclagem dos nutrientes nestes ecossistemas e a adição de composto aumenta o número de nemátodes bacteriófagos (McSorley, 2011).

Os nemátodes são organismos com importância na agricultura podendo os parasitas das plantas, cerca de 4000 espécies descritas, causar prejuízos em numerosas culturas, incluindo hortícolas. Estes nemátodes podem afectar seriamente a saúde das plantas, levando à redução do rendimento e da qualidade das culturas. Vários são os exemplos de espécies de nemátodes fitoparasitas, com diversos tipos de parasitismo, que causam danos com relevo económico, mesmo em agricultura biológica (Holgado & Magnusson, 2005).

O controlo químico é uma das medidas mais eficazes no controlo destes nemátodes. No entanto, o seu uso está cada vez mais condicionado e limitado e está interdito em sistemas de agricultura biológica certificada. Uma das alternativas à sua utilização consiste no uso de produtos fitofarmacêuticos, neste caso nematodocidas, que desempenham um papel importante para assegurar a protecção das culturas (Simões, 2005; Lima, 2006), através da sua acção em diferentes processos vitais, incluindo os sistemas, respiratório, enzimático e nervoso, de forma a tornarem-se letais (Noling, 1997; Henriques, 2010). Contudo podem levar à redução da biodiversidade do solo (Lima, 2006). A incorporação de material verde, incluindo variedades de espécies da família Brassicaceae, capazes de gerar produtos tóxicos que promovem o controlo de muitos fitoparasitas presentes nas áreas de cultivo pode ser uma alternativa ao uso de fumigantes sintéticos, menos prejudicial para o meio ambiente (Lima, 2006). O funcionamento dos ecossistemas do solo é dependente dos processos biológicos e os nemátodes são adequados para a monitorização de indicadores ecológicos e avaliação de áreas agrícolas (Höss et al., 2009).

Uma produção com maior rendimento só é possível através de meios e práticas segundo uma agricultura sustentável (Simões, 2005). Segundo Holgado & Magnusson (2005) o controlo dos nemátodes fitoparasitas passa pela sua manutenção em densidades abaixo do limiar económico prejudicial e aponta a questão do seu controlo como um desafio à ciência da nematologia na gestão de sistemas de agricultura biológica, chamando a atenção para a necessidade de manter e facilitar o ambiente favorável aos nemátodes com efeitos benéficos (bacteriófagos, fungívoros e predadores). Os mesmos autores consideram que os nemátodes devem ser monitorizados regularmente neste tipo de sistemas.

O presente trabalho teve como objectivo conhecer a nematofauna presente num sector de cultivo de *Brassica rapa* num local em que é praticada agricultura biológica e em que o solo é exclusivamente enriquecido com compostagem natural local.

Material e Métodos

Amostragem

O trabalho foi realizado em Novembro de 2010, numa horta em que é praticada agricultura biológica certificada, localizada no Norte de Portugal, no Centro Interpretativo de Carvalho de Calvos, Póvoa de Lanhoso. Um dos sectores da horta tinha nabiça (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) semeada

recentemente. Nesta horta é utilizada fertilização orgânica com um composto produzido localmente com estrume (de cavalo) e resíduos verdes (resultantes dos cortes de relva e folhas provenientes da limpeza dos jardins).

Foram colhidas diversas amostras de solo a 10-30 cm de profundidade, as quais foram posteriormente colocadas juntas e misturadas com cuidado. Este solo foi mantido no escuro, numa câmara frigorífica a 4°C, até ser processado (Bongers & Bongers, 1997).

Factores abióticos do solo

Foram determinados o pH, a capacidade de retenção de água e a matéria orgânica do solo, esta última através do método da perda à ignição a 550°C ±25°C (Allen, 1989; Margesin & Schinner, 2005).

Extração dos nemátodes

Os nemátodes foram extraídos do solo pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming, segundo Abrantes et al. (1976), tendo sido processadas três réplicas de 250 cc de solo. Inicialmente procedeu-se à remoção de pedras e detritos (Coyne et al., 2007), tendo-se seguidamente espalhado o solo cuidadosamente num tabuleiro, sobre papel permeável suportado por uma rede sem tocar no fundo. Foi então adicionada água ao fundo do tabuleiro, de forma a ficar em contacto com o solo, mantendo a sua superfície apenas humedecida. Após 48 horas a rede com o solo foi retirada cuidadosamente e a água do tabuleiro foi vertida num copo de 500 ml, onde a suspensão de nemátodes ficou a assentar durante 4 horas para que estes se concentrassem no fundo. Após este tempo a água sobrenadante foi aspirada até obtenção de um volume de cerca de 100 ml (Abrantes et al., 1976). O processo anterior foi repetido de modo a obter-se um volume ainda menor, de 50 ml, daquela suspensão. De cada réplica foram observados 5ml de suspensão recorrendo a um microscópio invertido, para identificação e quantificação dos nemátodes pertencentes a diferentes famílias dos diversos grupos tróficos. Os nemátodes foram retirados da suspensão e separados com o auxílio de uma pestana aderente a uma vareta de vidro fina e colocados numa lâmina, numa gota de água, para a identificação, através de um microscópio óptico.

Foi calculado o número médio de nemátodes das réplicas observadas e determinada a percentagem de nemátodes dos diferentes grupos tróficos e famílias presentes no local estudado.

Resultados e Discussão

A colheita de solo neste Centro Interpretativo não foi efectuada com o objectivo inicial de se conhecer a nematofauna da horta em causa, mas sim, para uma outra investigação em que era necessária a obtenção de nemátodes a partir de uma comunidade diversa e não sujeita à acção de compostos químicos. Ao serem colhidas amostras de solo, considerou-se de interesse conhecer e registar a nematofauna associada a uma cultura recente de nabiça, uma vez que este estudo nunca tinha sido realizado anteriormente no local.

As análises efectuadas no solo revelaram um pH 6, capacidade de retenção da água de 30,5% e 6,2% de matéria orgânica.

Os resultados obtidos permitiram verificar que um pouco mais de metade (52,9%) dos nemátodes da comunidade do solo estudados eram bacteriófagos, seguindo-se os parasitas das plantas (41%), os predadores e omnívoros (4%) e os fungívoros (1%) (fig.1). Foram identificadas, ao todo, 13 famílias, das quais: quatro são de nemátodes bacteriófagos, uma de nemátodes fungívoros, duas de predadores e omnívoros e seis de parasitas de plantas (quadro 1). A maior diversidade foi encontrada nos nemátodes fitoparasitas.

Entre os nemátodes bacteriófagos, as famílias Rhabditidae (27,6%) e Cephalobidae (19,5%) foram as dominantes. Os Tylenchidae (24,9%) e Pratylenchidae (10,4%), nemátodes parasitas de plantas, estiveram representados de forma aproximadamente idêntica. Por outro lado, as famílias representadas por menos nemátodes, Longidoridae e Trichodoridae, são igualmente parasitas de plantas. Os grupos de nemátodes predadores e omnívoros, e os fungívoros, representados respectivamente pelas famílias Aporcelaimidae, Pristomatolaimidae e Aphelenchidae, estiveram presentes em pequena quantidade: 3,2%, 0,9% e 1,3% (quadro 1).

Resultados idênticos foram encontrados por outros autores, que registaram os nemátodes bacteriófagos como o grupo trófico predominante e os parasitas de plantas como o segundo grupo mais importante em comunidades agrícolas, enquanto os nemátodes fungívoros (mais abundantes na estação seca do Verão) e os predadores e omnívoros (considerados de interesse pelo seu potencial como agentes de controlo biológico de nemátodes parasitas das plantas) são encontrados em menor número (Bongers & Bongers, 1997; Fu et al., 2000; Mattos et al., 2006; Yeates & Bongers, 1995).

Na fase inicial, após adição de matéria orgânica ao solo, e com o aumento da biomassa microbiana (Bernard, 1991; Yeates et al., 1999), os nemátodes bacteriófagos respondem muito mais cedo e mais rapidamente (Fu et al., 2000), encontrando-se em número superior (Sohlenius & Bastrom, 1984; Bernard, 1991; McSorley, 2010). Os nemátodes da família Rhabditidae são os que se encontram em maior número nos primeiros estágios de decomposição (Sohlenius & Bastrom, 1984), devido à sua capacidade microaeróbica ou quiescente (Ferris & Bongers, 2006).

Apesar do número de nemátodes parasitas das plantas relativamente elevado, a cultura de nabijas mostrou produtividade (Natália Costa, comunicação pessoal). Embora os nemátodes da família Tylenchidae estivessem presentes com uma percentagem aproximada de 25%, Ferris & Bongers (2006) referiram que estes nemátodes podem constituir 30% dos indivíduos na comunidade de nemátodes de um solo, pois é das famílias mais diversificadas tendo contudo parte das espécies uma importância económica relativamente baixa. A presença de nemátodes parasitas com um largo espectro de hospedeiros, mesmo numa quantidade reduzida, como Heteroderidae e Pratylenchidae, poderá não ser negligenciável devendo ter-se atenção às culturas que se possam seguir.

Num estudo recente do efeito de um composto e de fertilizante químico na comunidade de nemátodes num campo de milho a densidade de nemátodes totais e de bacteriófagos foi superior no solo tratado com composto e, por outro lado, a razão bacterívoros e fungívoros relativamente aos parasitas das plantas também foi superior no solo tratado com composto (Hu & Qi, 2011). Olabiyi et al. (2007) obtiveram uma redução significativa na população de nemátodes fitoparasitas com importância, como *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* sp. e *Xiphinema* sp., e um aumento significativo do crescimento e da produção de feijão-miúdo, com a aplicação de fertilizante orgânico.

A utilização de químicos de síntese pode alterar as comunidades de nemátodes do solo, podendo diminuir a sua densidade ou diversidade, nomeadamente os bacteriófagos. Os nossos resultados parecem confirmar que a utilização de fertilização orgânica favorece o aumento do número de nemátodes de vida livre, nomeadamente bacteriófagos, o que poderá dever-se ao aumento de bactérias no solo. Sabendo que os nemátodes de vida livre têm um papel importante nos processos de decomposição da matéria orgânica e de reciclagem dos nutrientes (McSorley, 2011), qualquer medida de controlo sustentável deverá passar pelo cuidado de não suprimir nem reduzir estes nemátodes. A monitorização dos nemátodes deve ser um pré-requisito para a gestão da agricultura biológica, quer relativamente ao controlo dos nemátodes fitoparasitas, quer às boas práticas de gestão relativa aos nemátodes benéficos (Holgado & Magnusson, 2005).

Yeates et al. (1999) alertam contudo para que uma avaliação efectiva das práticas agrícolas, as quais influenciam a abundância e a composição da nematofauna do solo, deve ser feita a longo prazo, quando o ecossistema tiver atingido algum grau de equilíbrio e não apenas nas fases iniciais. No presente estudo ficou por conhecer a forma como a comunidade de nemátodes evoluiu em estágios mais avançados, uma vez que as amostras foram colhidas apenas no início da cultura e seria também desejável acompanhar a evolução desta comunidade em anos consecutivos.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a utilização de fertilização orgânica como a que é utilizada no local estudado, neste tipo de agricultura, parece permitir manter de forma saudável a cultura de hortícolas, nomeadamente de *B. rapa*, sem o recurso a compostos químicos, mesmo estando presentes alguns nemátodes fitoparasitas. Consideramos que teria grande interesse alargar a amostragem e o estudo a toda a horta, bem como acompanhar a evolução da comunidade de nemátodes ao longo do tempo, para possibilitar um estudo e compreensão mais aprofundados deste sistema.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro Interpretativo do Carvalho de Calvos e em particular à Engenheira Natália Costa, o apoio inestimável e as facilidades concedidas para a colheita de amostras naquele local; à Doutora Teresa Valente, do Departamento de Ciências da Terra da U.M., agradece-se a determinação da matéria orgânica. O trabalho foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Ambiental da U.M., com o apoio financeiro do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projecto PEst-C/BIA/UI4050/2011.

Referências

- Abrantes, I.M. de O., Morais, M.M.N. de, Paiva, I.M.P. de F.R. & Santos, M.S.N. de A. 1976. Análise Nematológica de Solos e Plantas. *Ciência Biológica (Portugal)* 1 139-155.
- Bernard, E.C. 1991. Soil Nematode Biodiversity. *Biology and fertility of soils* 99-103.
- Bongers, T. & Bongers, M. 1997. Functional diversity of nematodes. Elsevier. *Applied Soil Ecology* 239-251.
- Bongers, T. & Ferris, H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Elsevier Science.
- Cortef, J., Vauflery, A.G.-De, Balaguer, N.P., Gomot, L., Texier, C. & Cluzeau, D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal Soil Biology* 115-134.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M. & Claudius-Cole, B. 2007. *Nematologia prática: um guia de campo e de laboratório*. Trad. Isabel Abrantes. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonos, Benin.
- Ferris, H. & Bongers, T. 2006. Nematode Indicators of Organic Enrichment. *Journal of Nematology* 3-12.
- Fu, S., Coleman, D.C., Hendrix, P.F. & Crossley Jr., D.A. 2000. Responses of trophic groups of soil nematodes to residue application under conventional tillage and no-till regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1731-1741.
- Henriques, M. 2010. Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada. Ministério da Agricultura, do desenvolvimento e das pescas. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural.
- Holgado, R. & Magnusson, C. 2005. Importance of Nematodes in Organic Farming. NJF report. ISSN 1653-2015.
- Höss, S., Jänsch, S., Mosu, T., Junker, T. & Römbke, J. 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1811-1818.
- Hu, C. & Qi, Y. 2011. Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field. *European Journal of Soil Biology* 46: 230-236.
- Lima, A. 2006. Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para controle de fitonematóides. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Mattos, J.K.A., Huang, S.P. & Pimentel, C.M.M. 2006. Grupos tróficos da comunidade de nematóides do solo em oito sistemas de uso da terra nos Cerrados do Brasil Central. *Nematologia Brasileira* 30: 267-273.
- McSorley, R. 2011. Effect of disturbances on trophic groups in soil nematode assemblages. *Nematology* 13: 553-559.
- Noling, J. 1997. Movement and toxicity of nematocides in the plant root zone. Institute of food and agricultural sciences. University of Florida.
- Olabi, T.I., Akanbi, W.B. & Adepoju, I.O. 2007. Control of certain nematode pests with different organic manure on cowpea. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science* 2: 523-527.
- Simões, J. 2005. Utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação. Principia, Publicações Universitárias e Científicas.
- Sohlenius B. & Boström S. 1984. Colonization, population development and metabolic activity of nematodes in buried barley straw. *Pedobiologia* 27: 67-78.
- Steel, H., Peña, E., Fonderie, P., Willekens, K., Borgonie, G. & Bert, W. 2009. Nematode succession during composting and the potential of the nematode community as an indicator of compost maturity. *Pedobiologia* 181-190.
- Yeates, G.W. 1999. Effects of Plants on Nematode Community Structure. *Annual Review of Phytopathology* 37:127-49.
- Yeates, G.W. & Bongers, T. 1995. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113-135.
- Yeates, G.W., Wardle, D.A. & Watson, R.N. 1999. Responses of soil nematode populations, community structure, diversity and temporal variability to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 1721-1733.
- Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G.M., Freckman, D.W. & Georgieva, S.S. 1993. Feeding habits in soil Nematode families and genera – An outline for soil Ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315-331.

Quadro 1 - Grupos tróficos e percentagem de nemátodes de cada família, presentes no solo com nabiça, em regime de agricultura biológica.

Grupo trófico	Família	N.º nemátodes (por 250 cc de solo)	%
Bacteriófagos	Alaimidae	100	4,5
	Bastianiidae	30	1,3
	Cephalobidae	430	19,5
	Rhabditidae	610	27,6
Fungívoros	Aphelenchidae	30	1,3
Predadores e omnívoros	Aporcelaimidae	70	3,2
	Prismatolaimidae	20	0,9
Parasitas de plantas	Heteroderidae	90	4,1
	Hoplolaimidae	30	1,3
	Longidoridae	10	0,5
	Pratylenchidae	230	10,4
	Trichodoridae	10	0,5
	Tylenchidae	550	24,9

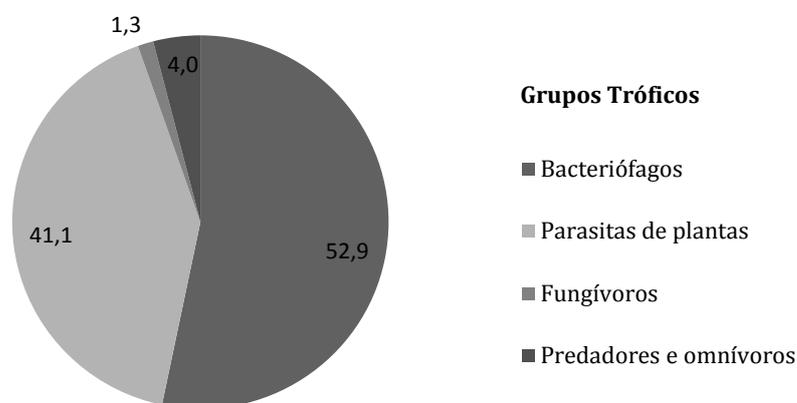


Figura 1 - Percentagem de nemátodes dos diferentes grupos tróficos (bacteriófagos, parasitas de plantas, fungívoros e predadores/omnívoros), presentes no solo, associados a *Brassica rapa*.