



Crescimento e Qualidade microbiológica das ostras produzidas em cultivos multitróficos *versus* monocultivos

André Tiago Carvalhal Silva Ferreira

Mestrado em Aquacultura e Pescas

Orientadoras: Professora Doutora Lídia Dionísio

Doutora Florbela Soares

maio – 2015



Crescimento e Qualidade microbiológica das ostras produzidas em cultivos multitróficos *versus* monocultivos

André Tiago Carvalho Silva Ferreira

Mestrado em Aquacultura e Pescas

Orientadoras: Professora Doutora Lídia Dionísio

Doutora Florbela Soares

maio – 2015

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores de trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incutida.

Copyright em nome da estudante da UAlg, André Tiago Carvalhal Silva Ferreira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, deste que seja dado crédito ao autor e editor.

André Ferreira

Localização

Data

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve -
Faculdade de Ciências e Tecnologia, para obtenção
do grau de Mestre em Aquacultura e Pescas,
especialidade Aquacultura; área temática: Ciências
da Terra, do Mar e do Ambiente.

Agradecimentos

Quero antes de mais demonstrar a minha mais sincera gratidão a todos quantos contribuíram para que este trabalho se realizasse. Todos os incentivos e apoios recebidos, foram essenciais para a concretização deste meu percurso, que doutra maneira teria sido muito mais difícil de ser concluído, apesar de a ela ter devotado todo o meu esforço e querer.

A natureza deste percurso exige sempre diversos contributos. Neste sentido, não posso deixar de agradecer a todos os que contribuíram para o seu enriquecimento, nomeadamente: as Doutoras Florbela Soares e Lídia Dionísio pelos inúmeros conhecimentos proporcionados e pela paciência e extrema delicadeza com que sempre me atenderam. Também um especial agradecimento a Luz Abreu e a Paula Moura, pela sua disponibilidade e ajuda em todo o trabalho de laboratório.

À Universidade da Algarve, pela oportunidade que me deu em aprofundar conhecimentos numa área que acho interessante, assim como me ter permitido adquirir e desenvolver competências de investigação científica na mesma.

À Estação Piloto de Piscicultura de Olhão - EPPO (IPMA), por me ter aceitado no seu seio para o desenvolvimento deste projecto, em particular às pessoas que comigo lidaram de perto e muito me ajudaram.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo, carinho e paciência.

Aos restantes familiares e amigos pela compreensão de um tempo que lhes roubei, o incentivo e apoio que sempre me proporcionaram.

André Tiago Carvalhal da Silva Ferreira Faro,

setembro de 2014

RESUMO

A aquacultura é um sector em crescimento, assim como o interesse pelos cultivos multitróficos, combinando espécies superiores, que requerem fornecimento de alimento, como são os peixes e espécies secundárias que se alimentam de matéria em suspensão, como é exemplo as ostras. O conhecimento nesta área é ainda escasso, daí a pertinente de um estudo comparativo entre ostras cultivadas em cultivos multitróficos e em monoculturas.

Analisou-se o desenvolvimento biométrico, histológico e microbiológico, utilizando uma amostra de 750 ostras, da espécie *Crassostrea gigas*, separadas por 3 locais (250 ostras/local). Dois deles produzem-nas em monocultura (locais B e C) e um em cultivo multitrófico (local A). Durante seis meses, de fevereiro a julho de 2014, colheram-se amostras mensais de 30 ostras/local e realizaram-se medições biométricas, análises microbiológicas e histológicas.

Os resultados permitiram verificar que as ostras produzidas em cultivo multitrófico apresentaram um aumento de peso e de comprimento total superiores às produzidas em monocultura, 45,32 g e 8,42 mm, no local A; 20,48 g e 7,66 mm, no local C e 6,28 g e 0 mm, no local B, respetivamente.

O estatuto sanitário, nos locais A e B, obtiveram-se valores correspondentes ao estatuto sanitário A, com médias de 46,67 e 38,33 Número Mais Provável (MPN) de *E. coli*/100 g de carne e líquido intervalvar, respetivamente. No local C registou-se 3287,50 MPN *E. coli*/100 g de carne e líquido intervalvar, correspondendo ao estatuto sanitário B.

Histologicamente, no local C, a gametogénese começou primeiro, observando-se gâmetas maduros em fevereiro, nos outros locais isso aconteceu em março (A) e abril (B).

Concluiu-se assim, que as ostras produzidas em cultivo multitrófico apresentaram um estatuto sanitário similar, mas com desenvolvimento biométrico superior, o que revela ser vantajoso este método de produção.

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*, aquacultura, cultivos multitróficos, estatuto sanitário, microbiología, biometria.

ABSTRACT

The aquaculture sector is growing rapidly. Simultaneously, the interest in multi-trophic cultures has also increased, which combine fed aquaculture species like finfish with secondary species that feed of suspended matter like oysters. The knowledge in this area is still low, so studies like this are necessary to improve this lack of knowledge.

A total of 750 oysters, from the species *Crassostrea gigas*, were distributed by three fish farms (250 oysters /farm). Two of them produce oysters in monoculture, local B and C and other in multi-trophic culture, local A. Samples of 30 oysters /farm were taken from February to July (6 months) and biometric measurements, microbiological and histological analyses were made.

The results showed that oysters produced in multi-trophic culture showed a superior increase in weight and total length, to those produced in monoculture. The increase in weight and total length in local A were 45,32g and 8,42 mm against 20,48g and 7,66 mm in C and 6,28g and 0 mm in B.

Regarding sanitary status, in local A and B showed values corresponding to sanitary status A, with averages between 46,67 and 38,33 Most Probable Number (MPN) of *E. coli* / 100g of flesh and intervalvar liquid, respectively. In local C the observed values were 3287,50 (MPN) *E. coli* / 100g of flesh and intervalvar liquid, corresponding to a sanitary status B.

In local C the gametogenesis began first, in February it was possible to observe mature gametes, while in the other 2 farms this only happened in March (local A) and in April (local B).

The obtained results seem to point that oysters produced in multi-trophic culture have a similar sanitary status, but with higher biometric development, which shows advantages for multi-trophic production.

Key words: *Crassostrea gigas*, aquaculture, multi-trophic cultures, sanitary status, microbiology, biometrics.

Índice

	Pág.
INTRODUÇÃO	13
1. AQUACULTURA INTEGRADA DE OSTRAS	
CRASSOSTREA GIGAS: REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1. Caracterização da ostra <i>C. gigas</i>	14
1.2. Estado da aquacultura em Portugal	18
1.3. Culturas multitróficas integradas	18
1.4. Fatores que influenciam a ostreicultura	20
1.5. Estatuto sanitário dos moluscos: indicadores microbianos	24
1.6. Estatuto sanitário das ostras <i>versus</i> tipos de cultivos	28
1.7. Parasitologia	30
2. CARATERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	31
2.1. Localização geográfica da Ria Formosa	31
2.1.1. Condições climatéricas	32
2.1.2. Condições hidrográficas	33
2.1.3. Poluição	34
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. IPMA: o contexto do estudo	37
4.2. População alvo e tipo de amostragem	38
4.3. Procedimentos de colheita de dados	40
4.4. Tratamento e análise dos dados	46
5. RESULTADOS	48
5.1. Biometria	48
5.2. Parasitologia	54

5.3.Mortalidade	55
5.4.Histologia	55
5.5.Microbiologia	58
5.6.Dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água	61
5.7.Correlação entre os dados microbiológicos e os dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água	64
6. DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	76
BIBLIOGRAFIA	78
ANEXOS	96
Anexo I – Preparação dos meios de cultura	97
Anexo II – Metodologia utilizada para a realização da coloração Histológica	100

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 - Anatomia da ostra <i>Crassostrea gigas</i> .	16
Figura 2 - Ciclo de vida da ostra <i>Crassostrea gigas</i> .	17
Figura 3 - Localização geográfica da Ria Formosa e as suas barras de água.	31
Figura 4 - Temperatura do ar na estação do Patacão/Faro ao longo do ano de 2013	32
Figura 5 - Total de precipitação na estação do Patacão/Faro do ano de 2013	33
Figura 6 - Imagem panorâmica da estação piloto de Olhão.	38
Figura 7 - Mapa com a localização, dos três locais envolvidos no ensaio. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	39
Figura 8 - Representação esquemática dos procedimentos de avaliação dos parâmetros biométricos.	40
Figura 9 - Representação esquemática dos procedimentos para análise microbiológica.	42
Figura 10 - Local onde foi realizado o corte histológico.	44
Figura 11 - Equipamento utilizado para cortes histológicos para avaliação do estado de maturação das gónadas: A) Aparelho automático de processamento de tecidos Leica Jung 1020, B) Sistema de inclusão de parafina Leica Eg 1140 e placa de refrigeração Leica GG 1140, C) Micrótomo Leica RM-2155, D Banho maria circular Electrothermal.	45
Figura 12 - Registo mensal do peso médio de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	48
Figura 13 - Registo mensal da largura média de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	49
Figura 14 - Registo mensal da espessura média de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria	

Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	50
Figura 15 - Registo mensal médio do comprimento total de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	52
Figura 16 - Registo mensal dos valores médios de índice de AFNOR de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	53
Figura 17 - <i>Polydora</i> spp. (A). Escavações realizadas por <i>Polydora</i> spp. na concha das ostras (B). Bolhas de lama no interior das ostras afetadas com <i>Polydora</i> spp, observada nas ostras do local A e junho (C) e julho (D).	54
Figura 18 - Mortalidade das ostras, observada nos três locais ao longo do estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, B- Sapal de Castro Marim.	55
Figura 19 – Os três estados de maturação das ostras <i>Crassostrea gigas</i> , fêmea (A) e machos (B), observados nos três locais do estudo. De cima para baixo estado de maturação 1, 2 e 3. OP – Oócito primário, O – Oócito, F – Folículo, EZ – Espermatozoides.	56
Figura 20 - Frequência de observação dos três estados de maturação observados nos três locais do estudo. (a) Machos e (b) Fêmeas. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	57
Figura 21-A - Registo mensal médio de <i>Escherichia coli</i> em <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais.	59
Figura 21-B - Registo mensal médio dos coliformes totais em <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	59
Figura 22 - Registo mensal médio de <i>Vibrio</i> spp. em <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do estudo nos três locais. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	60
Figura 23 – Valores de precipitação, obtidos através da média dos valores de precipitação registados 15 dias antes das amostras de cada mês na estação do Patacão/Faro.	61
Figura 24 - Valores da energia solar acumulada diariamente em K.J.m ⁻² proveniente da medição da radiação solar global em W.m ⁻² na estação do Patacão/Faro.	62

Figura 25 - Registo da temperatura média da água dos três locais ao longo do estudo. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	63
Figura 26 - Valores registados mensalmente da salinidade para o local B e C ao longo do estudo. B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.	63

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Taxonomia da ostra <i>C. gigas</i> .	15
Tabela 2 - Escala de classificação do estatuto sanitário das ostras.	25
Tabela 3 - Categorização segundo o Índice AFNOR.	41
Tabela 4 - Observação da presença (+) ou ausência (-) de <i>Polydora</i> spp. ou escavações feitas pela mesma nas conchas das ostras nos três locais do ensaio. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal Castro Marim.	55
Tabela 5 - Correlação entre as análises microbiológicas nos três locais do estudo e os dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água, (a) <i>E. coli</i> , (b) Coliformes totais e (c) <i>Vibrio</i> spp.. A-Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa,C- Monocultivo, Sapal Castro Marim.	64

INTRODUÇÃO

A vida do Homem tem sido condicionada pela procura de alimento. De forma a contrariar esta condição e a melhorar a sua qualidade de vida, o homem desenvolveu técnicas, criou instrumentos nas diferentes áreas do conhecimento e transformou produtos.

No entanto, o aumento demográfico, a deficiente gestão dos recursos naturais, a sua exploração e os desequilíbrios ambientais (poluição) têm contribuído para a redução da produtividade de uma das mais importantes fontes de proteína animal, a pesca (Schuller, 1998).

Desde o início da humanidade que os produtos provenientes do mar fazem parte da dieta humana, sendo inclusive a principal fonte de proteína de origem animal em alguns países. Atualmente é cada vez maior o número de pessoas que prefere a proteína proveniente do peixe como alternativa saudável à da carne (Huss, 1993).

O constante aumento do consumo de produtos marinhos, os constrangimentos dos recursos naturais e ambientais, contribuíram para que o setor das pescas atingisse o seu limite sustentável, sendo esperado que a aquacultura tenha um papel importante na resposta a esta procura (Byod, 2003). Tendo todos estes fatores em conta, a aquacultura é um dos setores de produção alimentar que mais tem crescido, sendo necessário uma regulamentação e gestão eficazes para que este continue a crescer de uma forma sustentável e possa responder às exigências, cada vez maiores, da população humana (FAO, 2001).

A aquacultura é entendida como o cultivo e produção de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, através de algum tipo de intervenção no processo de criação, aumentando a sua produção, como por exemplo, proteção de predadores, alimentação, entre outros (FAO, 2009).

Perante um estado de sobre exploração dos recursos, a aquacultura, surge como uma alternativa para obtenção de proteína animal de qualidade e a baixo custo, tanto para o consumo humano como para a restauração dos mananciais (repovoamento). Esta prática vem sendo implementada, não para substituir a pesca tradicional, mas como forma de a complementar em duas grandes vertentes: diminuir a escassez de alimento a nível mundial e diminuir a pressão sobre os recursos naturais (Mestre, 2008).

1. AQUACULTURA INTEGRADA DE OSTRAS *CRASSOSTREA GIGAS*: REVISÃO DA LITERATURA

Rever a literatura significa caracterizar o objeto de estudo e fazer pesquisa e um balanço sobre o que já foi estudado no domínio da investigação em curso (Fortin, 1999). Como defende esta autora, por mais pertinentes que sejam as questões de investigação colocadas, estas não poderão ser abordadas sem termos em consideração os conhecimentos já desenvolvidos.

A pesquisa documental é assim, uma etapa fundamental à exploração de um domínio de investigação. O recurso a diversas fontes documentais não só permite verificar o estado da arte e dos conhecimentos no domínio em estudo, como permite também alargar os conhecimentos do autor e a estabelecer relações entre os resultados obtidos e os obtidos por outros investigadores.

Assim, neste capítulo, serão abordados os resultados de estudos sobre as ostras *Crassostrea gigas* em pisciculturas integradas e em rias e que tenham estudado o estatuto bacteriológico, parasitológico desta espécie de ostras, o seu desenvolvimento biométrico, os parâmetros macroscópicos e a qualidade das águas.

1.1. Caracterização da ostra *C. gigas*

Em Portugal, a produção de ostra *C. gigas* assume particular importância em estuários como os dos rios Tejo, Sado e Ria Formosa. Até à década de 70, do século passado, predominava em Portugal a ostra *Crassostrea angulata* que, face ao seu quase desaparecimento, levou à substituição desta espécie por *C. gigas*, originária do Japão (Dinis *et al.*, 1998)

As ostras *C. gigas* são bivalves euritérmicos e eurialinos, o que significa que suportam intervalos amplos de variações de temperatura e salinidades respetivamente. Para esta espécie as condições ótimas de salinidade encontram-se entre os 20 e 25 psu, sobrevivendo a salinidades inferiores a 10 psu e superiores a 35 psu, onde se torna pouco provável a sua reprodução. Relativamente à temperatura, esta espécie sobrevive a temperaturas entre os 1.8°C e os 35°C (FAO, 2005).

Esta é uma espécie com uma notável resistência a alterações do meio ambiente. Tem um crescimento rápido e elevada fecundidade. No entanto, o seu crescimento, sobrevivência e qualidade estão diretamente relacionados com as condições ambientais a que a cultura está sujeita (Sarà & Mazzola, 1997).

A ostra *C. gigas* é uma espécie de molusco bivalve da família Ostreidae, cuja taxonomia se apresenta no Tabela 1. Desenvolve-se em águas marinhas ou estuarinas. Oriunda do continente asiático, do Oceano Pacífico, foi sendo introduzida em várias partes do mundo. Difere da ostra comum (*Ostrea edulis*) pela sua curvatura, forma estreita e especialmente pelo seu sabor mais forte (Coutinho, 2012).

Tabela 1 – Taxonomia da ostra *Crassostrea gigas*.

Reino	Animalia
Filo	Mollusca
Classe	Bivalvia
Ordem	Ostreida
Família	Ostreidae
Género	<i>Crassostrea</i>
Espécie	<i>Crassostrea gigas</i>

Fonte: Thunberg (1793).

O corpo mole, da ostra *C. gigas*, é protegido externamente por uma concha, que apresenta duas valvas: a valva superior ou direita, que é plana e a valva inferior ou esquerda, que é levemente côncava ou abaulada. A junção entre as duas valvas é feita através do músculo adutor e também por um ligamento situado na região posterior (Coutinho, 2012).

A concha é constituída principalmente por carbonato de cálcio, que é retirado diretamente da água do mar com auxílio de células especializadas localizadas no manto. O corpo, que é a parte mole do organismo, para além do manto é constituído pelas brânquias, palpos labiais, coração (pericárdio), massa visceral (órgãos do aparelho digestivo, reprodutor e excretor) e músculo adutor (Fig. 1). O manto é a camada de tecido que recobre as partes moles de ambos os lados do corpo, com exceção do músculo adutor. Além de conter as células responsáveis pela formação da concha, como já referido, o manto tem também funções sensoriais. As brânquias têm por função realizar as trocas gasosas (respiração) e a captura do alimento.

Devido à grande superfície branquial que está constantemente húmida, as ostras podem resistir a longos períodos fora da água (Coutinho, 2012).

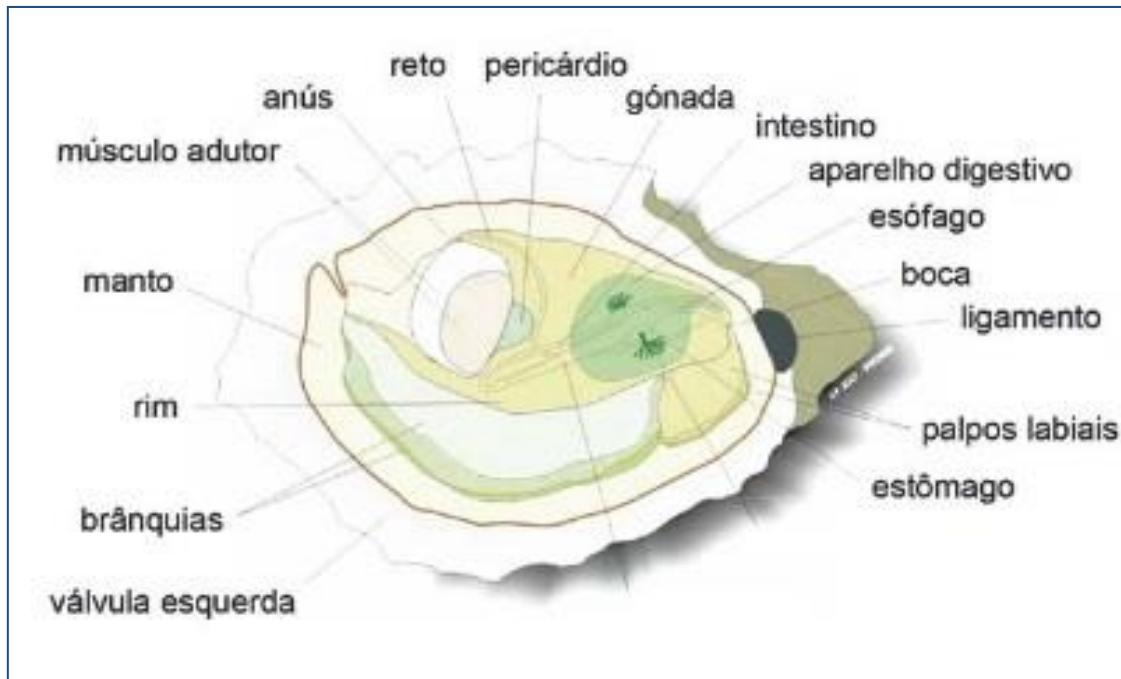


Figura 1 – Anatomia da ostra *Crassostrea gigas* (Adaptado de Miossec *et al.*, 2009).

A ostra *C. gigas* é um bivalve filtrador de rápido crescimento, bentónico e sésil, com válvulas assimétricas, que vivem fixados firmemente a um substrato duro pela sua válvula esquerda entre as zonas intertidais e subtidais (Higuera-Ruiz *et al.*, 2009). Alimentam-se principalmente de fitoplâncton e de matéria orgânica suspensa na água (Martinez-Cordova *et al.*, 2006) ou outras partículas como, microalgas, materiais orgânicos e inorgânicos. Os valores de filtração de cada ostra variam entre os 5 a 25 litros/hora (Christo, 2006). Tendo em conta estas características, esta espécie de ostra é frequentemente utilizada em culturas integradas, tirando partido da produção natural de matéria orgânica produzida pelas outras espécies, nomeadamente espécies piscícolas, no tanque e convertendo esta em biomassa, o que representa um aumento de produção (Martinez-Cordova *et al.*, 2006).

São organismos dióicos, ou seja, apresentam o sexo separado, mas externamente, não é possível diferenciar o macho da fêmea, pois ambos apresentam a gónada (órgão sexual masculino ou feminino) com a mesma coloração. A diferenciação sexual só é possível através de raspagem da gónada e análise do material em microscópio, pois os ovócitos têm um formato arredondado e os espermatozóides, uma massa compacta. O desenvolvimento das gónadas (maturação) é influenciado por fatores externos como luminosidade, salinidade e, principalmente, pela temperatura e disponibilidade de alimento (Abrunhosa, 2011). A

gametogênese começa com 10 ° C e a salinidades entre 15 e 32 psu, sendo que raramente é completada com salinidades superiores. A desova ocorre geralmente a temperaturas superiores a 20 ° C, sendo a temperatura ótima entre os 20 e 25°C (Mann *et al.*,1991; Kobayashi *et al.*, 1997) e raramente a 15-18 ° C (FAO, 2005).

O ciclo de vida as ostras do género *Crassostrea*, inicia-se quando os gâmetas (ovócitos e espermatozóides) são libertados na água, onde a fecundação acontece. As células vão-se depois dividindo até chegarem à fase embrionária e depois atingir, após 12 horas, a forma larvar e às 24 horas da fecundação a larva adquire já um formato que lhe permite alimentar-se e deslocar-se. Por volta dos 22 dias, as larvas deixam de ser planctónicas, sofrem modificações morfológicas que lhes permitem fixarem-se num substrato ideal. Uma vez fixadas, sofrem uma metamorfose adquirindo a forma definitiva de uma ostra jovem (Fig. 2). O crescimento é mais rápido entre os 15-25 ° C e em salinidades entre 25 e 32 psu, dependendo também da taxa de reposição natural do fitoplâncton (FAO, 2005).

Neste substrato crescem até atingirem o tamanho ideal para a comercialização, entre 70-100g de peso vivo (com casca), que é alcançado entre os 18 a 30 meses, dependendo das condições ambientais onde se encontram (Coutinho, 2012, FAO, 2005).

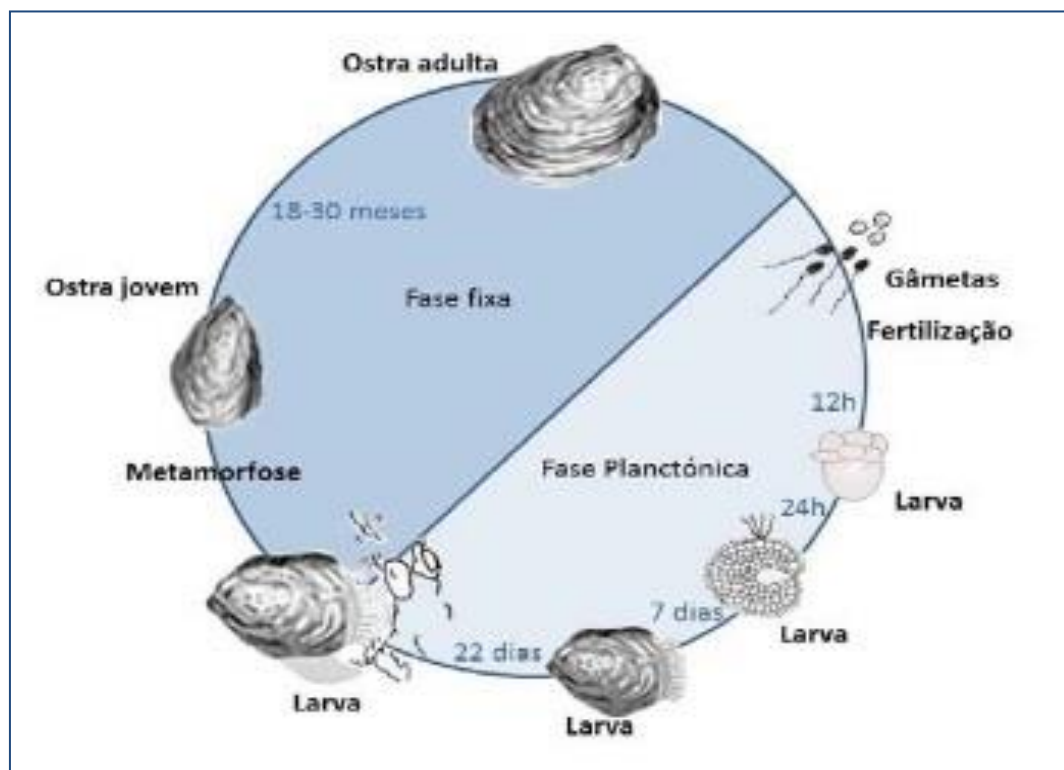


Figura 2 – Ciclo de vida da ostra *Crassostrea gigas* (Adaptado de Tirapé *et al.*, 2007).

Assim, conhecendo a anatomofisiologia, forma de fecundação e ciclo de vida da ostra *C. gigas*, suas potencialidades e fragilidades na relação com o meio ambiente, há que analisar o impacto desse ambiente no seu desenvolvimento, quer em quantidade, quer em qualidade.

1.2. Estado da aquacultura em Portugal

Em Portugal a produção da aquacultura tem-se mantido relativamente constante ao longo do tempo. No período 2000 - 2009, produziu-se, em aquacultura, entre 6000 e 8000 t de produtos marinhos (FAO, 2009). Grande parte desta produção provém de pequenas unidades de produção, com destaque para o cultivo de bivalves, moluscos e peixes marinhos (Carrasquinho, 2009).

No passado, a ostra portuguesa (*C. angulata*), teve um maior significado económico na produção aquícola da Ria Formosa (Cachola, 1995). Estas culturas eram realizadas com juvenis obtidos na natureza que eram depois colocados diretamente nos sedimentos dos viveiros. No entanto dada a sua quase extinção, na década de 70, provocada pela doença das brânquias, a produção desta espécie diminuiu drasticamente (Dinis *et al.*, 1998). Atualmente, os aquicultores da Ria Formosa produzem ostras *C. gigas*, provenientes de diferentes centros de reprodução franceses, em sacos de rede sobre-elevados, em mesas ostreícolas (Ferreira, 2003). De acordo com a FAO (2009), em Portugal, entre 2000 e 2009, a produção desta espécie foi em média de 426.9 t, sendo juntamente com *C. angulata* e *O. edulis* uma das espécies produzidas com maior taxa de exportação, na ordem das 250 t/ano (Carrasquinho, 2009).

1.3. Culturas multitróficas integradas

As culturas integradas pertencem a uma área que tem vindo a ganhar grande relevo no âmbito da aquacultura pela necessidade, cada vez maior, da humanidade tornar as suas atividades cada vez mais sustentáveis e de reduzir o seu impacto ambiental. Ao cultivar-se espécies de forma integrada estamos a tirar partido de relações que os animais têm naturalmente, tornando assim as nossas culturas mais sustentáveis e mais rentáveis, pois estamos a produzir mais produto sem mais investimentos (Soto, 2009).

O desenvolvimento de práticas de aquacultura multitrófica integrada (IMTA), do ponto de vista de uma abordagem equilibrada do ecossistema, está destinado a ter um papel maior na

expansão sustentável da aquacultura a nível mundial (Soto, 2009). A prática de culturas integradas tem vindo a aumentar significativamente a sustentabilidade na aquacultura, devido ao seu potencial económico, social e de benefícios para o ambiente (Troell *et al.*, 2009). Estes potenciais verificam-se porque as espécies de menor nível trófico promovem a reciclagem dos resíduos agrícolas e nutrientes desperdiçados pelas espécies de maior nível trófico (Troell *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2012), diminuindo assim, as emissões de descargas prejudiciais ao ambiente. Permite ainda a diversificação de produtos e um aumento do retorno económico, necessitando no entanto, de serem corretamente geridas a nível das densidades ideais para cada espécie cultivada (Ren *et al.*, 2012).

A aquacultura multitrófica integrada é uma área em crescimento que, devido à falta de modelos preditivos, tem dependido de ensaios de campo, cujos resultados permanecem semi-quantitativos (Neori *et al.*, 2004; Chopin *et al.*, 2008). No entanto, têm vindo a aumentar os estudos nesta área. Ren *et al.* (2012) realizaram um trabalho onde desenvolveram um modelo de IMTA genérico, incorporando orçamentos de energia dinâmica de uma série de espécies de diferentes níveis tróficos cultivadas de uma forma integrada, com o objetivo de otimizar a produtividade das múltiplas espécies e projetar futuros viveiros de aquacultura multitrófica integrada.

As simulações dos diversos cenários de IMTA revelaram que a conversão de monoculturas em policulturas reduziria consideravelmente as descargas e aumentaria a produtividade. Embora estas práticas dependam de valores aceitáveis de descargas, produtividade e viabilidade das culturas, poderão ser usadas como ferramentas para perceber a interação entre espécies, bem como, prever a produtividade dos viveiros de culturas integradas, podendo ajudar a conceber futuras aquaculturas deste tipo de forma a maximizar a utilização dos recursos e a minimizar os impactos ambientais.

No entanto, a viabilidade de uma abordagem para a gestão na indústria de aquaculturas IMTA, depende da flexibilidade de um modelo para várias espécies e sistemas aquícolas. As aplicações destas técnicas de cultivo serão dependentes da sua aplicabilidade e viabilidade das culturas, valor económico e seu potencial, sendo estes fatores primordiais para a seleção da espécie principal e secundária (Chopin *et al.*, 2008). Estas técnicas poderão ainda abranger culturas *off-shore* uma vez que alguns dos desafios que a aquacultura próxima de terra enfrenta são semelhantes às das culturas *off-shore*, sendo que a maior força do oceano aberto adiciona ainda mais uma série de desafios técnicos e económicos (Troell *et al.*, 2009).

1.4. Fatores que influenciam a ostreicultura

A ostra depende, para o seu crescimento, de fatores como: temperatura da água, alimento disponível, salinidade e quantidade de oxigénio dissolvido na água, sendo esta caracterizada por ser resistente a grandes flutuações destes fatores ambientais (Orban *et al.*, 2004).

À semelhança do que acontece com os moluscos em geral, as ostras são filtradoras e regulam a quantidade de alimento ingerido adaptando o seu ritmo de filtração em função da concentração de alimento disponível (Foster-Smith, 1975; Bayne, 1991). Assim, esta espécie de nível trófico inferior torna-se uma importante candidata para as cultivos multitróficos.

Sendo as ostras animais filtradores, a qualidade da água torna-se fundamental para o seu desenvolvimento, como evidenciou um estudo realizado por Bayen *et al.*, (2007), que compararam as taxas de crescimento da ostra *C. gigas*, em dois locais de Singapura: um, com água não contaminada; outro, com água contaminada. As taxas de crescimento diferiram significativamente nos dois locais, verificando-se que na zona não contaminada os resultados são normais e comparáveis com outros locais com clima semelhante (caso de estudos realizados no Brasil), enquanto o crescimento na zona contaminada foi bastante afetado e incomparável com outros estudos. Os parâmetros de qualidade da água analisados incluíram: a temperatura, a salinidade, o oxigénio, o carbono orgânico e a clorofila a e foram semelhantes em ambos os locais. No entanto, na zona contaminada, foram observadas anomalias na concha das ostras juvenis e adultas. De salientar o carácter reversivo dos efeitos negativos da poluição sobre as ostras, quando transferidas para águas não poluídas, revelando a sua capacidade de recuperar a taxa de crescimento, o peso e de diminuir a bioacumulação de poluentes orgânicos persistentes (POPs).

Outro dos fatores determinantes para o crescimento destas espécies de ostras, como verificaram Ruiz *et al.* (1990) e Ferreira (2003), é a quantidade e qualidade do alimento disponível. Ferreira (2003), comparou taxas de crescimento e qualidade da ostra em aquaculturas da Ria Formosa, sujeitos a diferentes tipos de cultura e parâmetros ambientais e observou ainda que a partir de abril e até ao final da experiência (setembro), houve um aumento considerável no comprimento das ostras. Tal resultado poderá estar relacionado com o aumento da temperatura da água que, como é sabido, tem uma influência direta na produção de fitoplâncton (Toro *et al.*, 1999).

Resultado semelhante foi obtido por Cardoso (2013), que comparou ostras de dois estuários no sul da Europa (Ria Formosa, em Portugal e Ria do Ribadeo, em Espanha). Na Ria Formosa as concentrações de clorofila são altas durante todo o verão (Newton & Mudge, 2003; Brito *et al.*, 2009), sendo que as ostras desta área evidenciaram tirar vantagem destas condições de alimentação e temperatura para o seu crescimento, pois o rácio de massa de concha aumentou. Este crescimento estará relacionado com o afloramento (*upwelling*) observado na costa portuguesa, principalmente na primavera e com menos intensidade, no outono, o que leva a que haja uma maior disponibilidade de alimento (Schuller, 1998). A grande abundância de fitoplâncton e matéria orgânica suspensa na água foi igualmente reportado por Falcão *et al.* (2000), como sendo a razão para as altas taxas de crescimento observadas nestas culturas.

As zonas costeiras portuguesas permitem um crescimento das ostras praticamente contínuo ao longo do ano, embora este seja muito lento nos meses de janeiro e fevereiro e mais rápido durante a primavera e o outono (Schuller, 1998). Contudo, outros estudos (Zwarts, 1991; Honkoop & Beukema, 1997) revelaram também que, em condições similares, mas com temperaturas mais elevadas, as condições de corpo das ostras são menores do que seria de esperar, devido aos custos energéticos mais exigentes nestas zonas. As maiores condições de corpo em água mais fria são superiores quando comparadas com as de áreas mais quentes (Cardoso *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011).

No entanto, relativamente à ostra *C. gigas*, Cardoso (2013) verificou que tal não aconteceu, apresentando as ostras das populações do sul da Europa, melhores condições durante o inverno em comparação com as populações do norte. A condição de alimentação no sul será melhor para o seu crescimento, característica esta apoiada pelo facto da quantidade de massa corporal em relação à massa de concha ser maior nestas áreas. Isto sugere que a temperatura será um fator influenciador das condições de corpo da ostra *C. gigas*, mas em habitats onde as restantes condições sejam semelhantes.

Este estudo alerta ainda para o facto de que, caso se observem condições ambientais favoráveis, é provável que as populações se expandam sendo que, na Ria Formosa, várias ostras selvagens foram observadas à volta das zonas de cultura indicando que as condições ambientais para o crescimento e reprodução desta espécie são favoráveis. Esta ocorrência, contudo, deverá ser estudada a fim de se prever os possíveis efeitos negativos desta expansão da espécie nos ecossistemas da ria, sendo importante fazer uma monitorização contínua do desempenho fisiológico da espécie nestas áreas.

No que se refere ao desenvolvimento das gónadas, Cardoso *et al.* (2013), observaram o desenvolvimento das mesmas em indivíduos com dimensões superiores a 23.5 mm de comprimento de concha, na Ria Formosa e superiores a 27.5 mm de comprimento de concha, na Ria do Ribadeo. O esforço para o desenvolvimento das gónadas pode ser um fator causador de mortalidade nas ostras, pois como referem Flahauw *et al.* (2012), estudos comparando linhas selecionadas com diferentes suscetibilidades para mortalidades que ocorrem no verão, concluíram que quanto maior for o esforço reprodutivo, menor é a sobrevivência.

Este facto foi comprovado por Cotter *et al.* (2010), num estudo sobre a mortalidade da ostra do Pacífico (*C. gigas*) no verão, no mar da Irlanda, tendo em conta fatores como o crescimento, a bioquímica e a gametogénese. Estes autores observaram mortalidades significativas nos locais irlandeses, mas não nos locais do País de Gales. As ostras nos locais irlandeses exibiam um aumento significativo do crescimento e desenvolvimento das gónadas em comparação com ostras nos locais gauleses. Estes autores referem que, maiores taxas de crescimento, de desenvolvimento das gónadas e desova, podem contribuir para um aumento do stresse fisiológico em ostras jovens, tornando-as mais vulneráveis à mortalidade que ocorre no verão.

Por sua vez, no estudo de Ferreira (2003), em ambas as aquaculturas, foram observadas oscilações ao longo do período de amostragem no que respeita aos diferentes parâmetros e índices analisados. Tal facto, poderá estar relacionado, com a própria sazonalidade verificada nas variáveis ambientais analisadas, já que normalmente em moluscicultura os fatores mais importantes na determinação do crescimento são de origem ambiental (Lucas, 1982; Abalde *et al.*, 1990; Abad *et al.*, 1993; Dittman *et al.*, 1998). Contudo, não se pode também desprezar outros fatores como o tipo de cultura. As ostras podem ser cultivadas em camas elevadas, prateleiras e nos fundos. Como refere Ferreira (2003), quando se comparam os métodos de cultura (enterrado vs mesas) as mesas parecem ser o melhor método de cultivo para *C. gigas*.

Vários estudos (Soletchnik *et al.*, 1999; 2005; Samain *et al.*, 2005; Royer *et al.*, 2007) têm demonstrado que a proximidade dos sedimentos do fundo pode ser um fator potencialmente causador de elevada mortalidade. As ostras que estão enterradas diretamente na lama apresentam taxas de mortalidade mais elevadas do que ostras criadas elevadas dos fundos. Esta alta mortalidade pode estar relacionada com o tipo de substrato, pelo potencial de libertação de compostos tóxicos, como amónia e hidrogénio sulfureto (Royer, 2007), que

representa outro risco ambiental para ostras. Este estudo revelou, contrariamente ao estudo de Grabowski *et al.* (2004), feito com *Crassostrea virginica*, que a proximidade do sedimento no fundo leva a maiores mortalidades em comparação com as culturas fora do mesmo (Bataller *et al.*, 1999; Soletchnik *et al.*, 1999; 2005).

Numa revisão sistemática da literatura sobre a aquacultura de ostras, que abrangeu estudos realizados entre 1978-2009 Forrest *et al.* (2009) concluíram que a cultura de ostras em estuários com fins industriais é usada principalmente a ostra do Pacífico (*C. gigas*), cujo método mais comum é a cultura elevada em camas ou prateleiras. Os estudos ecológicos demonstraram que o uso de culturas elevadas tem menores impactos ecológicos e mais localizados, quando comparados com outras formas de aquacultura.

As questões ecológicas mais amplas incluem os efeitos de pragas (pragas incrustantes, microalgas tóxicas/nocivas, doenças), a criação de novos habitats (por exemplo, quedas de estruturas da exploração e acumulação de conchas), a alteração dos ciclos de nutrientes, o esgotamento das partículas suspensas por parte das ostras e os efeitos sobre os animais de nível trófico superior como peixes, aves marinhas e mamíferos marinhos. Estas questões são menos compreendidas para os sistemas de cultura elevada, mas os efeitos ecológicos podem ser inferidos a partir dos poucos estudos que têm sido realizados, com outras formas de aquacultura de bivalves (mexilhões, por exemplo).

Embora os efeitos da cultura elevada de ostras sejam conhecidos e o seu significado ecológico possa ser avaliado, existem ainda lacunas de conhecimento e áreas de incerteza. Contudo, muitos autores (McKindsey *et al.*, 2006; Forrest *et al.*, 2007; Dumbauld *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2009) concluíram que o foco da pesquisa e o conhecimento sobre as culturas elevadas de ostras é, em grande parte, semelhante ao de outras espécies de bivalves e a outros métodos de cultivo.

Outro espaço do conhecimento onde se evidenciam lacunas é o da associação entre as culturas de ostras *versus* disseminação secundária de espécies de pragas, que podem ter significado não local e consequências irreversíveis. Há claramente necessidade de corrigir e redirecionar os esforços de estudos futuros, que devem incluir, por exemplo, o perfil de risco de um sítio específico de potenciais pragas (avaliação da probabilidade de que espécies de pragas de alto risco se possam estabelecer) e analisar a viabilidade da gestão das mesmas (Taylor *et al.*, 2005; Forrest *et al.*, 2006). Esta revisão revelou ainda que a introdução e propagação de

espécies causadores de doenças são importantes, mas no entanto, são frequentemente negligenciadas para as culturas elevadas de ostras.

1.5. Estatuto sanitário dos moluscos: indicadores microbianos

Do estatuto sanitário, associado à aquacultura de bivalves, vamos dar especial atenção à contaminação bacteriológica, especificamente as bactérias *Escherichia coli*, os coliformes totais e os coliformes fecais.

A presença de *E. coli* e outros coliformes fecais em alimentos está diretamente relacionada com a contaminação fecal (Costa, 2013).

Os coliformes são habitualmente mais utilizados para determinar a qualidade sanitária de águas para bebida e atividades recreativas (Dionísio, 1996) e para a avaliação do estatuto sanitário em moluscos.

Os coliformes totais definem-se como bactérias com forma de bacilo, Gram-negativas, não esporogénicas, aeróbias e anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás dentro de 24-48 h a 35° C (APHA, 1992).

Os coliformes fecais, também denominados de *termotolerantes*, por suportarem uma temperatura superior a 40°C, que fermentam a lactose com produção de ácido e gás em 24h a 44.5 – 45.5° C, são específicos das fezes de animais homeotérmicos (Bonde, 1962; Geldreich, 1966) e considerados como indicadores de contaminação.

A espécie *E. coli*, que dentro das bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes fecais, é a única que geralmente não se reproduz, nem cresce no meio ambiente, decorre especificamente da contaminação fecal e por consequência, é o melhor indicador de contaminações fecais, sendo aliás a espécie utilizada para avaliar o estatuto sanitário tanto de águas como de moluscos (Souza, 2010).

Foi publicado no Despacho nº 15264/2013, que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. Segundo este documento as zonas de produção/apanha de bivalves podem ser classificadas de A, B, C e classe proibida, incluindo também as medidas a tomar para cada estatuto, como pode ser observado no Tabela 2.

Tabela 2 - Escala de classificação do estatuto sanitário das ostras

Classificação	Níveis permitidos	Medidas a tomar
A	≤ 230 <i>E. coli</i> /100g de carne e líquido intervalvar	Consumo direto
B	$230 < E. coli \leq 4600$ /100g de carne e líquido intervalvar em 90% das amostras	Os bivalves podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial
C	$4600 < E. coli \leq 46000$ /100g de carne e líquido intervalvar	Os bivalves podem ser apanhados e destinados a transposição prolongada ou transformação em unidade industrial
Proibida a apanha	Mais de 46000	Interdita a captura de moluscos bivalves

E. coli é uma bactéria que vive na camada mucosa do cólon de animais de sangue quente. Estas bactérias são a microbiota facultativa não-patogénica predominante no intestino humano. No entanto, algumas estirpes de *E. coli*, desenvolveram a capacidade de causar doenças gastrointestinais, urinárias ou no sistema nervoso central, mesmo em hospedeiros humanos mais robustos (Nataro, 1998). Estas contaminações podem ser originadas de duas formas: pelo contato direto com o produto com as mãos contaminadas ou pela existência destes organismos no meio marinho.

Para prevenir surtos de doenças associados ao consumo de moluscos, tem de haver um controlo minucioso das suas características microbiológicas (Costa, 2013). A monitorização das concentrações de *E. coli* e outros coliformes fecais nestes invertebrados, representa a forma mais direta de avaliar o estado sanitário de uma área de colheita (Sonier *et al.*, 2008), sendo esta uma das atividades realizadas semanalmente pelo IPMA de forma a classificar a qualidade das zonas de colheitas de bivalves.

Esta espécie de bactéria pode também ser usada para classificar o estatuto sanitário de novas áreas de interesse para a instalação de aquaculturas e, caso não existam moluscos nestas zonas, a avaliação poderá ser feita, utilizando os sedimentos, verificando assim a presença ou ausência de *E. coli*, de forma a fornecer dados dos níveis de contaminação da nova área de interesse (Sonier *et al.*, 2008).

Numa revisão sobre a existência de *E. coli* em moluscos, a sua importância no estatuto sanitário e o impacto desta bactéria na saúde pública, Costa (2013), concluiu que a presença de *E. coli* nos alimentos provenientes do mar representa um risco para os consumidores. Este está relacionado com as estirpes patogénicas, que provocam dores de estômago e abdominais, vômitos, anorexia e especialmente, diarreia (algumas vezes com a presença de sangue).

De forma a assegurar que os alimentos provenientes do mar não se tornem num veículo de transmissão de *E.coli*, algumas medidas-chaves têm de ser consideradas, nomeadamente:

- Manutenção da qualidade microbiológica da água no sítio da captura;
- Cuidados pós-captura;
- Condições de higiene adequada no processo de manuseamento dos animais;
- No caso de comida processada, devem ser tomadas medidas para assegurar a não contaminação durante o processo.

A presença de *E.coli* não patogénica, por sua vez, também deve ser levada em consideração para a saúde humana, tanto pela possibilidade da presença de estirpes patogénicas, como também por estas bactérias serem indicadoras de contaminação fecal, indicando a possível presença de outros agentes patogénicos no ambiente analisado.

Num estudo realizado por Almeida & Soares (2012) as autoras fizeram uma monitorização da microbiologia de bivalves na Ria Formosa durante um período de 20 anos (1990-2009). Verificaram que nos anos 90 o nível de contaminação de *E. coli* era maior devido às descargas de águas residuais não tratadas e escorrências, pelas águas das chuvas, de produtos provenientes da agricultura. A partir do ano 2000, esta contaminação diminuiu devido à instalação ou remodelação de centrais de tratamento de águas residuais, que serviam cerca de 83 % da população. Observaram também que a maior contaminação de bivalves encontrava-se nas maiores zonas urbanas, no caso deste estudo, Faro, devido ao facto de ainda existirem contaminações pontuais e zonas de difusão de contaminantes.

A contaminação das águas por *E. coli* pode ser influenciada por vários parâmetros abióticos. Existem diversos estudos que demonstram que as taxas de sobrevivência e desenvolvimento de bactérias nas massas de água podem ser afetadas por fatores abióticos como a exposição à luz solar (Fujioka *et al.*, 1981), temperatura (Rowse & Fleet, 1984), salinidade (Anderson *et al.*, 1979), pH (Solic & Krstulovic, 1992), precipitação (Ackerman & Weisberg, 2003), presença de nutrientes orgânicos e inorgânicos (Rheinheimer, 1992; Dionísio *et al.*, 2000) e sedimentação (Rozen & Belkin, 2001). Estes fatores atuam em conjunto como verificaram Almeida & Soares (2012), num estudo desenvolvido na Ria Formosa. O aumento da contaminação microbiológica geralmente era acompanhado pelo aumento da precipitação e uma diminuição da temperatura e salinidade da água. Observaram haver variação sazonal, os maiores níveis de contaminação registados foram durante o outono e inverno, devido às

ocorrências das águas das chuvas. Os menores níveis de contaminação microbiológica registados na primavera e verão, onde as elevadas temperatura e salinidades demonstraram um efeito de bactericida. Para o bom desenvolvimento as bactérias da espécie *E. coli* necessitam de salinidades baixas, temperaturas não muito elevadas, pH ligeiramente ácido (≈ 5), baixo período de exposição à luz solar.

Neste estudo, embora não diretamente relacionado com a atribuição do estatuto sanitário, a presença de *Vibrio* spp. foi também registada. Estes organismos podem ser potencialmente patogénicos para os humanos. *Vibrio* spp. são bactérias Gram-negativas, facultativamente anaeróbias, com forma encurvada e um único flagelo polar. Entre os membros do género, 12 espécies já foram relatadas como patogénicas para os seres humanos, onde oito destas podem ser associadas a gastroenterites de origem alimentar (Oliver & Japer, 1997). A maioria das infeções alimentares, são causadas pelas espécies *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* e em menor quantidade por *Vibrio vulnificus* (FAO/WHO, 2004).

Existem vários fatores que podem mudar o ambiente estuarino e influenciar a comunidade microbiana, incluindo *Vibrio* spp., como a temperatura, a renovação da água pelas marés, o clima, a precipitação e a renovação de nutrientes, afetando a qualidade da água estuarina e a saúde pública (Hsieh *et al.*, 2008).

Vários autores verificaram existir uma correlação entre a ocorrência de *Vibrio* spp. no ambiente, a temperatura e a salinidade (Anacleto *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2008).

Estas bactérias são originárias de habitats marinhos, salobres e estuarinos (Hsieh *et al.*, 2008; Gutiérrez & Martos, 1997), aparecendo em grandes concentrações com temperaturas entre 20-30 °C. A baixas temperaturas, *Vibrio* spp. permanece nos sedimentos do fundo do mar em concentração insuficiente para causar infeções. A sua concentração aumenta nos meses quentes, devido às condições ecológicas favoráveis, aumentando a sua acumulação pelos moluscos filtradores (Gutiérrez & Martos, 1997). Relativamente à salinidade, esta é amplamente referida como tendo influências significativas na concentração de *Vibrio* spp. No entanto, têm sido observados vários tipos de correlações, como positiva, negativa e inexistente. Estas correlações são provavelmente afetadas pela gama de salinidades observadas (Kasper & Tamplin, 1993; Motes *et al.*, 1998). Outras evidências indicam que a tolerância à salinidade pode depender da temperatura e concentração de nutrientes elevada (Kasper e Tamplin, 1993; Tantillo *et al.*, 2004).

Podendo estas bactérias ser prejudiciais para os seres humanos, o regulamento (CE) n.º 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, não inclui critérios microbiológicos para bactérias autótonas. No entanto, a *Food and Drug Administration* (FDA) considera tolerância zero para *V. vulnificus* em produtos da pesca (Coutinho, 2012)

“O Comité Científico das Medidas Veterinárias Relacionadas com a Saúde Pública (CCMVSP) adotou um parecer sobre *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* em 19 e 20 de Setembro de 2001. O comité concluiu que os dados científicos atualmente disponíveis não justificam o estabelecimento de critérios específicos para a presença de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* no peixe e marisco. Recomendou, no entanto, o estabelecimento de códigos de práticas, a fim de assegurar a aplicação de boas práticas de higiene” (CE, 2005).

1.6. Estatuto sanitário das ostras *versus* tipos de cultivos

Os diferentes tipos de culturas utilizados, nomeadamente nas integradas e em viveiros, podem influenciar o estatuto sanitário das ostras. No estudo realizado por Sonier *et al.* (2008), cuja finalidade era perceber em que medida a concentração de *E. coli* nos sedimentos pode ser um indicador de estatuto sanitário das ostras (*C. virginica*), foram observados níveis de contaminação significativamente menores na água do que nos sedimentos. A concentração desta bactéria atingiu valores até 10 vezes mais nos sedimentos do que na água, embora a diferença não tenha sido significativa entre a contaminação das ostras suspensas e as do fundo. Tal facto deve-se provavelmente à baixa profundidade da água no local da experiência, resultando num padrão uniforme de salinidade, perfis de temperatura, bem como de concentrações de *E. coli* ao longo da coluna de água. O padrão apresentado pode não ser semelhante em locais onde as profundidades sejam maiores e exista um gradiente de salinidade, temperatura e concentrações de *E. coli* na coluna de água.

As conclusões deste estudo, podem sustentar a melhor qualidade microbiológica das ostras produzidas em sistemas integrados em pisciculturas, uma vez que a água fica parada no reservatório de entrada de água e o número de *E. coli* poderá concentrar-se no fundo do mesmo, não transitando ou transitando em menor quantidade para os tanques de cultura onde são produzidas as ostras. Os resultados revelam ainda, uma correlação positiva entre os níveis de concentração de *E. coli* em água e em ostras que reflete claramente uma tendência para

estas variáveis flutuarem paralelamente, bem como, uma variação sazonal que teve valores significativos na ocorrência de contaminação por coliformes em todas as culturas.

O estudo de Sonier *et al.* (2008), sugere também que os níveis de concentração de *E. coli* em sedimentos são um indicador mais fiável do estado sanitário de uma aquacultura de ostras, do que os níveis da mesma bactéria em água. Uma explicação para isto é que os sedimentos fornecem um ambiente mais estável. Outra será o facto de, em ambiente marinho, esta bactéria poder sobreviver entre 65 e 80 dias, em partículas de areia vs 3-5 dias em água (Labelle *et al.*, 1980; Marino & Gannon, 1991; Young-Joo *et al.*, 2002).

Evidenciou-se também a existência de uma correlação positiva entre a temperatura da água e a concentração de *E. coli*, pois os níveis de concentração da mesma tendiam a ser mais altos entre o final de junho e setembro, época em que a temperatura da água estava mais quente (15-23 ° C). Isto é espectável, uma vez que estas bactérias sobrevivem melhor em água morna e tendem a ser mais abundantes nestas condições (Flint, 1987). Além disso, a taxa de filtração de bivalves aumenta com a temperatura (Loosanoff, 1958; Solic *et al.*, 1999) pelo que os animais são mais suscetíveis de acumular *E. coli* em condições de temperatura mais elevada. Tais flutuações sazonais de níveis de contaminação em ostras, sedimentos e água, enfatizam a importância da recolha de amostras regularmente durante estas alturas do ano.

Por outro lado, vários autores (Crowther *et al.*, 2001; Benedict & Neumann, 2004; Noble *et al.*, 2004; Trousselier *et al.*, 2004) alertam também para o facto de, durante os episódios de ventos fortes e tempestades, os sedimentos poderem ser ressuspensos, promovendo a reintrodução de *E. coli* na coluna de água, expondo assim os bivalves a níveis mais elevados de contaminação.

Assim sendo, as aquaculturas de bivalves estão associadas a alguns riscos para a saúde humana, relacionados com a contaminação da água e manuseio do produto. Isto deve-se ao constante aumento da industrialização, urbanização e densidade demográfica junto às zonas costeiras que tem ocasionado um aumento da contaminação dos ecossistemas marinhos (Castello, 2010). A poluição marinha representa um potencial risco para a indústria da aquacultura próxima das águas costeiras, expondo os animais a diversos contaminantes, podendo transformá-los em impróprios para consumo (Bayen *et al.*, 2007). Este risco é perfeitamente compreensível tendo em conta o sistema de alimentação destas espécies, filtrando enormes quantidades de água, sendo capazes de acumular elementos patogénicos e microrganismos que vivem na coluna da água (Boher *et al.*, 1992). Do ponto de vista da saúde

do consumidor, a contaminação dos bivalves é um assunto a ter particular atenção (Sonier *et al.*, 2006).

1.7. Parasitologia

Os parasitas vivem em associação íntima com o seu hospedeiro, do qual dependem metabolicamente e ao qual causam danos (Anderson & May, 1978). Estes danos podem levar o hospedeiro ao estado de doença. A doença, foi definida por Kinne (1983), como um desvio do estado normal (saúde), funcional e/ou estrutural, de um organismo, implicando prejuízos que causam a redução do seu potencial ecológico.

Os principais agentes causadores de doenças em bivalves marinhos pertencem ao grupo dos vírus, bactérias, fungos, protozoários, tremátodes digenéticos, poliquetas e copépodes (Kinne, 1983). Dentro destes parasitas, tem-se vindo a dar grande atenção aos poliquetas, uma vez que, estes poliquetas (Polychaeta: Spionidae) pertencentes ao género *Polydora*, são conhecidos pelas suas atividades em vários substratos calcários de diversas espécies como algas coralinas, corais, conchas de moluscos e crustáceos (Blake, 1996).

Embora estas espécies escavem as estruturas calcárias para criação do seu habitat, são considerados invasores nocivos do ponto de vista dos aquicultores, uma vez que frequentemente afetam o valor comercial dos moluscos, tanto a nível da concha, tornando-a menos atrativa visualmente, como reduzindo a sua taxa de crescimento e quantidade de carne (Mori *et al.*, 1985; Handley & Bergquist, 1997; Lleonart *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2006; Sato-Okoshi *et al.*, 2008; 2012).

Quando as galerias escavadas por estas espécies atingem o manto das ostras, estas reagem depositando camadas de conchiolina e calcita, como forma de defesa (Boehs *et al.*, 2012), o poliqueta por sua vez preenche estas camadas com lodo, causando o mau aspeto nas ostras quando abertas para consumo (Figueras & Villalba, 1988). Embora estas espécies de parasitas não causem normalmente grandes mortalidades, afetam o crescimento das ostras, pelo desvio da energia que deveria ser usada para o crescimento, para a produção de conchiolina e calcite, para se defender da invasão do mesmo e tornando estes organismos menos apelativos a nível visual, prejudicando assim o seu valor comercial.

2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Para que seja possível iniciar o trabalho de campo que todo o projeto de investigação exige, há que selecionar o contexto e área em que o estudo se vai materializar por forma a obter dados que nos permitam atingir os objetivos propostos. Neste estudo a área de concretização do trabalho foi a Ria Formosa.

2.1. Localização geográfica da Ria Formosa

A sudeste da costa portuguesa, no litoral algarvio, situa-se uma importante formação lagunar, denominada de Ria Formosa ou Ria de Faro/Olhão (Fig. 3).

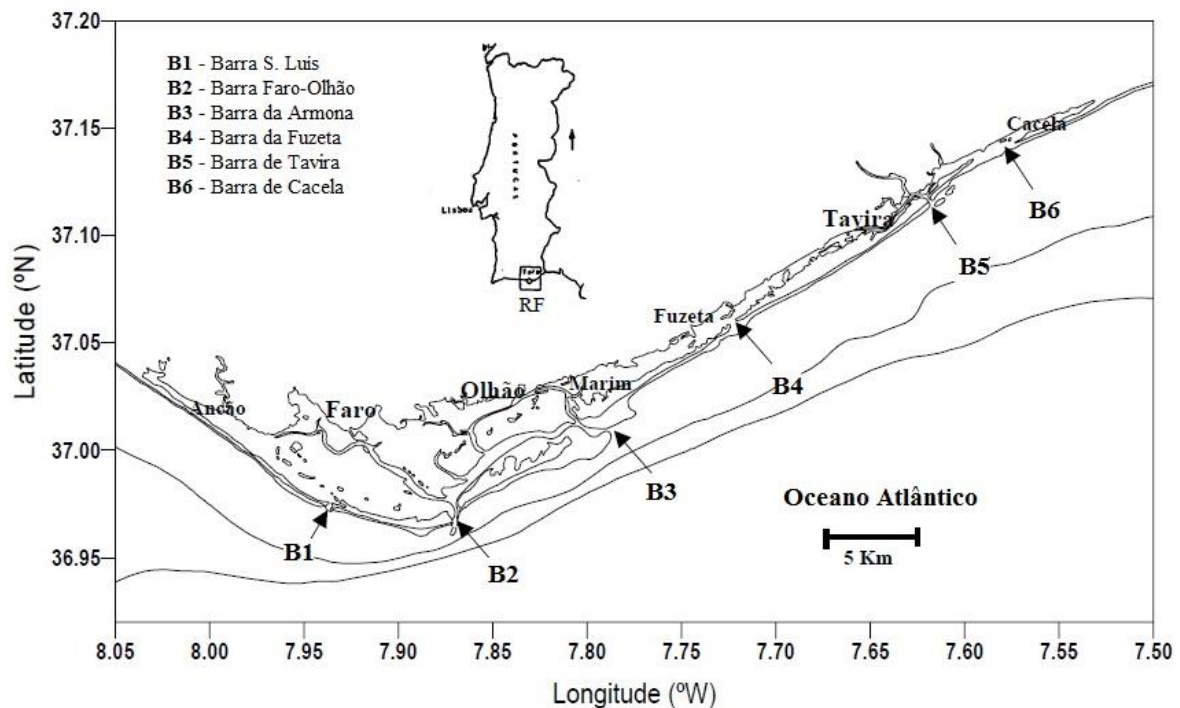


Figura 3 – Localização geográfica da Ria Formosa e as suas barras (Falcão *et al.*, 2003).

A Ria Formosa, juntamente com a Ria de Aveiro e os Estuários do Tejo e do Sado, constituem o grupo de zonas húmidas mais importantes do nosso país (Dionísio, 1996) e estende-se por cerca de 55 Km, desde o Ancão a Cacela, sendo a sua largura variável,

podendo atingir 6 Km, desde Faro ao Cabo de S. Maria. Apresenta uma forma triangular e uma área de cerca de 16 300 ha (Dionísio, 1996). Estima-se uma área submersa de cerca de 10 500 ha (Falcão *et al.*, 2003). A sua extensão abrange os concelhos de Faro, Olhão, Loulé, Tavira e Vila Real de Santo António.

Este sistema enquadra-se na definição de zona lagunar intertidal (Dronkers e Zimmerman, 1982). Está protegido do oceano por uma barreira arenosa constituída por cinco ilhas barreira, interrompidas por seis barras (S. Luís, Faro-Olhão, Armona, Fuzeta, Tavira e Cacela) que estabelecem a ligação do mar com a área interior, que engloba salinas, viveiros, ilhas de pequenas dimensões e um conjunto de canais fortemente ramificados.

Devido à ausência de gradientes de salinidade significativos, à elevada taxa de renovação de águas e à baixa concentração de nutrientes, considera-se a Ria Formosa como pertencente ao domínio dos estuários (Pêra, 1986).

2.1.1. Condições climatéricas

O clima do litoral algarvio apresenta verões quentes e secos, invernos amenos e precipitações fracas, correspondendo assim a um clima do tipo mediterrâneo, como ilustram os dados da Agrometeorologia da Direção de Serviços de Experimentação e Fomento da Produção Agropecuária da Direção Regional de Agricultura do Algarve, na estação do Patacão/Faro¹, do ano de 2013, relativamente à temperatura do ar e precipitação (Fig. 4 e 5).

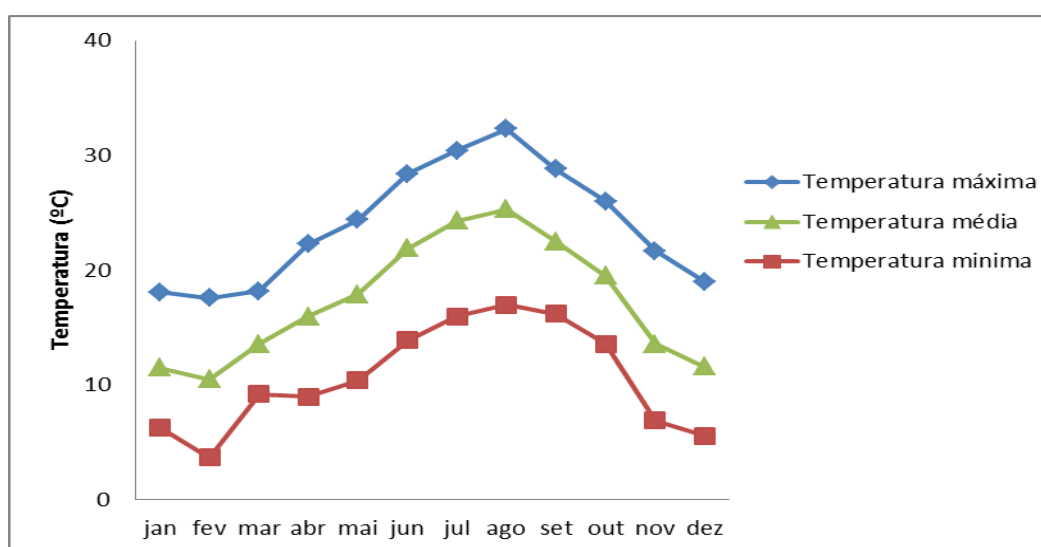


Figura 4 - Temperatura do ar na estação do Patacão/Faro no ano de 2013.

¹ Sf, <http://www.drapalg.min-agricultura.pt/ema/images/dados/pat13.pdf>

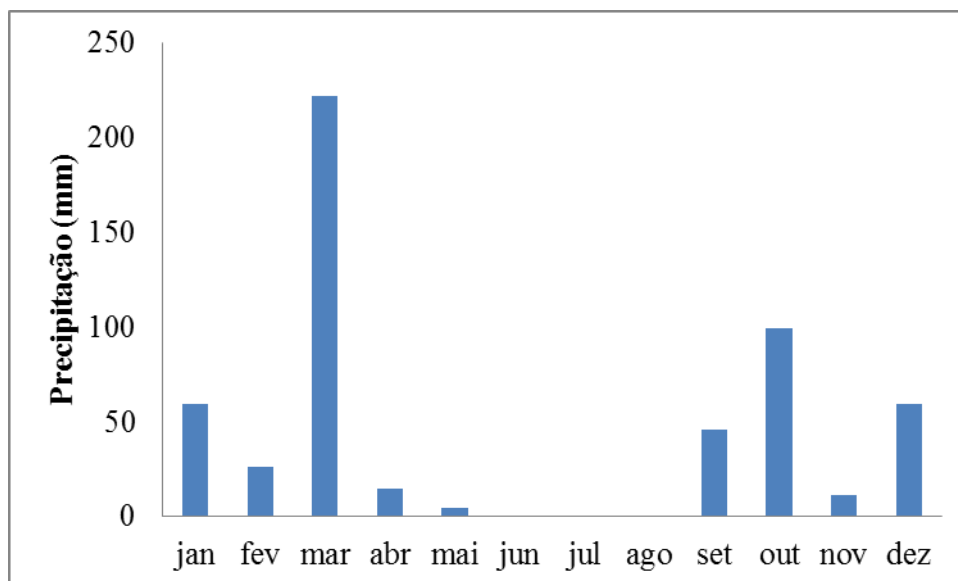


Figura 5 - Total de precipitação na estação do Patação/Faro no ano de 2013.

Através da observação dos gráficos podemos verificar que entre os meses de junho e setembro foi o período onde se registou a maior temperatura anual com o valor mais alto em agosto, de 33,2 ° C. Por outro lado, as temperaturas mais baixas foram registadas entre novembro e fevereiro, sendo este último, o mês com a temperatura mínima mais baixa, 3,7° C.

Em relação à precipitação, observaram-se dois picos anuais nos meses de fevereiro e outubro, com valores de 222 mm e 99,2 mm, respetivamente. Sendo que nos meses de maio, junho, julho e agosto, a precipitação foi praticamente nula.

2.1.2. Condições hidrográficas

A amplitude da maré varia entre 1 m, nas marés mortas e 3,5 m, nas marés vivas. A existência de várias barras, parece ser o resultado da troca dum grande volume de água, entre o sistema lagunar e o oceano (Phleger, 1969).

Uma elevada amplitude da maré, significa uma intensa troca de massa de água (40 a 70 %), que ocorre durante cada ciclo de maré (Sprung, 1994). Grandes áreas ficam expostas ao ar durante várias horas em cada ciclo de maré semi-diurno. Os ciclos biogeoquímicos naturais deste sistema lagunar, são essencialmente regulados por trocas com a água do mar feita pelo ciclo de marés e pelas trocas com a interface do sedimento (Falcão *et al.*, 2003).

A Ria Formosa é um sistema lagunar de baixa profundidade, pelo que toda a coluna de água se desloca no mesmo sentido, o qual se inverte com o ritmo das marés (Dionísio, 1996). Existem cinco rios que realizam descargas para a Ria Formosa, porém quatro deles são sazonais, sendo do Rio Gilão (Tavira) a única entrada permanente de água doce para a lagoa (Barreira, 2007). Dionísio (1996), refere ainda que os rios que chegam à ria só têm um caudal significativo um ou dois meses por ano e num número limitado de dias.

Devido à baixa entrada de água doce para a Ria, a salinidade de água varia entre os 35,5 psu e os 36,6 psu, com a exceção dos períodos de chuva intensa, onde pode chegar aos 30 psu (Falcão *et. al.*, 1992). A temperatura da água varia de 12-13 ° C, no inverno, a 27-28 ° C, no verão (Barreira, 2007). A temperatura máxima da água, na Ria Formosa, ocorre entre os meses de julho e setembro (Dionísio, 1996), podendo a mesma ainda variar alguns ° C ao longo do dia.

2.1.3. Poluição

O crescimento dos centros urbanos e o aumento do desenvolvimento das agriculturas intensivas poderá constituir um perigo para a estabilidade do ecossistema da Ria Formosa. Estudos, sobre a qualidade microbiológica da água e moluscos bivalves da ria, consideram o grau de poluição considerável e carente de medidas corretivas (Cachola & Nunes, 1974, 1985 e 1986; Lima & Vale 1980; Cachola & Sampayo, 1984; Cachola, 1990; Baptista, 1990, 1993).

As bactérias *E. coli* e *Streptococcus faecalis* apresentam uma grande variabilidade espacial nos bivalves e na água do sistema lagunar. Nas áreas sob o impacto direto e indireto de águas residuais tratadas e não tratadas, bactérias fecais podem atingir valores entre 4 600 e 46 000 MPN (número mais provável) *E. coli* / 100g de carne e líquido intervalvar (áreas classificadas por zona C de acordo com a legislação²). Na maioria das zonas intertidais de culturas de bivalves, os valores de coliformes fecais podem variar de 230 a 4600 MPN *E. coli* / 100g de carne e líquido intervalvar (áreas classificadas por zona B). Em áreas sem quaisquer constrangimentos, os níveis obtidos estão abaixo de 230 MPN *E. coli* / 100g de carne e líquido intervalvar (áreas classificadas como zona A). Estas bactérias, presentes na água do sistema lagunar, diminuem drasticamente com o aumento da distância das zonas de descarga de águas residuais, devido à dispersão.

² Cf. Diário da República, 2.ª série — N.º 227 — 22 de novembro de 2013.

Num programa de monitorização das águas da Ria Formosa, realizado em 2002 (in Falcão *et al.*, 2003), perto da zona de descarga de águas residuais, por parte das estações de tratamento dos principais centros urbanos (Faro, Olhão e Tavira), os valores médios registados foram entre 250 e 1000 MPN *E. coli*/100ml, a uma distância de 100 m do ponto de descarga, enquanto os valores obtidos, para uma distância de 1000 m, foram inferiores a 200 MPN *E. coli*/100ml.

As concentrações de metais pesados em sedimentos, partículas em suspensão e organismos filtradores são espacialmente variáveis e relativamente baixos neste ecossistema (Cortês *et al.*, 1986). De acordo com esses autores, as maiores concentrações de zinco (Zn), chumbo (Pb), cobre (Cu) e cromo (Cr) foram medidas em sedimentos e partículas perto dos principais centros populacionais. Contrariamente nas zonas livres de descargas antropogénicas, as concentrações destes metais são menores, não apresentando problemas ambientais (Relatório do Projeto "Estudos de Monitorização do Impacte das Dragagens na Ria Formosa" 1999 - 2000).

3. Objetivos

Objetivo Geral:

- Determinar o *status* sanitário de ostras produzidas em tanques de cultivo multitrófico com peixes *versus* monocultivo

Objetivos específicos:

- Determinar os índices de condição das ostras:
 - Índice biométrico externo: comprimento, largura, espessura, peso e índice de AFNOR.
 - Caracterização do estado de maturação das gonadas.
- Analisar parâmetros microbiológicos na ostra:
 - Coliformes totais, *E. coli* e *Vibrio* spp.
 - Presença/ausência do parasita *Polydora* spp.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Num estudo de investigação científica, tal como afirma Fortin (1999) a metodologia a adotar decorre da natureza do problema e dos objetivos traçados. A metodologia, num processo de investigação deve explicitar detalhadamente, os princípios metodológicos, nomeadamente tipo de estudo, população em estudo, tipo de amostragem, método e materiais necessários para colheita dos dados e previsão de tratamento e análise dos mesmos.

Neste sentido, neste capítulo, será feita a explicitação e fundamentação das opções metodológicas, assim como o processo heurístico a seguir.

Trata-se de um estudo que se situa num paradigma de investigação quantitativo, pois seguirá um processo sistemático de colheita de dados observáveis e quantificáveis (Fortin, 1999).

4.1. Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA): o contexto do estudo

Este estudo foi realizado no IPMA, na Divisão de Aquacultura e Valorização, à qual compete a investigação, desenvolvimento tecnológico e demonstração em aquicultura, nomeadamente nos domínios da reprodução, melhoramento genético, nutrição, sanidade, bem como ao nível da diversificação e dos sistemas de produção.

A Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (Fig. 6) é uma estrutura de investigação e desenvolvimento tecnológico, dimensionada para realizar, à escala pré-industrial, ensaios de produção de espécies com atual ou potencial interesse para a aquicultura nacional. Esta estrutura constitui ainda o suporte privilegiado para a transferência de tecnologia para os aquicultores e para a formação técnica e científica nesta área, sendo de realçar a componente pedagógica deste projeto.



Figura 6 - Imagem panorâmica da estação piloto de piscicultura de Olhão.

Esta estação tem uma área de cerca de 7 hectares, em terrenos do Parque Natural da Ria Formosa e é composta por:

- Uma maternidade;
- Uma zona de pré-engorda intensiva;
- Uma zona de engorda semi-intensiva em tanques de terra e áreas destinadas a estudos do âmbito ambiental.
- Uma jaula oceânica onde decorrem ensaios de cultivo de peixes em sistemas *off-shore*.

A investigação constitui a vertente fundamental deste projeto, tendo em conta a necessidade de promover e desenvolver o conhecimento da aquacultura numa base ecologicamente sustentada.

4.2. População e tipo de amostragem

A população em estudo foi constituída por 750 exemplares de ostras *C. gigas* que foram separadas aleatoriamente e distribuídas por seis sacos diferentes, com 125 exemplares cada um, para que a densidade não fosse demasiado elevada. Os sacos foram colocados em três

locais diferentes, ficando cada local com um total de 250 ostras. Estes foram distribuídos, entre os dias 15 e 18 de Novembro de 2013, pelos seguintes locais (Fig. 7):

- A – Cultivo multitrófico, Ria Formosa - tanques de terra batida em policultivo, com peixes, robalos (*Dicentrarchus labrax*), douradas (*Sparus aurata*), meros (*Epinephelus marginatus*) e sargos veado (*Diplodus cervinus*). Os tanques têm um volume de 2500 m³ e uma profundidade de 1,5 m. As ostras foram cultivadas em suspensão na água, a flutuabilidade foi conferida pela inclusão de uma placa de esferovite nos sacos contendo as ostras.
- B – Monocultivo, Ria Formosa - tanque de terra batida onde os sacos das ostras foram colocados, em monocultura, com a uma placa de esferovite para conferir flutuabilidade aos mesmos. Na preia-mar a profundidade nos tanques pode chegar a 2,5 m.
- C – Monocultivo, Sapal de Castro Marim - tanque de terra batida com cerca de um hectare onde as ostras foram colocadas em monocultura, em camas elevadas, e separadas dos peixes. Com uma profundidade média dos tanques de 2 m na preia-mar.

A escolha destes locais deveu-se ao facto destes serem os únicos locais onde existem pisciculturas ativas na zona próxima de Olhão.

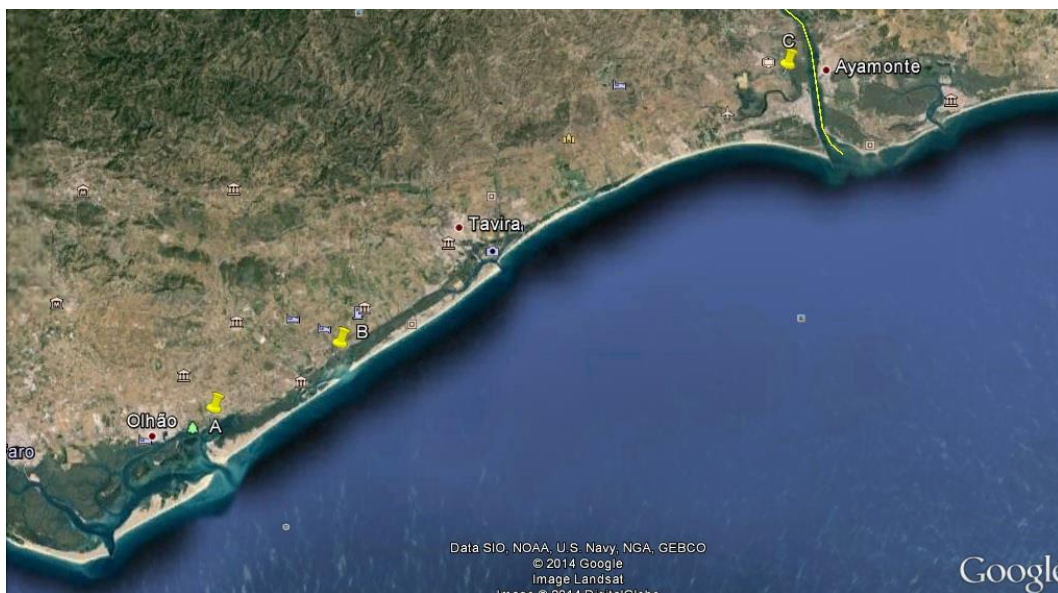


Figura 7 - Mapa com a localização, dos três locais envolvidos no estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

A colheita dos exemplares em cada ponto de amostragem foi feita mensalmente e durante um período de seis meses, de fevereiro a julho de 2014. Todos os meses, foram retiradas de cada local 30 ostras para análises macroscópicas, histológicas, morfométricas, parasitologia e microbiologia.

4.3. Procedimentos de colheita de dados

- Determinação dos índices de condição em moluscos:

Índice biométrico externo

Para a caracterização morfométrica, foram avaliados os parâmetros biométricos dos exemplares como: peso, comprimento total, largura e espessura da concha, de acordo com Rajaei *et al.* (2014), como se observa na Fig. 8.

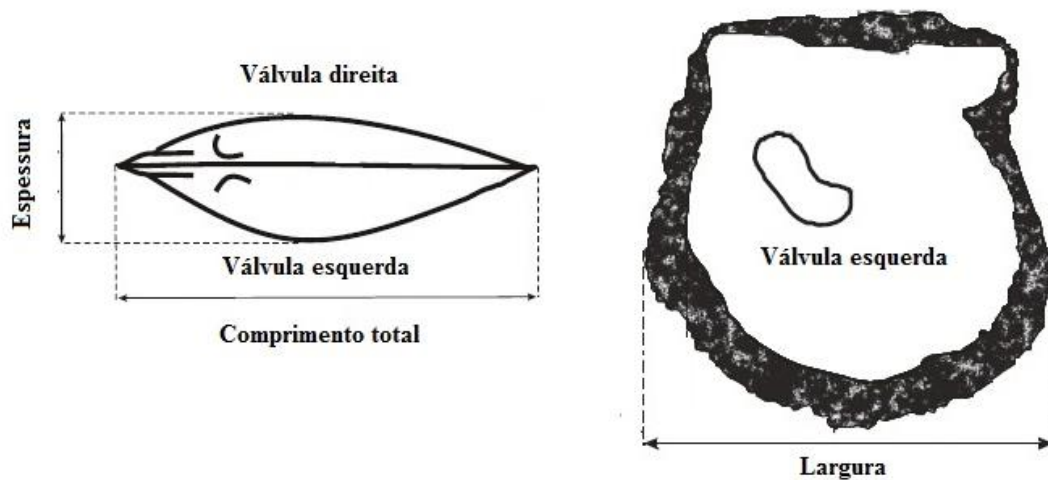


Figura 8 - Representação esquemática dos procedimentos para avaliação dos parâmetros biométricos (Adaptado de Rajaei *et al.*, 2014).

O índice de qualidade foi também observado, e utilizamos o índice de qualidade AFNOR (Goyard, 1995). Este índice deriva da norma NF V45-056 (1985) e é calculado de acordo com a seguinte fórmula (Soletchnik, *et al.*, 2000):

$$\text{AFNOR} = (\text{carne húmido} / \text{peso total}) \times 100$$

Os resultados exprimem-se em percentagem da relação entre o músculo húmido e o peso total do indivíduo, permitindo classificar as ostras em "*finas*" e "*especiais*", de acordo com a tabela 3 de classificação por categorias das ostras.

Tabela 3 – Categorização segundo o Índice AFNOR

Índice AFNOR	Categorias
Inferior a 6.5	Não classificadas
Entre 6.5 e 9	"Finas"
Superior a 9	"Especiais"

O método utilizado para o cálculo do índice de qualidade AFNOR foi semelhante ao descrito por Ferreira (2003), ou seja, o músculo foi separado cuidadosamente das valvas, evitando a inclusão de partículas da concha, sendo este depois colocado em papel absorvente durante alguns minutos para retirar o excesso de água, para posterior medição do peso húmido do mesmo.

- Análise de parâmetros microbiológicos

Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica, por sua vez, fez-se de acordo com os procedimentos descritos na norma ISO 7218:2007. Foram pesquisadas a presença de bactérias *E.coli*, bactérias coliformes totais e *Vibrio spp.*

As análises de *E.coli* e de coliformes totais foram efetuadas segundo o método do Número Mais Provável (MPN) descrito por Donovan *et al.* (1998). Este método consiste na preparação de séries de 5, com diferentes diluições de uma suspensão mãe. Para a qual se realizam os seguintes passos (Fig.9):

- Separa-se os animais das conchas na proximidade do bico de Bunsen até se obter um total de 80g;
- Colocam-se estes 80g num saco estéril com filtro e leva-se 2 minutos ao Stomacher a 200 rpm;

- Retiram-se 40g da amostra para outro saco estéril, com filtro e adiciona-se 100 ml de solução salina (Tryptona) voltando a colocar 2 minutos no Stomacher a 200rpm;
- Adiciona-se 260 ml de solução salina (Tryptona) e repetem-se os 2 minutos a 200 rpm no Stomacher.

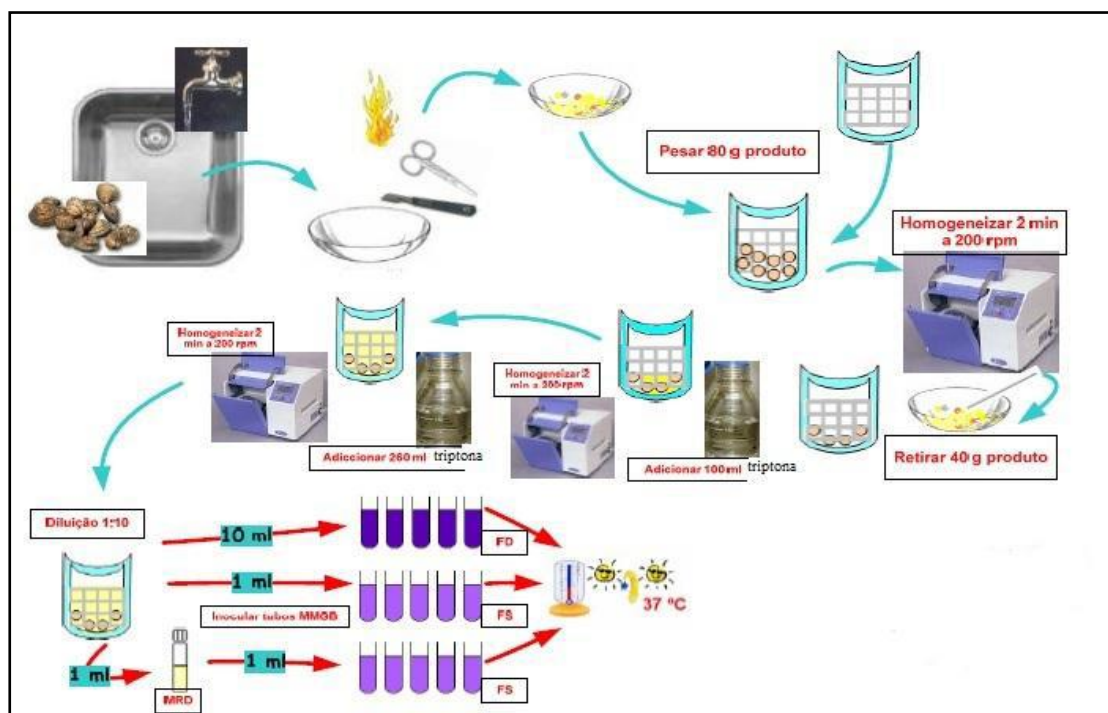


Figura 9 – Representação esquemática dos procedimentos para análise microbiológica (Adaptado de Donovan *et. al.*, 1998)

Após a obtenção da suspensão mãe, retirou-se 10 ml (10^{-1}) da mesma, para cada tubo da primeira série, que contém um caldo de glutamato modificado, com minerais (MMGB, Oxoid CM0607) de concentração dupla. Para a segunda série, retirou-se 1 ml (10^{-2}) para cada tubo, contendo estes MMGB de concentração simples e por fim, na terceira série de tubos, colocou-se 1 ml da diluição 10^{-2} contendo cada um também caldo MMGB de concentração simples (Gonçalves, 2010).

Depois desta preparação, os tubos das três séries foram incubados, a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C, durante 24 horas. Após este período de incubação, observou-se os tubos, para verificar a cor do meio. A mudança de cor do meio de lilás para amarelo, indica a produção de ácido glutâmico a partir da lactose, apontando para a presença de bactérias na amostra.

Para a confirmação e identificação destas bactérias, realizou-se a repicagem, utilizando-se ansas de 10 μ L, dos tubos suspeitos (com alteração de cor), para placas de Tryptona BÍlis Agar

com X-Glucuronido (TBX) um meio cromogénico, para isolamento de *E. coli* e placas de Agar ChromoCult para Coliformes (CHR), para isolamento de coliformes totais. Estas placas foram incubadas durante 24 horas, a 44 ± 0.5 para as placas de TBX e 37 ± 0.5 ° C para as placas de CHR. O crescimento de colónias azuis/esverdeadas, nas placas de TBX, é considerado como indicador da presença de *E. coli* e o crescimento de colónias salmão e rosa-avermelhadas, nas placas de CHR, como indicador da presença de coliformes totais. São registados o número de tubos que apresentam reação positiva (em cada série), usando-se a tabela de MPN (ISO, 2005) para o cálculo do Número Mais Provável de organismos em 100 g de amostra.

Relativamente à análise da amostra para pesquisa de *Vibrio* spp, foi retirado 1 ml da solução mãe, atrás referida (40g de carne e líquido intervalvar), antes de diluição com triptona, sendo a placa de Agar Tiosulfato Citrato Sais biliares e Sacarose (TCBS) inoculada com 100 µL e posteriormente incubada a 24 ± 1 ° C durante 24 horas. Esta análise foi realizada em triplicado, tendo sido inoculadas várias diluições. Após o período de incubação contou-se o número de colónias que se desenvolveram nas placas cujo número de colónias variou entre 30 e 300 ufc.

Para as análises microbiológicas atrás descritas, foram utilizados meios de cultura diferentes. Estes meios de cultura foram preparados de acordo com as indicações fornecidas pelos fabricantes (Anexo I).

- Avaliação da presença do parasita *Polydora* spp.

Para o estudo parasitológico, ou seja, o despiste da presença de *Polydora* spp. antes de se iniciar os estudos morfológicos e macroscópicos, observou-se as conchas das ostras em busca de sinais da sua presença, como a existência de escavações e perfurações da concha, registando a sua presença ou ausência em todos os exemplares amostrados.

- Caracterização do estado de maturação das gónadas

Para a avaliação do estado de maturação das gónadas foram feitas secções histológicas das gónadas utilizando uma metodologia semelhante à utilizada por Flahauw *et al.* (2012). Foram separadas todos os meses 10 ostras para o estudo histológico. Para tal, as ostras foram abertas e retirado o excesso de tecido, como branquias e musculatura, sendo posteriormente colocadas

em solução de Davidson durante um período de 48 h. Após este período, os exemplares foram lavados durante meia hora para retirar o fixador e colocados em álcool a 70 % para conservação até uma posterior análise. Após este tratamento, a elaborou-se os cortes histológicos.

Para a preparação dos blocos de parafina, foram realizados os cortes de tecido, com o auxílio de um bisturi, obtendo-se uma secção de 3 a 5 mm, de modo a que o aspeto dorsal-ventral passasse através da glândula digestiva e do tecido branquial posterior aos palpos, como se exemplifica na Fig. 10.

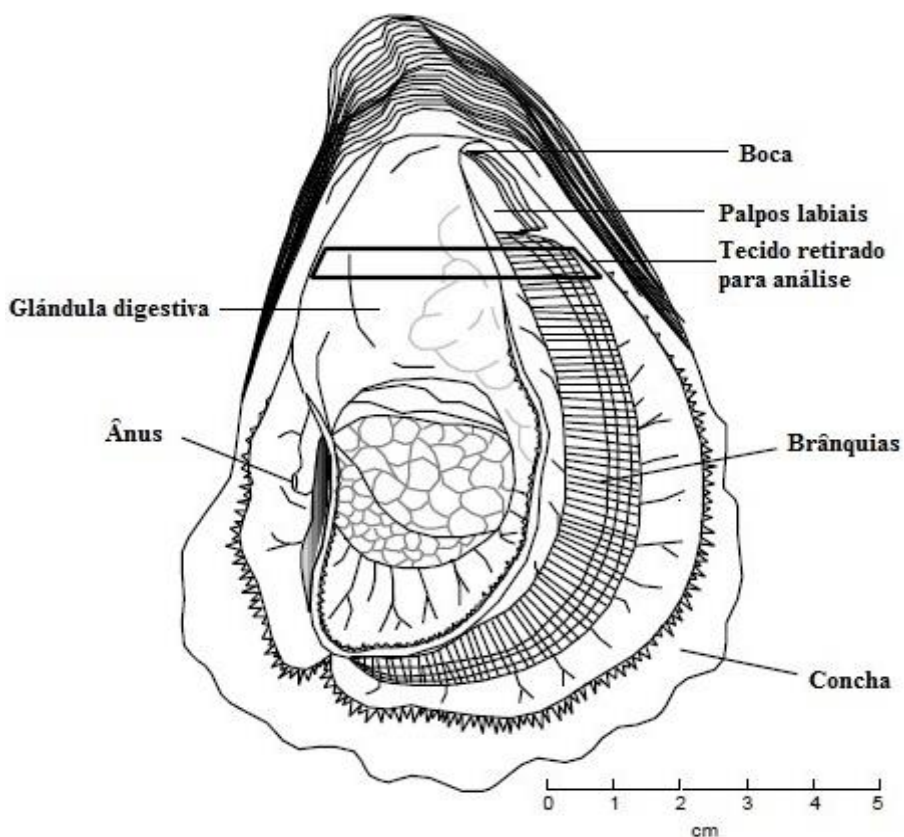


Figura 10 – Local onde foi realizado o corte histológico (Adaptado de Ellis *et al.*, 1998).

Após processamento dos tecidos, com o aparelho automático de processamento de tecidos Leica Jung 1020 (Fig. 11-A), foram produzidos os blocos de parafina com o auxílio do sistema de inclusão de parafina Leica EG 1140 H (Fig. 11-B). Depois da produção dos blocos de parafina e com o auxílio do Micrótopo Leica RM- 2155 (Fig. 11-C) procedeu-se ao desbaste, que consistiu em cortar os blocos de parafina com uma medida de 15 μ m, até expor os tecidos. Após este desbaste foram realizados os cortes histológicos com uma medida de 5

µm, sendo estes cortes colocados num banho com água destilada, num equipamento de banho-maria circular Electrothermal 2155 (Fig. 11-D) a uma temperatura entre 45 a 50° C para que os mesmos se expandissem. Os cortes foram posteriormente colocados na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24 h para que os mesmos secassem e aderissem à lâmina.



A



B



C



D

Figura 11- Equipamento utilizado para efetuar cortes histológicos para avaliação do estado de maturação das gónadas: A) Aparelho automático de processamento de tecidos Leica Jung 1020, B) Sistema de inclusão de parafina Leica Eg 1140 e placa de refrigeração Leica GG 1140, C) Micrótomo Leica RM-2155, D) Banho maria circular Electrothermal.

Posteriormente foi efetuada a coloração com Hematoxilina e Eosina (Anexo III), ao que se seguiu a montagem para observação ao microscópio.

Após a coloração, as preparações foram observadas ao microscópio e classificadas em três estados de maturação diferentes, como descrito por Flahauw *et al.* (2012). Assim sendo o

estado de maturação 1, quando as ostras não apresentaram gâmetas maduros, estado de maturação 2, quando as ostras já apresentam alguns gâmetas maduros e estado de maturação 3, quando as ostras apresentam a gónada cheia de gâmetas maduros.

- Dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água dos locais do estudo

Foram registados os valores da precipitação e energia solar na Ria Formosa, recorrendo aos dados fornecidos pelo Agrometeorologia da Direção de Serviços de Experimentação e Fomento da Produção Agropecuária da Direção Regional de Agricultura do Algarve, na estação do Patacão/Faro. No caso da precipitação foi calculada a média dos valores observados 15 dias antes das datas das amostragens. Para a energia solar foi considerada a média mensal calculada para cada mês.

Relativamente aos parâmetros físico-químicos da água, nomeadamente temperatura e salinidade, esta informação foi fornecida pelas empresas de aquacultura, que por norma controlam e monitorizam estas variáveis ambientais. No caso da temperatura no local A e C os valores correspondem a uma média mensal. No local B esta amostragem foi feita três vezes por mês tendo sido considerada a média correspondente as estas três amostras mensais. Relativamente à salinidade os valores observados no local B foram obtidos de forma semelhante à temperatura. No caso do local C, os dados foram obtidos por uma média mensal arredondada utilizando o refractómetro óptico.

4.4. Tratamento dos dados

Os dados colhidos necessitam de ser organizados e tratados de forma a serem passíveis de analisar e interpretar. Trata-se de identificar os aspetos essenciais de uma determinada situação e descrever sistematicamente as suas relações. A informação é tratada no sentido de construir um significado que responda aos objetivos a alcançar.

Assim, após a leitura dos resultados, nos diferentes momentos de colheita de dados e das diferentes análises, os dados foram registados. Os resultados das análises microbiológicas foram registados em folha de registo interno do IPMA (Anexo II). Para os restantes resultados, foi elaborada uma base de dados em Excel, para posterior tratamento estatístico – descritivo e indutivo - dos dados.

Para a análise descritiva dos dados, como refere Quivy & Campenhoudt (1998), apresentar dados com recurso a gráficos favorece a qualidade das interpretações. Neste sentido, a estatística descritiva e a expressão gráfica foram as técnicas utilizadas para a apresentação e interpretação dos resultados.

Para a análise estatística indutiva dos resultados, foi utilizado o Programa GraphPad prism 5, e realizadas análises de variância³, com recurso a testes de Anova bifactorial, para comparar os dados obtidos nos 3 locais amostrados e testes de Bonferroni de comparações múltiplas, para intervalos de confiança de 95%.

³ A análise de variância compara médias de diferentes populações para verificar se possuem médias iguais ou não. Permite que vários grupos sejam comparados a um só tempo e é utilizada quando se quer saber se diferenças amostrais observadas são reais (se as diferenças são estatisticamente significativas nas populações observadas) ou casuais (decorrentes da mera variabilidade amostral) (Milone, 2009)

5. RESULTADOS

Neste capítulo apresentamos os resultados obtidos decorrentes da análise dos dados colhidos ao longo dos seis meses em que decorreu o trabalho de campo.

5.1. Biometria

- Peso

No que se refere ao peso das ostras, os valores obtidos ao longo dos seis meses em análise, originaram médias mensais que apresentamos na Fig. 12.

Para este parâmetro, como podemos observar, o aumento do peso das ostras no local A foi muito superior aos dos outros 2 locais. Fazendo a diferença entre o peso das ostras antes destas serem separadas pelos diferentes locais do ensaio (T0) e a média de peso das ostras no final do mesmo, podemos verificar que as ostras do local A apresentaram um aumento de 45,32 g enquanto para os outros dois locais foram de 20,48 g (local C) e 6,28 g (local B).

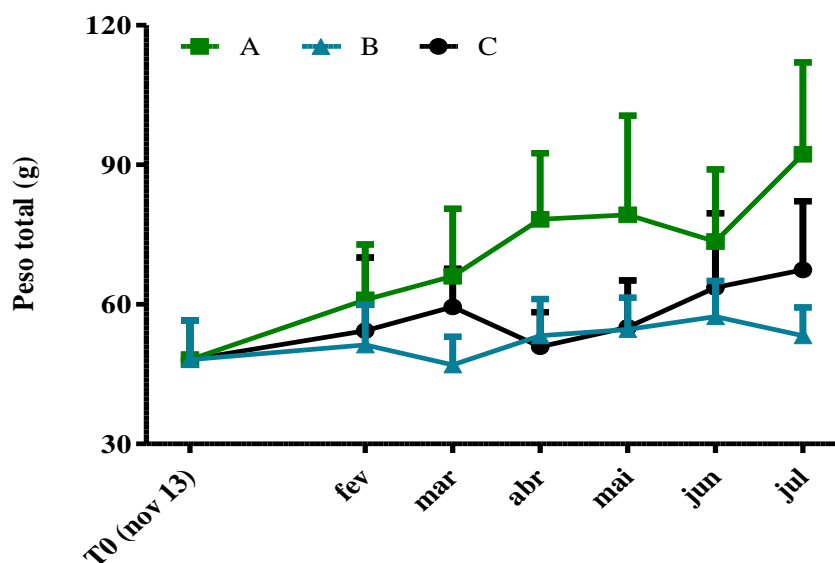


Figura 12 – Registo mensal do peso médio de *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais de estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

O aumento de peso das ostras quer entre os diferentes locais, quer ao longo do tempo, foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$ para ambos). Também se observou uma interação significativa entre os fatores local/tempo ($p < 0,0001$).

Através do teste de Bonferroni de comparação múltipla, verificou-se que o peso das ostras do local A e B, à exceção do mês de fevereiro, foi estatisticamente diferente em todos os restantes meses e estas diferenciou-se, nos meses de abril, maio e julho, do local C. Os resultados dos locais B e C diferiram estatisticamente entre si apenas nos meses de março e julho.

- Largura

Relativamente à largura das ostras ao longo dos seis meses, como se observa na Fig. 13, antes de serem separadas pelos diferentes locais (T0), a largura média era de 45,43 mm. Com o decorrer do ensaio podemos ver que as ostras do local A, apresentaram o maior crescimento neste parâmetro no fim do ensaio (+ 4,47 mm) em comparação com as ostras de local C (+ 3,51 mm) e o local B (- 1,95 mm).

Como relativamente à largura da concha, esta não é passível de diminuir, numa análise linear destes valores e das curvas de registo das medidas médias mensais da largura observadas na

Fig. 13 podem parecer indicar, que tais resultados têm a ver com a aleatoriedade da colheita das amostras mensais, considerando-se que o crescimento foi nulo (0).

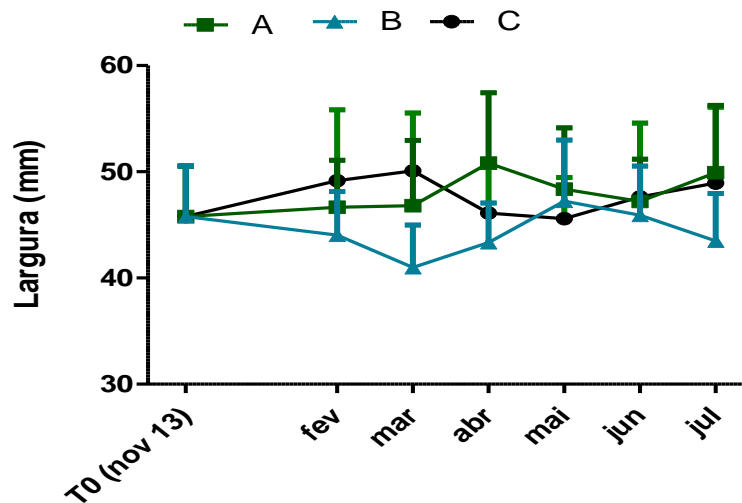


Figura 13 – Registo mensal da largura média de *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Os valores médios das larguras das ostras, registados nos três locais foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$). Através do pós-teste de Bonferroni podemos ver que os valores da largura das ostras do local C diferiram das do local A no mês de abril e do local B nos meses de fevereiro, março e julho. Comparando o local A e o B observou-se que os resultados da largura das ostras destes locais foram estatisticamente diferentes nos meses de março, abril e julho. Verificou-se também que ao longo do tempo não foi observada uma diferença estatística ($p = 0,6839$). No entanto houve uma interação, estatisticamente significativa, entre os fatores local/tempo ($p < 0,0001$).

- Espessura

A evolução média da espessura da concha das ostras, como se verifica na Fig. 14, antes da separação das ostras pelos três locais do ensaio (T0), indica que a medida média da espessura da amostra era de 26,07 mm. A diferença entre este valor e os valores médios de espessura da concha das ostras, no final do ensaio, em cada um dos três locais, foi novamente superior no local A onde se verificou um crescimento nas ostras de +3,51 mm, contra os -0,31 mm do local C e os -2,15 mm no local B.

Foi nas ostras do local A que se registou maior aumento médio. Nos restantes locais verificaram-se valor médios negativos que, à semelhança do referido relativamente à largura, resultará da aleatoriedade das amostras mensais, uma vez que a espessura também não é passível de diminuir, considerando-se um crescimento nulo (0).

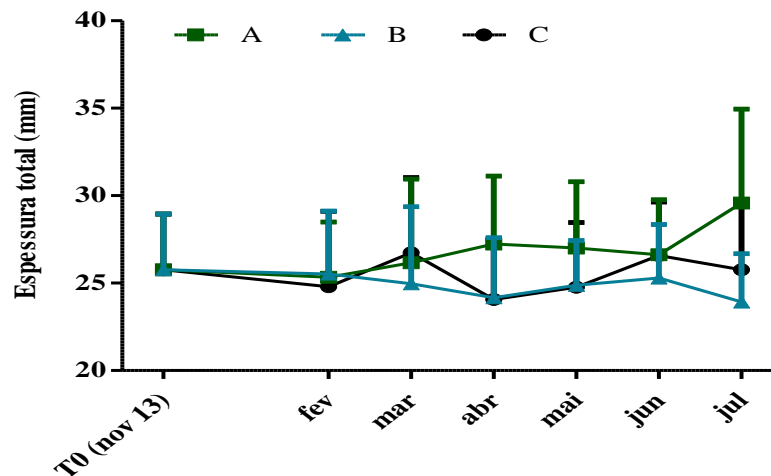


Figura 14 – Registo mensal da espessura média de *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Relativamente ao aumento médio da espessura das conchas das ostras verificou-se que as amostras são estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$). Verificou-se uma interação significativa entre os fatores local/tempo ($p = 0,0060$), no entanto ao longo do tempo os resultados não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,2098$). Comparando estas amostras entre si podemos ver que os resultados para o local C foram estatisticamente diferentes do local A em abril e julho e não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos meses em comparação com o local B. Entre o local A e B as diferenças estatísticas observaram-se nos meses de abril e julho.

- Comprimento total

A análise da média do comprimento total mensal originou o gráfico da Fig. 15. Podemos ver que inicialmente nas amostras do local C, começou por se observar maiores comprimentos médios, sendo no mês de abril ultrapassado pelas ostras do local A. Mais uma vez foi nas ostras do local B que se registou menor crescimento neste parâmetro.

Antes da separação das ostras (T0), a média de comprimento total das ostras era de 73,88 mm. A diferença entre esta média inicial e a final dos comprimentos das ostras nos três locais do

ensaio, permite-nos verificar que, mais uma vez, foi no local A que se observou o maior crescimento, com +8,42 mm, em comparação com os +7,66 mm no local C e - 4,72 mm no local B. À semelhança do referido anteriormente, relativamente à largura e espessura, a diminuição verificada no comprimento total, só poderá resultar da aleatoriedade das amostras mensais uma vez que o comprimento não é passível de diminuir, considerando-se o aumento de comprimento nulo (0).

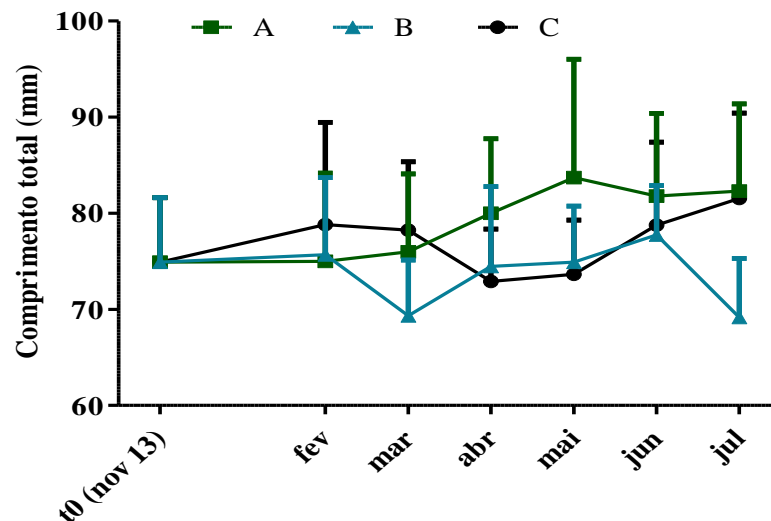


Figura 15 – Registo mensal médio do comprimento total de *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Através da Anova bifatorial, foi possível verificar que a diferença estatística observada, é significativa entre os diferentes locais estudados, relativamente ao comprimento total ($p < 0,0001$), bem como ao longo do tempo ($p = 0,0084$). A interação observada entre estes dois fatores é também estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O pós-teste de Bonferroni, indicou que as diferenças estatísticas significativas observadas entre o local A e B, foram nos meses de maio e julho e entre o local A e C, nos meses de abril e maio. Por último, nos locais B e C, estas diferenças foram observadas nos meses de março e julho.

- Índice de qualidade AFNOR

Para o índice de qualidade de AFNOR, ou seja a quantidade de carne húmida de cada animal, observando na Fig. 16, podemos ver que em todos os locais houve um decréscimo de quantidade de carne húmida por animal ao longo da amostragem.

No local C, as ostras começaram com o Índice de AFNOR maior, 22,92 %, foi sempre decrescendo ao longo do período de amostragem acabando, em julho, com 14,89 %, apresentando assim, um decréscimo de 8,03 %.

As ostras do local A, cujo índice de qualidade cresceu entre fevereiro e abril, sofreram uma quebra em maio, que recuperaram em junho voltando a sofrer grande quebra em julho. O valor inicial do Índice de AFNOR foi de 19,92 % e o final foi de 9,90 %, valor mínimo registado, tendo assim um decréscimo de 10,02 %.

Por sua vez, o local B foi onde as ostras apresentaram menor Índice de AFNOR inicial, 16,71 % e no final foi de 10,44 %, observando-se um decréscimo de 6,27 %. No mês de maio, neste local, registou-se um grande aumento do Índice de AFNOR, que foi de 18,86 % de quantidade de carne húmida, sendo inclusive o seu valor máximo e o sítio com maior índice de qualidade, neste mês. Contudo, voltou a sofrer uma grande quebra nos meses de junho e julho, registando-se neste ultimo o seu valor mínimo.

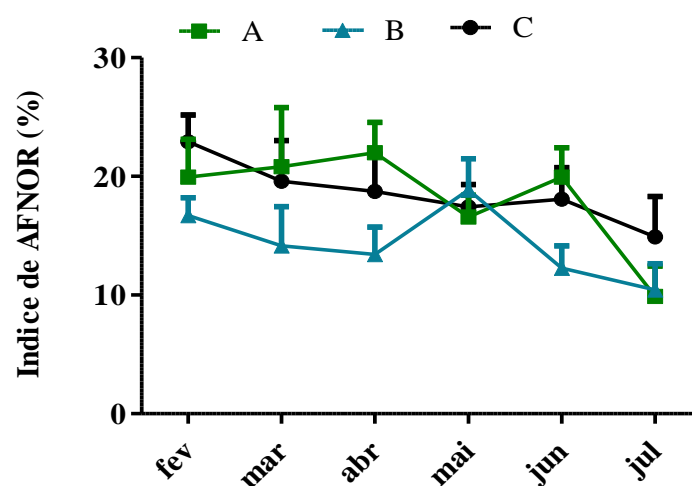


Figura 16 – Registo mensal dos valores médios de índice de AFNOR de *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

As diferenças registadas nos valores de AFNOR são estatisticamente diferentes, tanto entre os locais das amostragens ($p < 0,0001$), como ao longo do tempo ($p < 0,0001$). No que se refere à interação entre estes dois fatores também se evidenciou como significativa ($p < 0,0001$). Estas diferenças foram observadas entre o local A e B, nos meses de março, abril e junho e entre o local A e C no mês de julho. Entre o local B e C apenas no mês de maio, estas diferenças foram significativas.

5.2. Parasitologia

Da análise parasitológica, nomeadamente de *Polydora* spp. (Fig. 17), como podemos verificar no Tabela 4, até ao mês de maio não se observou a presença deste parasita. Foi nas ostras do local B que este parasita primeiramente apareceu, a partir do mês de maio e tanto nas ostras do local A como do local C, este parasita, apenas foi observado no mês de julho.

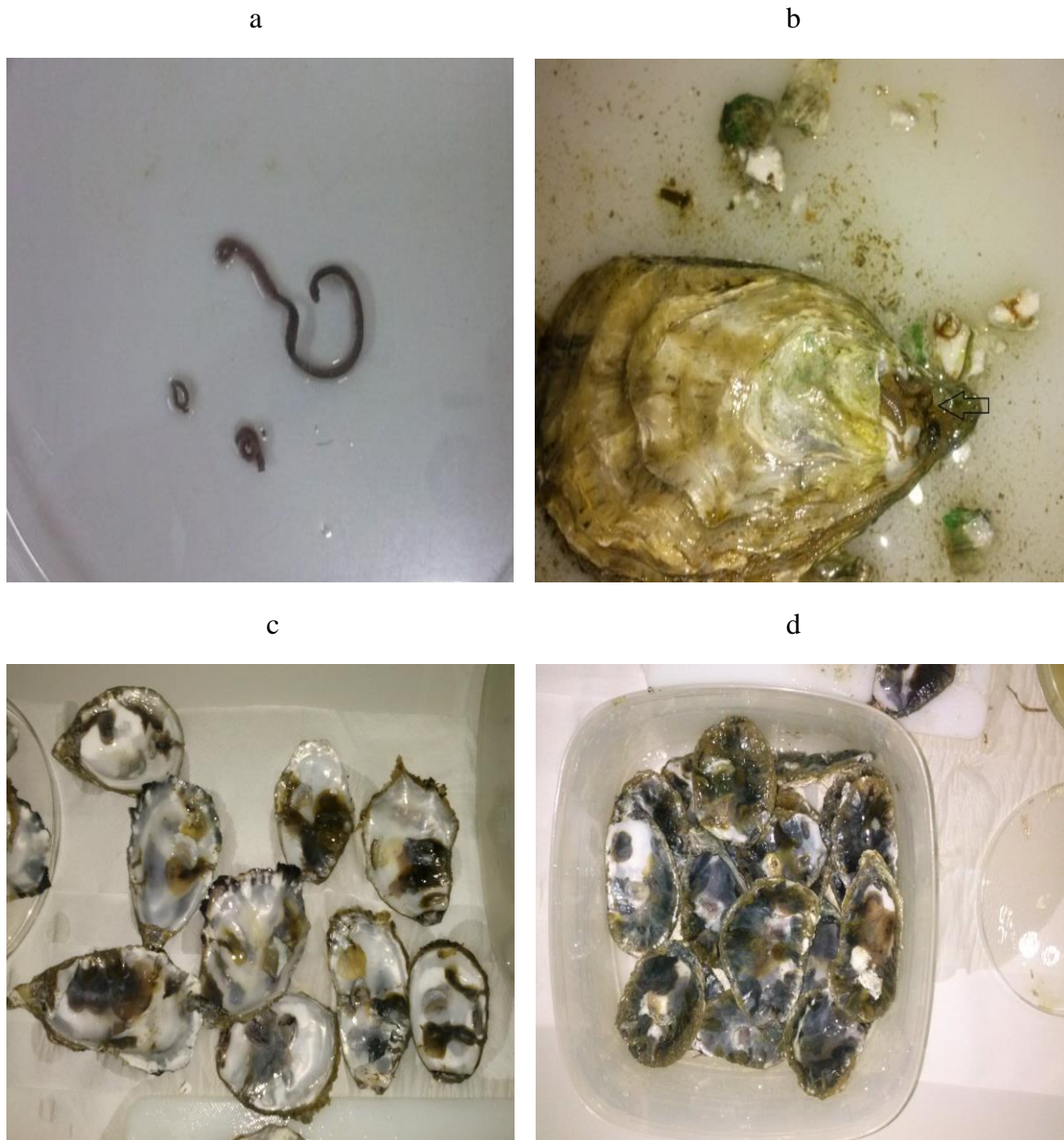


Figura 17 - *Polydora* spp. (a). Ostra colhida no local A com *Polydora* spp no interior da concha. (b). Bolhas de lama no interior das ostras afetadas com *Polydora* spp, observada nas ostras do local A em julho (c e d).

Tabela 4 - Observação da presença (+) ou ausência (-) de *Polydora* spp. ou escavações feitas pela mesma nas conchas das ostras nos três locais do estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Mês	A	B	C
fevereiro	-	-	-
março	-	-	-
abril	-	-	-
maio	-	+	-
junho	-	+	-
julho	+	+	+

5.3. Mortalidade

A maior taxa de mortalidade das ostras registada foi no local A, B e C, com 10,4 %, 2,4 % e 8 % respetivamente (Fig. 18).

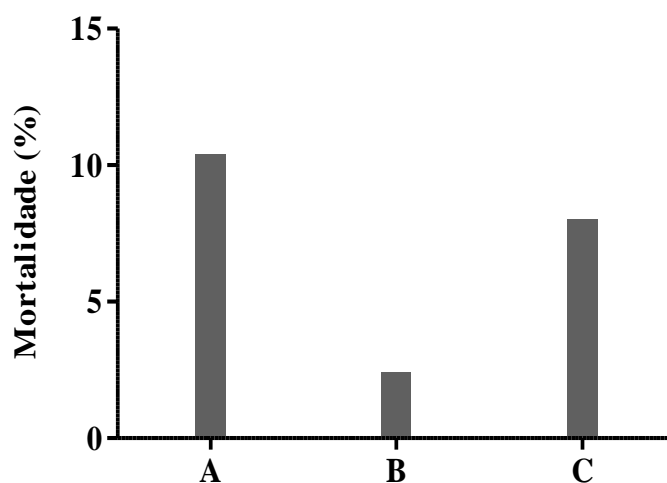


Figura 18 – Mortalidade das ostras *Crassostrea gigas* observada nos três locais ao longo do estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

5.4. Histologia

Para o estudo histológico das ostras, começamos por proceder à sua classificação, consoante o seu estado de maturação. Após observação ao microscópio as ostras de cada local foram classificadas em 3 estados de maturação (Fig. 19).

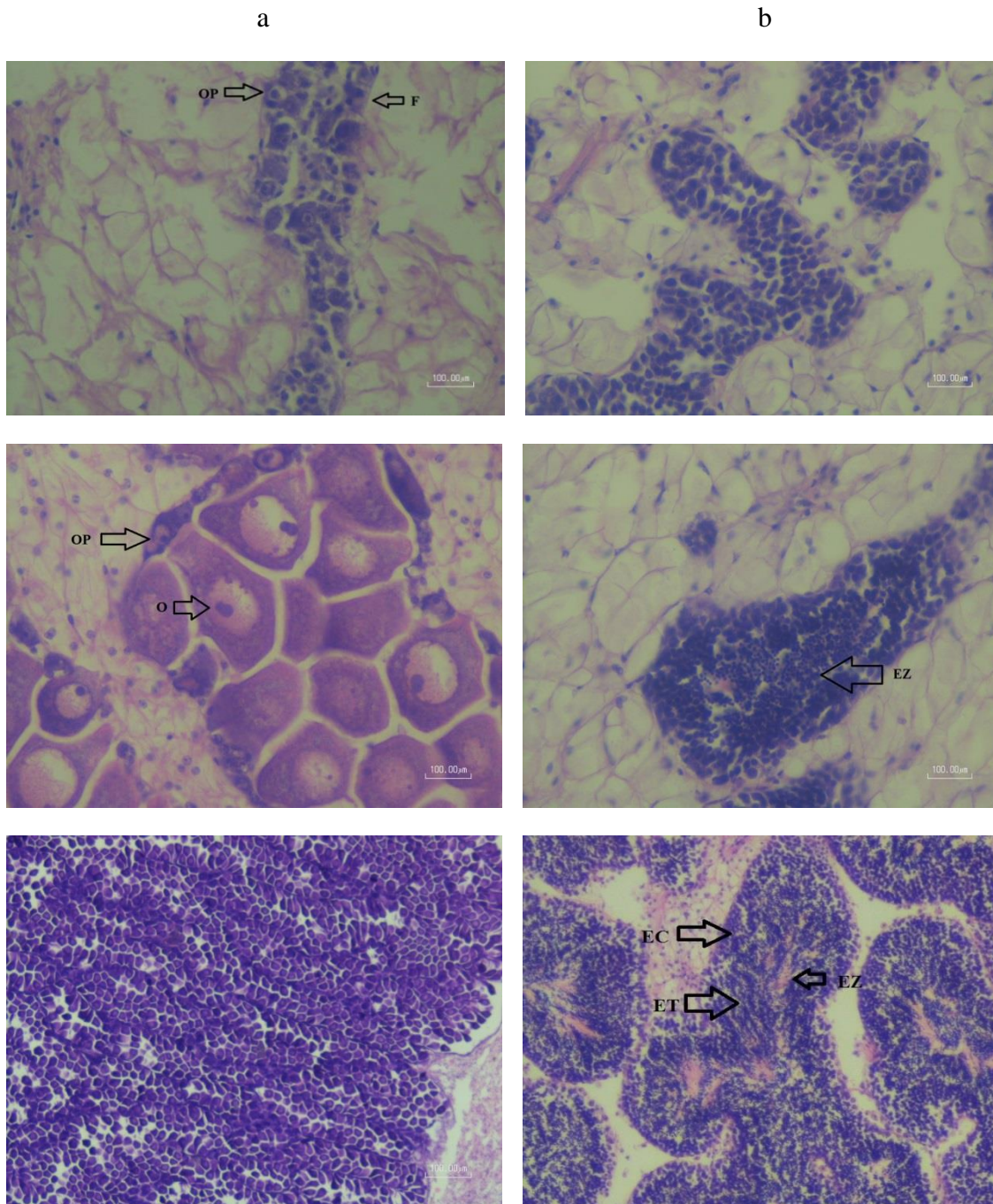


Figura 19 – Os três estados de maturação das ostras *Crassostrea gigas*, fêmeas (a) e machos (b), observados nos três locais do estudo. De cima para baixo corresponde ao estado de maturação 1, 2 e 3. OP – Oócito primário, O – Oócito, F – Folículo, EZ – Espermatozoides, ET – Espermatídios, EC – Espermatócitos.

De acordo com esta classificação dos estados de maturação das ostras de cada local do estudo, elaborou-se a Fig. 20.

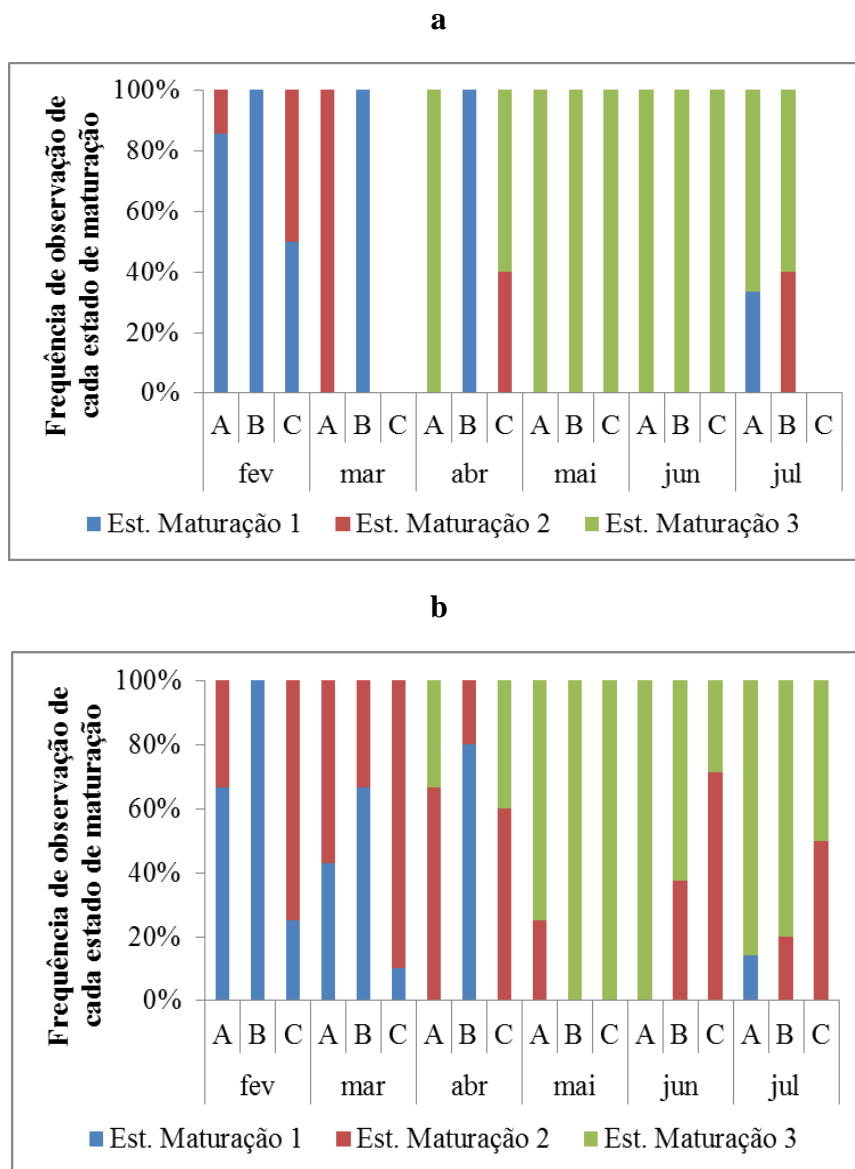


Figura 20 – Frequência de observação dos três estados de maturação observados nos três locais do estudo. (a) Machos e (b) Fêmeas. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Relativamente a relação entre machos e fêmeas observados, verificou-se no total uma ocorrência de 35,56% de machos e 64,44% de fêmeas.

As ostras no local C começaram a gametogénese primeiro que as dos restantes locais, uma vez que em fevereiro a maioria dos exemplares observados, apresentavam alguns gâmetas maduros (estado de maturação 2). No local A também se observou em fevereiro algumas ostras no estado de maturação 2, embora e menor número do que no local A, sendo que março a ocorrência de gâmetas maduros aumentou. Por outro lado no local B, em março já se

observou ostras no estado de maturação 2, no entanto só em abril a sua incidência aumentou. A partir de maio a maioria das ostras já se encontravam no estado de maturação 3. Podemos verificar que os machos atingiram a maturidade primeiro que as fêmeas.

5.5. Microbiologia

Os valores microbiológicos, como a quantidade de *E. coli* (Fig. 21-A) e de coliformes totais (Fig. 21-B), dão-nos indicação sobre estatuto sanitário do local onde são produzidas as ostras. Observando os valores correspondentes a *E. coli*, podemos observar que antes das ostras serem divididas pelos três locais do estudo (T0), os valores registados nas análises foram de 230 (MPN) *E. coli*/100g de carne e líquido intervalvar, ou seja, o seu estatuto sanitário correspondia a um estatuto A.

No decorrer do período de amostragem podemos observar que, as ostras do local C apresentaram concentrações mais altas que as observadas nos outros 2 locais, com o valor máximo no mês de fevereiro (10950 (MPN) *E. coli*/ 100g de carne e líquido intervalvar), Para os outros dois locais, os valores foram sempre baixos, com a exceção do mês de abril onde houve um pico que atingiu valores de 125 (MPN) *E. coli*/ 100g de carne e líquido intervalvar, no local A e 130 *E. coli*/100g de carne e líquido intervalvar, no local B.

Fazendo a média dos valores registados ao longo dos seis meses, a nível de *E. coli*, podemos observar que tanto as ostras do local A como do B, apresentaram valores correspondentes a um estatuto sanitário A, com médias de 46,67 e 38,33 (MPN) *E. coli*/100 g de carne e líquido intervalvar, respetivamente. Por sua vez, no local C, observou-se um valor médio de 3287,50 (MPN) *E. coli*/100 g de carne e líquido intervalvar, correspondendo ao estatuto sanitário B.

Relativamente aos valores dos coliformes totais, as ostras do local C também apresentaram valores superiores às dos outros dois locais, com o máximo a ser no mês de fevereiro (54 000 (MPN) coliformes totais/100g de carne e líquido intervalvar). Nos outros dois locais os valores foram substancialmente mais baixos, tendo o seu valor máximo sido registado em abril, no local A (1045 (MPN) coliformes totais/ 100g de carne e líquido intervalvar) e em maio, no local B (530 (MPN) coliformes totais/100g de carne e líquido intervalvar).

Os valores médios registados para os coliformes totais, para os seis meses, das ostras distribuídas pelo local A, B e C, foram de 327,50, 286,08, e 15063,33 (MPN) coliformes totais/100 g de carne e líquido intervalvar, respetivamente.

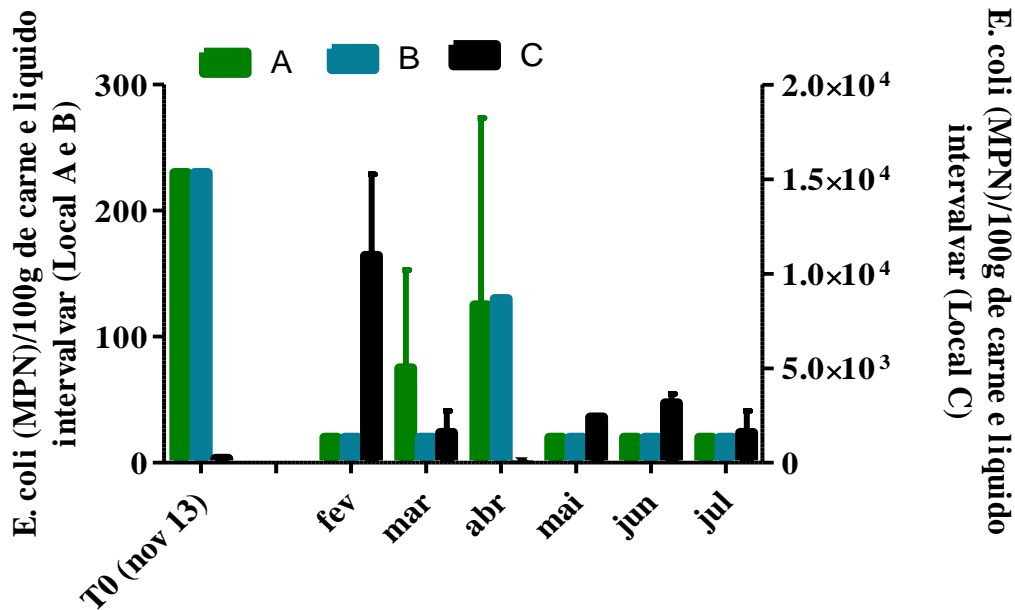


Figura 21-A - Registo mensal médio de *Escherichia coli* em *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

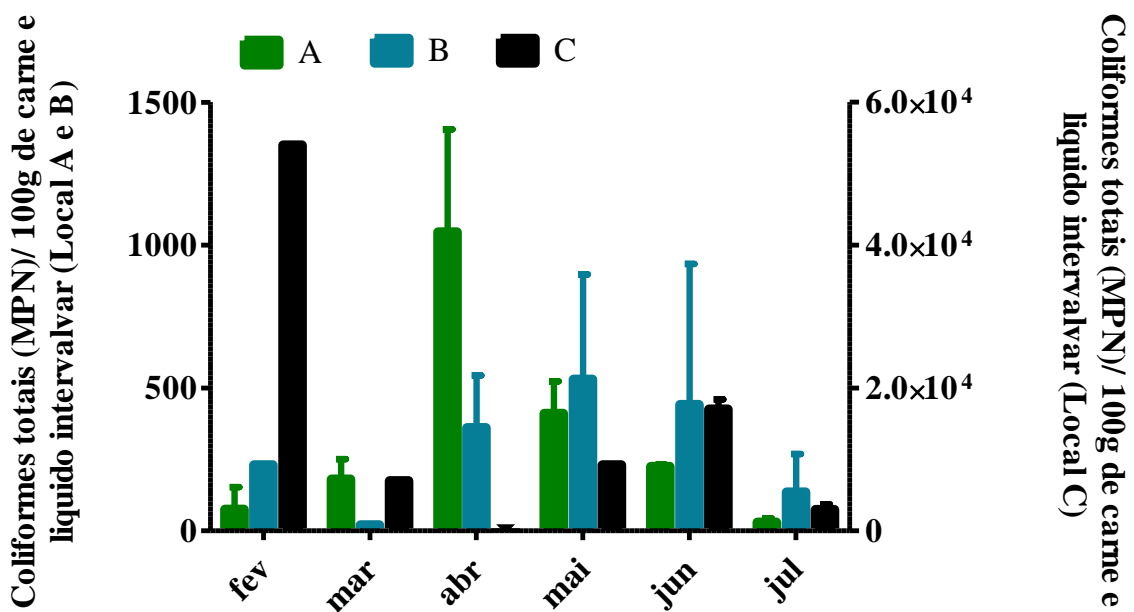


Figura 21-B - Registo mensal médio dos coliformes totais em *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Comparando as diferenças dos valores de *E. coli*, verificamos que estas são estatisticamente significativas ($p < 0,0014$) não só entre os três locais, como ao longo do tempo ($p = 0,0012$). Também se observou uma interação entre os fatores ($p = 0,0003$).

Após a realização do pós-teste, este demonstrou que, entre o local A e B, estas diferenças não foram significativas em nenhum dos meses mas que ambos diferiram do local C no mês de fevereiro.

Relativamente aos resultados da enumeração de coliformes totais também foi observada uma diferença estatística entre os locais do estudo ($p < 0,0001$), ao longo do tempo ($p < 0,0001$) e que houve interação significativa entre os fatores ($p < 0,0001$). Os resultados das amostras do local C só não foram estatisticamente diferentes do local A e B no mês de abril, e entre os locais A e B as amostragens não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos meses.

No que se refere a *Vibrio* spp., os valores registados ao longo dos 6 meses, como se observa na Fig. 22, os valores são superiores nas ostras do local A, com exceção apenas para os meses de fevereiro e maio. Neste local a média registada foi de $1,25 \times 10^4$ ufc/g. Depois foi no local B que as ostras registaram maiores valores de *Vibrio* spp. com uma média registada de $7,80 \times 10^3$ ufc/g. E por último o local C, foi onde as ostras apresentaram valores menores de *Vibrio* spp., com uma média de $3,82 \times 10^3$ ufc/g.

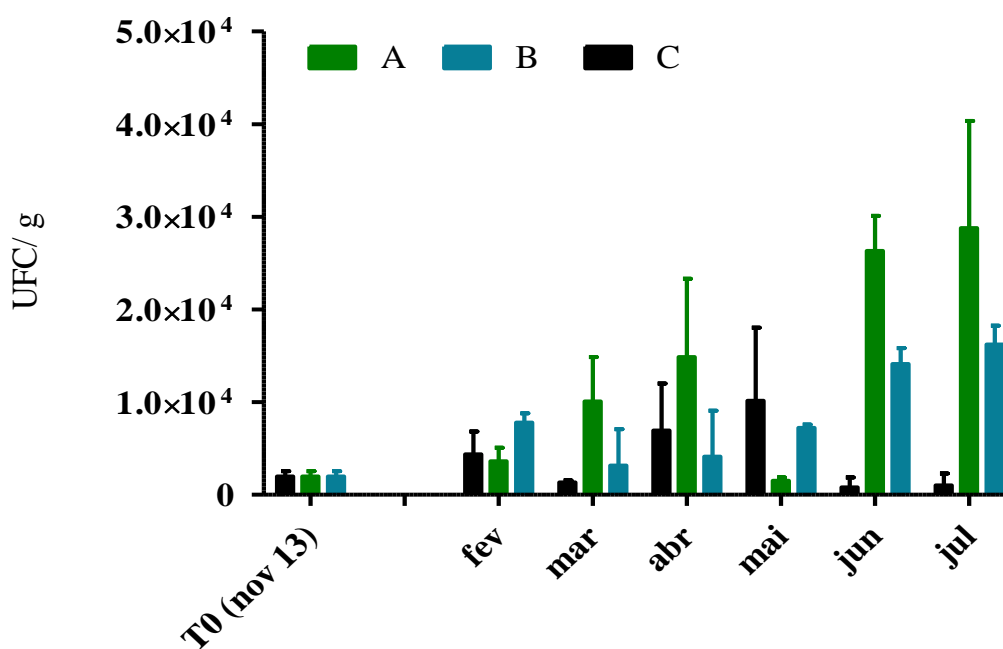


Figura 22 - Registo mensal médio de *Vibrio* spp. em *Crassostrea gigas* ao longo do estudo nos três locais. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Verificaram-se diferenças estatísticas, para os valores de *Vibrio* spp., entre as amostras dos diferentes locais ($p=0,0002$), ao longo do tempo ($p=0,0001$) e uma interação significativa entre estes dois fatores ($p < 0,0001$). Através do teste de Bonferroni foi possível observar que os resultados dos locais A, B e C foram todos diferentes entre si nos meses de junho e julho.

Em síntese, relativamente à análise microbiológica, no local C, observaram-se valores de *E. coli* e de coliformes totais bastante superiores aos dos outros dois locais, cujos valores foram semelhantes. No que se refere a *Vibrio* spp., foram nas ostras do local A que se registaram valores mais elevados.

5.6. Dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água

Considerando que as condições climáticas podem influenciar o estatuto sanitário dos bivalves, neste caso, das ostras, foram registadas os valores da precipitação na estação do Patacão em Faro (Fig. 23) e da energia solar (Fig. 24).

Como se observa, nos meses de fevereiro e abril registou-se a maior precipitação do período em que se realizou o ensaio. Relativamente à energia solar esta foi aumentando progressivamente à medida que se caminhava para o fim do inverno e início da primavera e verão, tendo-se mantido mais ou menos estável nos meses desta estação do ano.

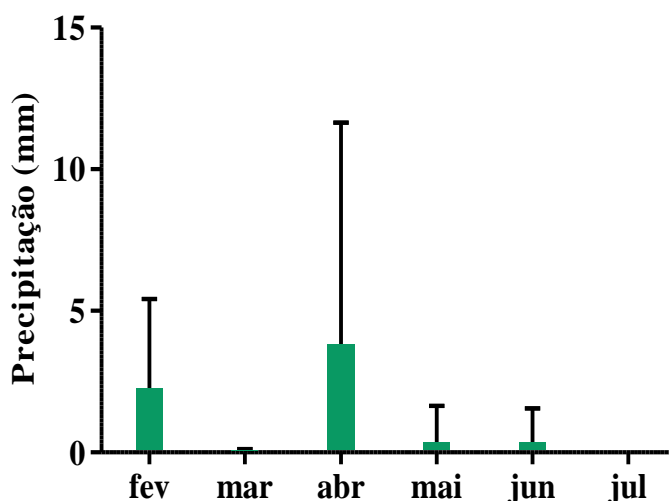


Figura 23 – Valores de precipitação, obtidos através da média dos valores de precipitação registados 15 dias antes das amostras de cada mês na estação do Patacão/Faro.

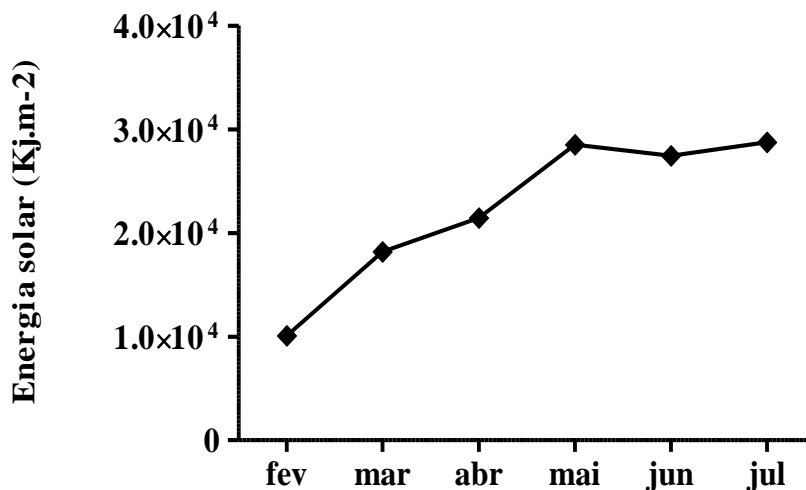


Figura 24 – Valores da energia solar acumulada diariamente em K.J.m⁻² proveniente da medição da radiação solar global em W.m⁻² na estação do Patacão/Faro.

Relativamente aos dados químicos da água das três aquaculturas, foram registados a temperatura e salinidade, sendo que esta última não foi registada no local A (Fig. 25 e Fig. 26).

Como se observa as temperaturas da água oscilaram entre 13,6° C e 25,3° C. No local A e C a temperatura foi sempre aumentando progressivamente, de acordo com o que seria de esperar com a época do ano. No local B, pelo contrário, observou-se uma inflexão desta curva entre os meses de abril e maio.

Desta análise verifica-se que, em média, foi no local A, que se registou uma temperatura média ligeiramente superior (20,80 ± 4,35 °C), em relação ao local B (19,83 ± 2,40 °C) e ao local C (18,67 ± 3,49 °C).

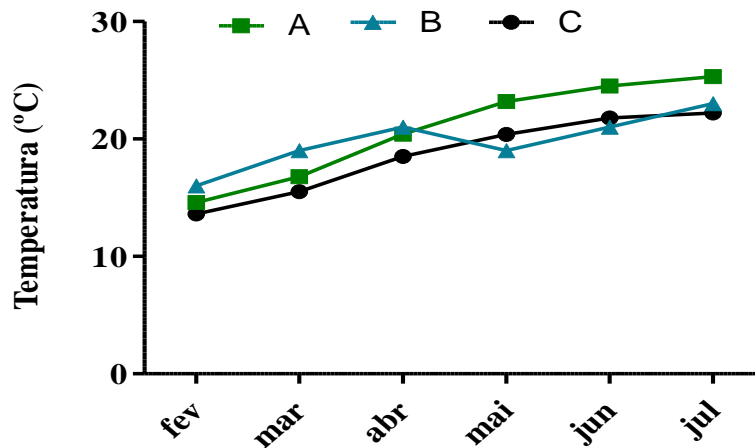


Figura 25 – Registo da temperatura média da água dos três locais ao longo do estudo. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

No que se refere à salinidade, o local B apresentou níveis de salinidade bastante superiores (entre 37 e 38 psu) mas mais estáveis que o local C (entre 20 e 30 psu), onde estes valores apresentaram grandes oscilações de salinidade das suas águas.

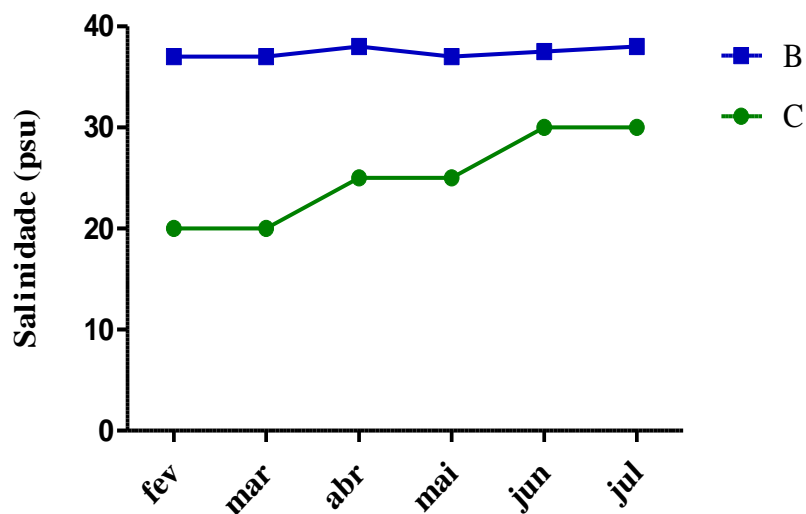


Figura 26 – Valores registados mensalmente da salinidade para os locais B e C ao longo do estudo. B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal de Castro Marim.

Comparando as amostras estatisticamente, verifica-se que os valores de temperatura não são significativamente diferente nos três locais do estudo ($p < 0,5831$). Relativamente à salinidade, nos locais em que foi avaliada (B e C), são estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$).

5.7. Correlação entre os dados microbiológicos e os dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água

Foram realizadas testes de correlação estatística entre os valores obtidos nas amostragens microbiológicas e os dados climáticos e os parâmetros físico-químicos da água originando o tabela 5.

Tabela 5- Correlação entre as análises microbiológicas nos três locais do estudo e os dados climáticos e parâmetros físico-químicos da água, (a) *E. coli*, (b) Coliformes totais e (c) *Vibrio* spp.. A- Cultivo multitrófico, B- Monocultivo, Ria Formosa, C- Monocultivo, Sapal Castro Marim. (*) Correlação estatisticamente significativa.

a

Local		Precipitação	Temperatura	Salinidade	E. solar	<i>Vibrio</i> spp.
A	P value	0,172	0,6035	-----	0,7003	0,9092
	R de Pearson	0,639	-0,271	-----	-0,2026	-0,0606
B	P value	0,0362*	0,6497	0,2262	0,9063	0,3947
	R de Pearson	0,8402*	0,238	0,5813	-0,0626	-0,4300
C	P value	0,8332	0,2422	0,3703	0,1697	0,8608
	R de Pearson	0,1116	-0,5655	-0,4502	-0,6415	0,0931

b

Local		Precipitação	Temperatura	Salinidade	E. solar	<i>Vibrio</i> spp.
A	P value	0,0965	0,9344	-----	0,8756	0,8012
	R de Pearson	0,7343	0,0438	-----	0,0831	-0,1333
B	P value	0,7174	0,9854	0,9983	0,3964	0,8441
	R de Pearson	0,1907	0,0098	0,0011	0,4286	0,1043
C	P value	0,7142	0,1883	0,358	0,1026	0,9428
	R de Pearson	0,1929	-0,6209	-0,4606	-0,7256	-0,0382

c

Local		Precipitação	Temperatura	Salinidade	E. solar
A	P value	0,6389	0,1584	-----	0,2808
	R de Pearson	-0,2457	0,6545	-----	0,5288
B	P value	0,363	0,2735	0,4078	0,2743
	R de Pearson	-0,4564	0,5355	0,4194	0,5347
C	P value	0,4256	0,922	0,6694	0,9217
	R de Pearson	0,4051	-0,0520	-0,2242	0,0522

Relativamente a *E. coli* podemos observar que o único local em que se observou correlação estatisticamente significativa foi no local B em relação à precipitação ($p=0,0362$), observando-se uma correlação positiva entre a concentração de *E. coli* e a precipitação. Para o local A embora esta correlação não tenha sido estatisticamente significativa, podemos ver pelo valor elevado de R de Pearson (0,639) que parece haver também alguma correlação positiva em relação à precipitação. No local C podemos ainda ver um valor de R alto (-0,6415) observado para a correlação entre a concentração de *E. coli* e os valores registados da energia solar indicando uma correlação negativa entre estes dois valores, não sendo esta suficiente para ser comprovada estatisticamente.

Quanto aos valores de coliformes totais, podemos observar no local A um valor de R elevado (0,7343) relativamente à concentração destes microrganismos e os valores registados de precipitação. Embora esta correlação positiva aparente existir, não é suficiente para ser estatisticamente significativa. Para o local C podemos observar dois valores de R de Pearson elevados relativamente à correlação entre a concentração de coliformes totais e a temperatura (-0,6209). Entre os coliformes totais e a energia solar (-0,7256), existe correlação negativa entre a concentração destes microrganismos e os dados climáticos e os parâmetros físico-químicos da água, não sendo esta estatisticamente significativa.

Por último, relativamente à concentração de *Vibrio* spp., tanto para o local A como para o local B, as correlações não são estatisticamente significativas. Os valores de R de Pearson observados em A (0,6545) e em B (0,5355) relativos à comparação da concentração destes microrganismos e os valores de temperatura, parece existir alguma correlação (positiva) entre estes. Para o local B ainda podemos ver um valor de R elevado (0,5347) para a relação entre a concentração de *Vibrio* spp. e a energia solar, indicando alguma correlação positiva, não sendo no entanto suficiente para que esta fosse estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

Biometria

As ostras produzidas em cultura integrada com os peixes, local A, apresentaram em geral maiores índices biométricos do que as ostras cultivadas nas outras duas aquaculturas, à exceção do índice de AFNOR, onde apresentou o menor índice dos três locais em análise no final do ensaio.

O crescimento das ostras pode ser afetado por diversos parâmetros como salinidade, temperatura, disponibilidade e qualidade de alimento, embora a ostra *C. gigas* se caracterize por resistir a grandes flutuações destes parâmetros ambientais (Orban *et al.*, 2004).

À semelhança do que acontece com os moluscos em geral, a *C. gigas*, é filtradora e regula a quantidade de alimento ingerido adaptando o seu ritmo de filtração em função da concentração de alimento disponível (Sara & Mazzola, 1997). Ambos os fatores, quantidade e qualidade de alimento são determinantes para o seu crescimento (Ruiz *et al.*, 1990; Sara & Mazzola, 1997). Falcão *et al.* (2000) revelou que a Ria Formosa apresenta uma elevada abundância de fitoplâncton e de matéria detritica em suspensão, sendo este uma das razões para as elevadas taxas de crescimento em amêijoas.

Na Ria Formosa, as concentrações de clorofila a são normalmente elevadas durante todo o verão (Newton & Mudge, 2003; Brito *et al.*, 2009), sendo que as ostras desta ria parecem tirar partido destas condições favoráveis de disponibilidade de alimento e temperatura durante o verão apresentando elevadas taxas de crescimento (Cardoso *et al.*, 2013). Na costa portuguesa ocorre um afloramento (*upwelling*), na primavera e com menor intensidade no outono (Ferreira, 2003), o que provavelmente leva a esta grande disponibilidade de alimento.

Dos três lugares do estudo, o local A e B recebem água da Ria Formosa enquanto o local C (sapal de Castro Marim) recebe água do Rio Guadiana. Tendo isto em conta, o alimento disponível poderá ser um dos fatores que levou as ostras do local A a apresentarem um maior crescimento que nos restantes locais do ensaio, nomeadamente com o local B, uma vez que tem a mesma fonte de entrada de água (Ria Formosa). Nesta produção, o cultivo integrado

com os peixes poderá ser a causa da maior produtividade, pois para além do alimento disponível na coluna de água, as ostras provavelmente aproveitam também os restos de ração da alimentação fornecida aos peixes, que não existem nos outros dois locais.

Os parâmetros físico-químicos da água também são muito importantes para o crescimento destes bivalves. Segundo um documento da FAO, (2005), as ostras da espécie *C. gigas* apresentam maiores crescimentos com temperaturas entre os 15-25°C e com salinidades entre os 25-32 psu, atingindo o tamanho de mercado (70-100g) entre 18 a 30 meses. A temperatura da água registada nos três locais apresenta-se, a partir do mês de março, no intervalo ótimo para o crescimento das ostras. Em fevereiro verificou-se o mínimo da temperatura da água no local C com 13,6°C, sendo que também o local A apresentou uma temperatura ligeiramente abaixo da ótima com 14,6°C. A partir do mês de março as temperatura da água encontram-se dentro do intervalo médio sendo a temperatura máxima registada no local A no mês de julho com 25,3°C.

No entanto, relativamente à salinidade, observamos que no local B, esta foi em média 37 psu, ou seja, acima do intervalo médio ótimo da espécie. Embora não tenhamos os dados da salinidade do local A, Falcão *et al.* (1992), diz que a salinidade da Ria Formosa se encontra entre os 35,5 psu e os 36,6 psu, com a exceção dos períodos de chuva intensa, onde pode chegar aos 30 psu. Assim sendo podemos presumir que a salinidade neste lugar será mais próxima dos valores do local B do que dos valores do local C. Logo, este poderá ser um dos fatores que levou as ostras a apresentarem, no local B, a um menor crescimento que nos outros dois locais, pois o local C apresenta valores de salinidade dentro do intervalo ótimo para o crescimento desta espécie, a exceção do mês de fevereiro e março (20 psu), estando um pouco abaixo do mínimo indicado como ótimo (25 psu). No local A o crescimento poderá não ser tão afetado por esta variante devido à provável maior disponibilidade de alimento resultante da comida fornecida aos peixes. Outro fator que pode ter influenciado o crescimento das ostras, no local B, pode ter sido o aparecimento mais cedo de *Polydora* spp.. Enquanto no local A e C este parasita só apareceu no mês de julho, no local B, este apareceu no mês de maio. Segundo Korringa (1976), *Polydora* spp. não provoca grandes mortalidades nas ostras, contudo, as ostras afetadas por este parasita despedem muita energia a produzir concha na zona afetada, para formar bolhas de lama para se protegerem. Isto afeta a taxa de crescimento, bem como o valor comercial deste animal. Kent (1979), que estudou o efeito de infestações deste parasita em mexilhões (*Mytilos edulis*), verificou que com o aumento do parasita, neste caso *Polydora ciliata*, há um aumento de quantidade de água no interior do mexilhão e

consequentemente uma redução da quantidade de carne. Este facto pode explicar a queda do índice de AFNOR nos três locais do ensaio. No local B, a partir de maio, começou-se a observar as primeiras provas da presença deste parasita, sendo que neste mês o seu efeito ainda não se iria notar, pois este índice atingiu o seu máximo (18,86%). Posteriormente houve uma queda na percentagem de carne nas ostras, após o mês de maio, que coincide com o aparecimento deste parasita. Isto também foi observado no local A, no mês de julho, com o aparecimento de *Polydora* spp. e uma queda acentuada na percentagem de carne das ostras. As ostras do local C também sofreram uma queda da percentagem de carne no mês de julho, embora em menor escala.

Com o aumento de competitividade entre as empresas de aquacultura, a produção de produtos de alta qualidade torna-se essencial, sendo necessário evitar surtos de parasitas como *Polydora* spp. que reduzem o valor e qualidade dos produtos. Observando as ostras após os meses em que foram infetadas, constata-se o impacto negativo que estas espécies têm nas ostras, reduzindo a quantidade de carne por concha (Índice de AFNOR) e o próprio aspeto das ostras, observando-se as conchas perfuradas e as bolhas de lama no seu interior tornando as mesmas muito menos apelativas.

Estado de maturação das ostras

Nas ostras da espécie *C. gigas*, segundo a FAO (2005), a gametogénese começa com temperaturas à volta dos 10° C e com salinidades entre os 15 e os 32 psu, sendo que raramente é completada com salinidades superiores. A desova geralmente ocorre com temperaturas superiores a 20° C, sendo a temperatura ótima entre os 20 e 25°C (Mann *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1997) e raramente a temperaturas entre os 15 e 18° C. Os machos atingem, normalmente, a maturação sexual primeiro. Em áreas com abundância de alimento disponível, o *sex ratio* das ostras mais velhas demonstram predominância de fêmeas em relação aos machos, acontecendo o contrário em situações de alimento escasso. As fêmeas podem mudar de sexo, quando existe uma situação de sobrelotação de uma determinada área, limitando a disponibilidade do alimento. Assim sendo, isto pode explicar a diferença entre machos (35,56%) e fêmeas (64,44%) encontradas na amostragem, uma vez que a Ria Formosa é uma zona com boa disponibilidade de alimento. Também é possível verificar que os machos têm a tendência a apresentar estados de maturação das gónadas mais avançados do que as fêmeas.

Observamos que as ostras do local C começaram a gametogénese primeiro, já se observando em fevereiro ostras maioritariamente no estado de maturação 2. Relacionando este facto com a temperatura da água e a salinidade dos 3 locais do estudo vemos que estes, desde o início, tinham temperaturas acima dos 10° C, temperatura necessária para o início da gametogénese, mas o local C tinha níveis de salinidade inferiores ao local B e mais próximos dos valores dos ótimos para a gametogénese. Por outro lado, no local B, a salinidade encontrava-se com valores acima dos ótimos para a gametogénese das ostras da espécie *C. gigas*, podendo ter contribuído para o atraso do desenvolvimento sexual das ostras neste local. Relativamente ao local A, o desenvolvimento sexual das gonadas das ostras foi mais rápido ao observado no local B, mas mais lento que o registado no local C. Considerando que, embora não tenha sido possível obter os dados para a salinidade neste local, mas que provavelmente estes serão próximos dos valores do local B, devido ao facto de ambas as aquaculturas se encontrarem na Ria Formosa, os níveis de salinidade poderão ser um dos fatores a influenciar a maturação sexual. No entanto a possível maior disponibilidade de alimento neste local poderá ter levado a sua gametogénese a ser ligeiramente mais rápida no local A do que no local B.

A partir do mês de maio praticamente todas as ostras apresentaram o estado de maturação 3. Isto provavelmente deve-se ao facto de a temperatura, nos três locais do estudo, no mês de maio já se apresentar próxima, ou mesmo acima dos 20° C necessário para a desova nesta espécie.

Os dados obtidos neste estudo vão de encontro aos observados por Cardoso *et al.* (2013) na Ria Formosa, onde observaram que a percentagem de indivíduos com gónadas desenvolvidas na primavera e verão era maior em contraste com o outono e inverno. Cardoso *et al.* (2007 e 2013), também observaram o início da gametogénese com o aumento da temperatura e que a desova se inicia no final do verão, onde as temperaturas atingem valores máximos. Resultados semelhantes foram observados por Rene *et al.* (2003), que verificaram que o pico de desenvolvimento das gónadas é atingido no verão. Cardoso *et al.* (2013) verificou também que o facto de se observar ostras selvagens na Ria Formosa, indica que as condições nesta, são favoráveis para o crescimento e reprodução das ostras da espécie *C. gigas*.

Microbiologia

O estatuto sanitário da Ria Formosa tem vindo a melhorar ao longo dos anos como demonstraram Almeida & Soares (2012). Estes autores verificaram que, nos anos 90,

nomeadamente em 1994, apenas 54 % dos efluentes da zona sul portuguesa eram enviados para centrais de tratamento de esgotos, sendo o resto libertado diretamente para as águas da ria sem qualquer tipo de tratamento (Mudge & Bebianno, 1997; PROT-Algarve, 2002; Cachola & Campos, 2006). No entanto, a partir do ano 2000, houve uma tendência para a diminuição da contaminação, nomeadamente a partir do ano 2002, onde já cerca de 83 % da população sul portuguesa era servida por centrais de tratamento de esgotos.

A contaminação microbiológica é um dos fatores mais importante a influenciar a qualidade das áreas de produção de bivalves (Almeida & Soares 2012). Isto porque os bivalves alimentam-se através da filtração da água, concentrando pequenas partículas incluindo microrganismos (Younger *et al.*, 2003).

Neste estudo observamos que os picos de *E. coli*, registados nos três locais, correspondem aos picos da precipitação registados 15 dias antes de cada amostragem. Tanto o local A como o local B apresentaram os maiores valores no mês de abril, correspondendo ao maior pico de precipitação registado durante os seis meses do estudo. Relativamente ao local C, este apresentou os maiores valores para esta bactéria no mês de fevereiro, correspondendo ao segundo valor mais alto registado de precipitação durante o período da amostragem.

Os valores obtidos neste estudo foram semelhantes aos que encontrados por Anacleto *et al.* (2013), que realizaram uma análise da contaminação microbiológica de moluscos nativos e exóticos do estuário do Tejo. Estes autores observaram uma maior concentração de *E. coli* nos meses de inverno em comparação com os meses de verão. Observaram também, à semelhança do presente estudo, uma variação de *E. coli* nas amostras classificadas entre os estatutos A, B e C. Resultados semelhantes foram igualmente observados por Almeida & Soares (2012), em estudos onde as concentrações de *E. coli* foram normalmente maiores durante o período de outono e inverno e menores no período de primavera e verão. Segundo Younger *et al.* (2003), estas variações derivam de vários fatores, atuando isoladamente ou em conjunto. Incluindo: variações na atividade biológica dos organismos, oscilações na descarga de efluentes e as tendências sazonais de precipitação, temperatura, salinidade, oxigénio. Existem diversos estudos que demonstram que as taxas de sobrevivência e desenvolvimento de bactérias nas massas de água podem ser afetadas por fatores abióticos como a exposição à luz solar (Fujioka *et al.*, 1981), temperatura (Rowse & Fleet, 1984), salinidade (Anderson *et al.*, 1979), pH (Solic & Krstulovic, 1992), precipitação (Ackerman & Weisberg, 2003), presença de nutrientes orgânicos e inorgânicos (Rheinheimer, 1992; Dionísio *et al.*, 2000) e sedimentação

(Rozen & Belkin, 2001). Entre estes fatores, a precipitação é um dos mais relevantes podendo levar a uma queda de até duas classes de classificação de contaminação (Pedro *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008). Isto deve-se ao facto de as chuvas provocarem um escoamento das águas, transportando uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos que desaguam no litoral. Esta pode levar ao escoamento de áreas contaminadas, a descargas de águas não tratadas ou parcialmente tratado pelas centrais de tratamento de águas e outras descargas intermitentes (Kay *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2003). Além disso, a eficácia das estações de tratamento pode também ser reduzida devido às elevadas taxas de fluxo durante períodos de chuvas intensas (Ackerman & Weisberg, 2003; Younger *et al.*, 2003). Através das análises de correlação podemos observar a influência que este parâmetro abiótico (precipitação) tem na concentração de *E. coli* nas ostras. Nomeadamente, no local B verificou-se uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a concentração de *E. coli* e a precipitação. Nos outros dois locais embora a correlação não seja estatisticamente comprovada, podemos ver pelos valores de R de Pearson de 0,639 para o local A e 0,1116 para o local C.

Outro fator que influencia as concentrações de *E. coli* na coluna de água é a luz (radiação solar), sendo inclusive considerado por alguns autores (Gameson *et al.*, 1975, Chamberlin *et al.*, 1978, Fujioka *et al.*, 1981 e Sinton *et al.*, 1994) como o fator mais importante para a morte bacteriana no mar, particularmente em zonas lagunares pouco profundas (Almeida & Soares, 2012). O efeito deste fator é proporcional à intensidade e período de radiação (Alkan *et al.*, 1995; Cornax *et al.*, 1990; Fujioka *et al.*, 1981; McCambridge & McMeekin, 1981; Rowse & Fleet, 1984; Rozen & Belkin, 2001; Solic & Krstulovic, 1992). As correlações observadas nos três locais do estudo, entre as variáveis energia solar e concentração de *E. coli*, embora não tenham sido significativamente demonstradas, os valores de R de Pearson observados, foram negativos nos três locais (-0,2026 local A, -0,0626 Local B e -0,6415 no local C) indicando correlação negativa entre estas duas variáveis. A Ria Formosa, durante a primavera e verão, apresenta um longo período de exposição à luz solar, o que pode explicar a diminuição de contaminação fecal durante estas épocas (Dionísio *et al.*, 2000).

A salinidade, outro fator abiótico importante no desenvolvimento de microrganismos, apresentando maiores taxas de sobrevivência, em menores salinidades (Anderson *et al.*, 1979). Pelos valores de correlação para o local C, podemos observar uma correlação negativa entre a concentração de *E. coli* e a salinidade, embora a significância da correlação não tenha sido estatisticamente demonstrada (R -0,4502).

Além disso, a salinidade aumenta a sensibilidade de *E. coli* à luz solar (Rowse & Fleet, 1984; Rozen & Belkin, 2001). Este fator pode explicar os menores valores destes microrganismos no local B em comparação com local C, visto a salinidade registada no primeiro ser muito superior à do segundo. No que se refere ao local A, embora a salinidade não seja avaliada, esta piscicultura encontra-se na Ria Formosa, sendo provável que tenha valores de salinidade semelhantes à registada no local B, podendo assim explicar os valores menores de *E. coli* e coliformes totais observados neste local. Tanto o local A como o B estão mais próximos da costa que o local C, estando assim sob a influenciada de águas costeiras enquanto o ponto C, encontra-se numa zona mais sob a influenciada de águas fluviais provenientes do Rio Guadiana.

A temperatura é outro fator importante no desenvolvimento destas bactérias, que vivem no interior do sistema digestivo dos animais homeotérmicos a 37°C, sofrendo assim um choque ao entrar em contato com a água do mar. No entanto, a temperatura ótima para a sobrevivência não é necessariamente a mesma para o seu crescimento. Na verdade, a maioria dos relatórios indicam maior estabilidade de *E. coli* a temperaturas mais baixas, embora outras mudanças ambientais possam contribuir para sobrevivência bacteriana, como foi constatado por Rozen & Belkin (2001) e por nós, no presente estudo. A sobrevivência bacteriana foi maior a temperaturas mais baixas. Contudo, com o aumento da temperatura da água, não se verificou um aumento da concentração de microrganismos nos bivalves. Excetuando o local B, os valores de R de Pearson observados, para os locais A e C, indicam correlação negativa, estatisticamente não significativa (-0,271 e -0,5655 respetivamente).

Estes resultados poderão estar associados assim, não só ao aumento da temperatura, mas também ao aumento da exposição dos microrganismos a outros fatores abióticos como uma maior radiação solar, maior salinidade e menor precipitação associados ao período da primavera/verão.

No caso do local A poderá haver ainda outros dois fatores a influenciar os valores obtidos de *E. coli* e coliformes totais, relacionado com a sedimentação e tempo de sobrevivência desta bactéria. Como verificaram Sonier *et al.* (2008), as concentrações de *E. coli* nos sedimentos podem ser até 10 vezes maiores do que na coluna da água. A explicação será a de que os sedimentos fornecem um ambiente mais estável. Por outro lado, vários estudos (Labelle *et al.*, 1980; Marino & Gannon, 1991; Young-Joo *et al.*, 2002) constataram que, em ambiente marinho, esta bactéria pode sobreviver entre 65 e 80 dias, em partículas de areia vs 3-5 dias

em água. Estes dois fatores, poderão ter um papel importante na classificação desta Piscicultura a nível sanitário, pois a água antes de chegar aos tanques onde estão os bivalves, fica parada num reservatório durante algum tempo, podendo haver um processo de sedimentação das bactérias, fazendo com que a água ao chegar aos tanques, tenha uma concentração de *E. coli* e coliformes totais mais baixa que as concentrações iniciais, à entrada do reservatório.

Por outro lado, os valores elevados no local C poderá dever-se ao facto desta aquacultura estar dependente das marés para a renovação de água e nas alturas de maior precipitação, devido a uma salinidade demasiado baixa serem fechadas as comportas, não havendo assim uma renovação da água. Como observaram Almeida & Soares (2012), os sítios menos contaminados eram as áreas com maior renovação de água.

Relativamente às análises feitas para *Vibrio* spp., podemos ver que, à exceção do local C, com o passar dos meses o valor de *Vibrio* spp. registado aumentou. Este aumento nos meses quentes foi semelhante ao observado por Anacleto *et al.* (2013), Cantet *et al.* (2013) e Azandégbé *et al.* (2010).

Isto pode ser explicado pelo facto de *Vibrio* spp., sendo originário de habitats marinhos, salobros e de estuários, aparecendo em maiores concentrações quando a temperatura se encontra entre os 20 - 30° C (Hsieh *et al.*, 2008). Com temperaturas baixas estas bactérias permanecem nos sedimentos em baixas concentrações. Nos meses mais quentes, a sua concentração aumenta, devido às condições ecológicas favoráveis, sendo que também aumenta a sua bio-acumulação nos moluscos (Gutiérrez & Martos, 1997) derivado da sua maior taxa de filtração. Assim podemos verificar que, ao aumento da temperatura ao longo dos meses da amostragem, observou-se o aumento dos valores registados para *Vibrio* spp., no local A e B, sendo estes tendencialmente mais elevados no primeiro, onde a temperatura da água também foi ligeiramente mais elevada do que nos outros locais. Os valores resultantes das análises de correlação entre a concentração de *Vibrio* spp. e os valores da temperatura, nos locais A e B (0,6545 e 0,5355 respetivamente) foram semelhantes aos registados por Hsieh *et al.* (2008), Azandégbé *et al.* (2010) e Anacleto *et al.* (2013). No local C registou-se uma média mais baixa de temperatura que nos outros dois locais (18,67 ° C), sendo que no local A e B se registou uma média de 20.80 ° C e 19.83 ° C, respetivamente, podendo ser este um dos fatores a influenciar os valores mais baixos de *Vibrio* spp. registados neste local.

Devido à ausência de valores de salinidade de referência para a ocorrência de *Vibrio* spp., fazer a comparação entre as salinidades registadas nos diferentes locais do estudo e a concentrações observadas desta espécie não pode ser feita. Como referido por Kaspar & Tamplin (1993) e Motes *et al.* (1998) correlações positivas, negativas ou não existentes tem sido observadas. Neste trabalho nos locais onde a salinidade foi registada, nomeadamente no local B e C, embora as correlações não tenham sido estatisticamente significativas, podemos observar através dos valores de R de Pearson tendências correlativas diferentes. Uma tendência de correlação positiva no local B ($R=0,4194$) e negativa no local C ($R=-0,2242$).

Hsieh *et al.* (2008), refere que existem vários fatores que influenciam a comunidade microbiologia, como a, temperatura, renovação de água pelas marés, clima, precipitação e renovação de nutrientes. Isto pode explicar o porque de se ter registado, no local C concentrações menores de *Vibrio* spp. relativamente ao observado noutros dois locais, pelo facto de, provavelmente existirem outros fatores importantes nesta área que não sejam favoráveis para a sobrevivência destas bactérias, como por exemplo a temperatura que foi ligeiramente mais baixa neste local do que nos restantes. A disponibilidade de alimento pode também explicar este facto, uma vez que sabemos que a Ria Formosa é uma zona rica em nutrientes, sendo este um caso que pode explicar o porquê dos valores registados nos locais A e B (Ria Formosa) terem sido maiores do que os registados no local C (sapal de Castro Marim). Isto também pode explicar o porquê destes valores serem maiores no local A do que nos restantes locais, uma vez que neste sítio existe ainda mais uma fonte de alimentos, proveniente dos restos da ração fornecida aos peixes, bem como a temperatura que foi ligeiramente superior aos restantes locais.

Os valores médios de *Vibrio* spp. observados neste estudo, foram $1,25 \times 10^4$ UFC/g no local A, $7,80 \times 10^3$ UFC/g no local B e 3×10^3 UFC/g no local C. Estes valores são comparáveis com outros estudos semelhantes, como os de Suffredini *et al.* (2014), onde se fez a deteção e quantificação de *V. parahaemolyticus* nas zonas de produção de moluscos em Itália. Estes autores registaram valores entre 2×10^0 e $3,8 \times 10^3$ UFC/g na Sardenha (média de 84 UFC/g) e valores entre os 5×10^0 e $1,1 \times 10^3$ UFC/g no Veneto (média de 73 UFC/g). Neste estudo umas das maiores contaminações nas áreas de estudo foram encontradas numa amostra de *Crassostrea* ($2,1 \times 10^3$ UFC/g). Os valores encontrados no género *Crassostrea* foram semelhantes aos observados no presente estudo, embora que no geral os valores obtidos por Suffredini *et al.* (2014) foram inferiores. Azandégbé *et al.* (2010), num estudo sobre a sazonalidade e a ocorrência de *Vibrio aestuarianus* no sedimento e na hemolinfa de ostras da

espécie *C. gigas* em duas aquaculturas em França, observaram, à semelhança do presente estudo, que os valores do *Vibrio* spp. registados em Rivière d'Auray e Aber Benoit, variaram entre 1×10^2 e 3×10^4 CFU/g e entre 2×10^3 e 1×10^5 CFU/g respetivamente.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que as ostras produzidas em cultura integrada com peixes, apresentam melhor desenvolvimento biométrico que as produzidas em monocultura. As ostras produzidas em cultura integradas parecem tirar vantagem da provável maior disponibilidade de alimento, proveniente dos restos de alimentação fornecida aos peixes, usando este alimento para o seu desenvolvimento biométrico.

Relativamente ao estatuto sanitário, podemos observar que as ostras produzidas em pisciculturas localizadas na Ria Formosa (locais A e B) apresentaram valores muito semelhantes de contaminação microbiológica por *E. coli* (estatuto sanitário A). As ostras produzidas em pisciculturas localizadas no sapal de Castro Marim (local C) apresentaram estatuto sanitário que variou entre A, B e C. Relativamente às amostras submetidas a análises microbiológicas, *Vibrio* spp. foi registado em todos os locais do estudo, embora com concentrações maiores nas aquaculturas localizadas na Ria Formosa (local A e B).

Quanto ao desenvolvimento das gónadas, observamos características na população, relativamente à sua maturação que nos indicam a boa qualidade da água tanto na Ria Formosa como no sapal de Castro Marim para a sua produção, nomeadamente o menor número de machos em relação às fêmeas, indicador de condições favoráveis de crescimento, bem como o facto de se observar ostras selvagens desta espécie na Ria Formosa. Observamos também, que as ostras dos três locais do estudo beneficiam das condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento reprodutor, a nível de temperatura, salinidade e disponibilidade de alimento, tanto na Ria Formosa como no sapal de Castro Marim.

Relativamente ao parasita *Polydora* spp. podemos concluir a sua presença nas ostras produzidas tanto nas aquaculturas da Ria Formosa como no sapal de Castro Marim, tendo sido maior a sua deteção na Ria Formosa. Este ensaio demonstrou um melhor desenvolvimento das ostras *C. gigas* em cultura integrada relativamente aos aspetos biométricos e uma igual ou melhor classificação sanitária, relativamente às aquaculturas que produzem estes bivalves em monocultura. No entanto esta melhoria podia ser ainda maior utilizando tecnologias que possibilitassem controlar melhor os fatores abióticos, como a

salinidade e temperatura da água, que influenciam o desenvolvimento das ostras bem como a redução da concentração de bactérias tais como *Vibrio* spp., *E. coli* e coliformes totais que influenciam o estatuto sanitário atribuído a estas culturas, bem como espécies como a *Polydora* spp., possibilitando um melhor controlo destes fatores para a produção das ostras e utilizando-os para prevenir e dificultar surtos das bactérias e parasitas que as possam infetar, reduzindo assim o seu valor.

As conclusões deste estudo apontam para a vantagem da produção de ostras em cultivos multitróficos, contudo carece de continuidade no sentido de se comparar também a nível dos caracteres organoléticos, como sabor, cor, cheiro e textura, das ostras das diferentes culturas. Isto é, uma vez que produzi-las com os peixes traz vantagens a nível de seu crescimento e microbiologia, futuramente dever-se-ia caracterizá-las sob o ponto de vista organoléptico de forma a verificar se estas são também mais apelativas, ou pelo menos igualmente apelativas, para os consumidores e consequentemente, compradores.

BIBLIOGRAFIA

ABAD, M.; RUIZ, C.; SEDANO, F.; J.MOSQUERA, G. (1993). Estudio de las variaciones estacionales de la composición lipídica y ácidos grasos de una población de *ostrea edulis* en el medio natural en San Cibrao (Lugo). In *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*: 419-424.

ABALDE, J.; ANDRES, M. C; CIDA, A.; GUERRA, A. (1990). Crecimiento de una población de semilla de ostra plana *ostrea edulis* en tres estaciones de la Costa Gallega. In *Actas III Congreso Nacional de Acuicultura*: 503-508.

ABRUNHOSA, J. (2011). *Novas Oportunidades na Aquicultura*. Pará: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia.

ACKERMAN, D.; WEISBERG, S.B. (2003). Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. *Journal of Water and Health*, 2: 85-89.

AFNOR (1985). Norme française huîtres creuses, Dénomination et classification. NF V 45-056.

ALKAN U.; ELLIOT D.J.; EVISON, L.M. (1995). Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters. *Water Research*, 29: 2071-2080.

ALMEIDA C.; SOARES F. (2012). Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): A 20 years of sanitary survey. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 252-262.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (1992). *Standard Methods for examination of water and wastewater*, 18th ed. (Greenberg A.E., Clesceri L.S. e Eaton A.D., eds.), APHA, AWWA, WPCF American Public Health Association, Washington, D.C.

- ANACLETO, P.; PEDRO, S.; NUNES, M.; ROSA, R.; MARQUES, A. (2013). Microbiological composition of native and exotic clams from Tagus estuary: Effect of season and environmental parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 74: 116-124.
- ANDERSON, I.C.; RHODES, M.; KATOR, H. (1979). Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (6): 1147-1152.
- AZANDÉGBÉ, A; GARNIER, M.; ANDRIEUX-LOYER, F.; KÉROUEL, R.; PHILIPPON, X.; NICOLAS, J. (2010). Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. *Diseases of aquatic organisms*, 91: 213-221.
- BAPTISTA, T. M.C. (1990). Avaliação da contaminação de ordem fecal na amêijoia boa da costa Algarvia. Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Faro: Universidade do Algarve.
- BAPTISTA, T. M.C. (1993). Comparation of microbiological observations on the water quality in the Ria Formosa basin. A dissertation submitted to the University of Wales in part fulfilment of the requirements for the degree of Master of Philosophy. University of Wales, Bangor.
- BARREIRA, L. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stressmarkers in the clam *ruditapes decussatus* from the Ria Formosa (Portugal). Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente para obtenção do grau de Doutor no ramo de Ciências e Tecnologias do Ambiente, especialidade de Ambiente Aquático. Faro Universidade do Algarve, pp. 40-41.
- BATALLER, E.; BOGHEN, A. D.; BURT, M. D. (1999). Comparative growth of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) reared at low and high salinities in New Brunswick, Canada. *Journal of Shellfish Research*, 18: 107-114.
- BAYEN, S.; LEE, H.; OBBARD, J. (2007). Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. *Environmental Research*, 103(3): 375-382.
- BAYNE, B. L. (1991). The Biology and Cultivation of Mussels. In International-Symposium on Mussels. Organized by Seminario-de-Estudios-Galigos, Area de Ciências-Marinas - Held In Galicia Spain 6-10 November 1989 - Introduction. *Aquaculture*, 94: 123-124.

- BENEDICT, R. T.; NEUMANN, C. M. (2004). Assessing Oregon's twenty-six coastal beach areas for recreational water quality standards. In *Marine Pollution Bulletin*, 49(7-8): 624-629.
- BLAKE, J. A. (1996). Family Spionidae Grube, 1850. In BLAKE, J.A.; HILBIG, B.; SCOTT, P.H. (Eds.). *The Annelida, Part 3. Polychaeta: Orbiniidae to Cossuridae*. Santa Barbara: Santa Barbara Museum of Natural History: 81-224.
- BOEHS, G.; MAGALHAES, A.; SABRY, R.; CEUTA, L. (2012). Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In SILVA-SOUZA A,T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). *Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*. Maringá: ABRAPOA
- BOHER, S.; PICLET, G.; BERIL, C.; MASSON, D.; DELOINCE, R.; BIZEAGOS, E.; SCHWARTZBRODI, L. (1992). Viral contamination and depuration of oysters under field conditions. In <http://archimer.ifremer.fr/doc/1992/acte-1615.pdf> Consultado a 22 de Dezembro de 2013).
- BONDE, G. J. (1962). *Bacterial indicators of water pollution: a study of quantitative estimation*. 2nd ed. Teknisk Forlag, Copenhagen.
- BOYD, C. E. (2003). *Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Auburn, AL 36849 5419, USA- *Aquaculture*, 226: 101-112.
- BRITO, A.; NEWTON, A.; TETT, P.; FERNANDES, T.F. (2009). Temporal and spatial variability of microphytobenthos in a shallow lagoon: Ria Formosa (Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 83: 67-76.
- CACHOLA R.A.; CAMPOS C.J.A. (2006). Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do Algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. *Relatórios Científicos e Técnicos, Série Digital, IPIMAR, Lisboa*, p. 37.
- CACHOLA, R. (1990). Depuração de moluscos bivalves. In *Actas do 6º Congresso do Algarve*. Comunicações: 421-425.
- CACHOLA, R. (1995). Aquacultura "off-shore" em Sagres. *Textos das comunicações do 8º Congresso do Algarve*: 861-868.

CACHOLA, R.; NUNES, M. C. (1974). Quelques aspects de la pollution bacteriologique des centres producteurs de mollusques de l'Algarve (1963-1972). Boletim informativo do Instituto de Biologia Marítima, 13: 1-32.

CACHOLA, R.; NUNES, M. C. (1985). Controle bacterien des eaux dans les zones de Faro/Olhão. Séminaire «Systemes Lagunaires, Ria Formosa». Institut Franco-Portugais, Lisboa.

CACHOLA, R.; NUNES, M. C. (1986). Alguns aspectos da contaminação bacteriológica nos principais centros produtores de moluscos bivalves do Algarve. In 4º Congresso do Algarve. Textos das Comunicações 1: 519-524.

CACHOLA, R.; SAMPAYO, M. A. A., (1984). Contaminação bacteriana na doca de Faro. Pesca e Navegação, 45: 24-27.

CANTET, F.; HERVIO-HEATH, D.; CARO, A.; LE MENNEC, C.; MONTEIL, C.; QUEMERE, C.; JOLIVET-GOUGEON, A.; COLWELL, R.R.; MONFORT, P. (2013). Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. Research in Microbiology, 164 (8): 867-874.

CARDOSO, J. F.; LANGLET, D.; LOFF, J.F.; MARTINS, A.R.; WITTE, J.I.; SANTOS, P.T.; VAN DER VEER, H.W. (2007). Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. Journal of Sea Research, 57: 303-315.

CARDOSO, J. F.; PERALTA, N.; MACHADO, J. P.; VEER, H. (2013). Growth and reproductive investment of introduced Pacific oysters *Crassostrea gigas* in southern European waters. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 118: 24-30.

CARRASQUINHO, R. (2009). Gestão e manejo de uma piscicultura em mar aberto na costa sul de Portugal. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia para obtenção do grau de mestre em Aquacultura e Pescas. Algarve: Universidade do Algarve.

CASTELLO, B. (2010). Avaliação dos teores de As, Cu, Cd, Ni e Zn em ostras, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), nas baías de Paranaguá e Guaratuba. Paraná: Universidade Federal do Paraná.

CHAMBERLIN C.E.; MITCHELL, R. (1978) A decay model for enteric bacteria in natural waters. In: Water Pollution Microbiology, Vol. 2 (Mitchell, R., Ed.), pp. 325-348. John Wiley and Sons, New York.

CHOPIN, T.; ROBINSON, S.M.; TROELL, M.; NEORI, A.; FANG, J. (2008). Multitrophic integration for sustainable marine aquaculture. In: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.). The Encyclopedia of Ecology, Ecological Engineering, vol. 3. Elsevier, Oxford: 2463-2475.

CHRISTO, S. (2006). Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do Gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 Na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): Um Subsídio Ao Cultivo. Tese apresentada à Universidade Federal do Paraná para obtenção do grau de Doutor em Ciência Biológica – Zoologia. Curitiba: Universidade Federal do Paraná

COMUNIDADE EUROPEIA (2005). Regulamento n.º 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. In Jornal Oficial da União Europeia L 338/3 de 15 de Novembro de 2005.

CORNAX R.; MORIÑIGO M.A.; ROMERO P.; BORREGO J.J. (1990). Survival of pathogenic microorganisms in seawater. *Current Microbiology*, 20: 293-298.

CORTESÃO, C.; MENDES, R.; VALE, C. (1986). Metais pesados em bivalves e sedimentos da Ria Formosa - Algarve. *Boletim INIP*, 14: 3-26.

COSTA, R. (2013). *Escherichia coli* in seafood: A brief overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 450-454.

COTTER, E.; MALHAM, S. K.; O'KEEFFE, S.; LYNCH, S. A.; LATCHFORD, J. W.; KING, J. W.; BEAUMONT, A. R.; CULLOTY, S. C. (2010). Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture*, 303: 1-4|8-21.

COUTINHO, A. (2012). Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da ostra do sado. Dissertação apresentada à Escola Superior de Turismo e Tecnologia e Mar, para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Leiria: Instituto Politécnico de Leiria.

COUTINHO, A. (2012). Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da ostra do sado. Dissertação para obtenção do grau de mestre em gestão da qualidade e segurança alimentar. instituto politécnico de Leiria pp 15-16.

CROWTHER, J.; KAY, D.; WYER, M. D. (2001). Relationship between microbial water quality and environmental conditions in coastal recreational waters: the Fylde Coast, UK. *Water Research*, 35: 4029-4038.

DEPAOLA, A.; JONES, J.; WOODS, J.; BURKHARDT, W.; CALCI, K.; KRANTZ, J.; BOWERS, J.; KASTURI, K.; BYARS, R.; JACOBS, E.; WILLIAMS-HILL, D.; NABE, K. (2010). Bacterial and viral pathogens in live Oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 2754- 2768.

DINIS, M., BAPTISTA, T., SOARES, F.; ALMEIDA, M. (1998). Curso de diagnóstico de patologia em aquacultura. Univ. Algarve. UCTRA. pp. 57-67.

DIONÍSIO, L. (1996). Estudos microbiológicos da Ria Formosa. Qualidade sanitária de águas e moluscos bivalves. Dissertação apresentada à Universidade do Algarve para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na especialidade de Microbiologia. Faro Universidade do Algarve.

DIONÍSIO, L.P.C.; RHEINHEIMER, G.; BORREGO, J.J. (2000). Microbiological pollution of Ria Formosa (South of Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 40: 186-193.

DITTMAN, D. E.; FORD, S. E.; HASKIN, H. H. (1998). Growth patterns in oysters, *Crassostrea virginica*, from different estuaries. *Marine Biology*, 132: 461-469.

DONOVAN, T.J.; GALLACHER, S.; ANDREWS, N.J.; GREENWOOD, M. H.; GUERRANT, R. L.; RUSSEL, J. E.; ROBERTS, R.; LEE, R. (1998). Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health*, 1: 188-196.

DRONKERS, J.; ZIMMERMAN, J.T.F. (1982). Some principles of mixing in tidal lagoons, *In: LASSERRE, P. et al. (Ed.) (1982). Coastal lagoons: Proceedings of the international symposium on coastal lagoons, Bordeaux, France, 8-14 September 1981. Oceanologica Acta, V(4, Suppl.): 107-117.*

DUMBAULD, B.R.; RUESINK, J.L.; RUMRILL, S.S. (2009). The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: a review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*, 290: 196-223.

ELLIS M.S.; BARBER R.D.; HILLMAN R.E.; POWELL E.N. (1998). Gonadal analysis. In LAUENSTEIN G.G.; CANTILLO A.Y. (eds.). *Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project:1993-1996 update*. NOAA Tech. Mem. NOS ORCA: 216-227.

FALCÃO, M.; DUARTE, P.; MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; FONTES, T.; MENESES, R. (2000). Relatório final do projecto “Gestão do cultivo de bivalves na Ria Formosa com recurso à modelação matemática”. Parque Natural da Ria Formosa: Instituto para Conservação da Natureza.

FALCÃO, M.; FONSECA, L.; SERPA, D.; MATIAS, D.; JOAQUIM, D.; DUARTE, P.; PEREIRA, A.; MARTINS, C.; GUERREIRO, M. J. (2003). Development of an Information Technology Tool for the Management of European Southern Lagoons under the influence of river-basin runoff. Lisboa/Porto: INIAP/IPIMAR e CEMAS.

FALCÃO, M.; PISSARRA, J.; CAVACO, H. (1992). Características químico-biológicas da Ria Formosa: Análise de um ciclo anual. *Boletim INIP*, 16: 5-21.

FAO (2001). Aquaculture topics and activities. Governance of aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department [online]. In <http://www.fao.org/fishery/topic/13542/en>. Consultado a 25 de Novembro de 2013.

FAO (2005). Cultured aquatic species information programme. *Crassostrea gigas*. Fisheries and Aquaculture Department [online]. In http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en. Consultado a 15 de setembro de 2014.

FAO (2009). Fishery and Aquaculture Statistics. Aquaculture Production. In <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>. Consultado a 25 de novembro de 2013.

FAO/WHO (2004). Joint FAO/WHO Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Preliminary Document. Hazard Identification, Exposure Assessment and Hazard Characterization of *Vibrio* spp. in Seafood.

FARMER, J. J. (1992). The family Vibrionaceae. In BALOWS, A; TRUPER, G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (ed.). The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, and applications, 2^a ed. Berlin: Springer-Verlag: 2938-2951.

Faro/Olhão (1981/1984). In: GOMES GUERREIRO, M. (Ed.), Proceedings of the Os Sistemas Lagunares do Algarve. Faro: Universidade do Algarve: 95-101.

FERREIRA, I. (2003). Crescimento e qualidade da ostra (*Crassostrea gigas*) em viveiros da Ria Formosa sujeitos a diferentes condições de cultura e situações ambientais. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de mestre em Ciências do Mar- Recursos Marinhos, especialidade de Aquacultura. Porto: Universidade do Porto.

FIGUERAS, A.J.; VILLALBA, A. (1988). Patología de moluscos. In: MONTEROS, J.E.; LABARTA, U. (eds.). Patología en Acuicultura. Madrid, Mundi-Prensa, pp. 327-389.

FLAHAUW, E.; QUELLEC, S.; DAVENEL, A.; DEGREMONT, L.; LAPEGUE, S.; HATT P. (2012). Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method. *Aquaculture* 370-371: 84-89.

FLINT, K. P. (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *Journal applied bacteriology*, 63(3): 261-270.

FORREST B.M.; KEELEY, N.; HOPKINS, G.; WEBB, S.; CLEMENT, D. (2009). Bivalve aquaculture in estuaries: Review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture*, 298: 1-15.

FORREST, B.M.; CREESE, R.G. (2006). Benthic impacts of intertidal oyster culture, with consideration of taxonomic sufficiency. *Environmental Monitoring and Assessment*, 112: 159-176.

FORREST, B.M.; HOPKINS, G.A.; DODGSHUN, T.J.; GARDNER, J.P.A. (2007). Efficacy of acetic acid treatments in the management of marine biofouling. *Aquaculture*, 262: 319-332.

FORTIN, M-F. (1999). O Processo de Investigação. Da Concepção à Realização. Loures: Lusodidacta

- FOSTER-SMITH, R. L. (1975). The effect of concentration of suspension and inert material on the assimilation of algae by three bivalves. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55(2): 411-418.
- FUJIOKA, R.S.; HASHIMOTO, H.H.; SIWAK, E.B.; YOUNG, R. (1981). Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 690-696.
- GAMESON, A.L.H.; GOULD, D.J. (1975) Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in sea water. In: *Proceedings of the International Symposium on Discharge of Sewage from Sea Outfalls* (Gameson, A.L.H., Ed.), pp. 209-219. Pergamon Press, London.
- GELDREICH E. E. (1966). Sanitary Significance of Fecal Coliforms in the Environment. F.W.P.C.A. Water Pollution Control Publication WP-20-3.
- GONÇALVES, A. (2010). Qualidade e valorização em aquacultura: propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves. Dissertação apresentada à Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Farmácia, especialidade de Bromatologia. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- GOYARD, E. (1995). Réseau de suivi de la croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises. REMORA. Résultats nationaux. Année 1994. Plouzané: IFREMER
- GRABOWSKI, J. H.; PETERSON, C. H.; POWERS, S. P.; GASKILL, D.; SUMMERSON, H. C. (2004). Growth and survivorship of nonnative (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis*) versus native eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Shellfish Research*, 23: 781-793.
- GUTIÉRREZ, J.M.; MARTOS, P.G. (1997). Vibrios de origen marino en patologia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15: 383-388.
- HANDLEY, S.J.; BERGQUIST, P.R. (1997). Spionid polychaete infestations of intertidal Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), Mahurangi Harbor, northern New Zealand. *Aquaculture*, 153: 191-205.
- HIGUERA-RUIZ, R.; ELORZA J. (2009). Biometric, microstructural, and high-resolution trace element studies in *Crassostrea gigas* of Cantabria (Bay of Biscay, Spain): Anthropogenic and seasonal influences. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82: 201-213

HONKOOOP, P. J. C.; BEUKEMA, J. J. (1997). Loss of body mass in winter in three intertidal bivalve species: an experimental and observational study of the interacting effects between water temperature, feeding time and feeding behaviour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 21: 277-297.

HSIEH, J.; FRIES, J.; NOBLE, R. (2008). Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Environmental Microbiology*, 10(1): 57-64

HUSS, H. H. (1993). Assurance of seafood quality. Fisheries Technical Paper, 334, Rome: FAO.

KASPAR, C.W.; TAMPLIN, M.L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2425-2429.

KAY D.; KERSHAW S.; LEE R.; WYER M.D.; WATKINS J.; FRANCIS C. (2008). Results of field investigations into the impact of intermittent sewage discharges on the microbiological quality of wild mussels (*Mytilus edulis*) in a tidal estuary. *Water Research*, 42: 3033-3046.

KEELEY, N.; FORREST, B.; HOPKINS, G.; GILLESPIE, P.; CLEMENT, D.; WEBB, S.; KNIGHT, B.; GARDNER, J. (2009). Sustainable Aquaculture in New Zealand: review of the ecological effects of farming shellfish and other non-fish species. Prepared for the Ministry of Fisheries. Cawthron Report 1476. New Zealand: Cawthron Institute.

KENT, R.M.L. (1979). The influence of heavy infestation of *Polydora ciliutu* on the flesh content of *Myrilus edulis*. *Journal of Marine Biology Association of United Kingdom*, 59: 289-297.

KINNE, O. (1983). Diseases of marine animals. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. pp. 467-475.

KOBAYASHI, M.; HOFMANN, E.E.; POWELL, E.N.; KLINCK, J.M.; KUSAKA, K. (1997). A population dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 149: 285-321.

- KONINGA, P. (1976). Farming the cupped oyster of the genus *Crassostrea*: a multidisciplinary treatise. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol. 2, Elsevier, Amsterdam.
- LABELLE, R. L.; GERBA, C. P.; GOYAL, S. M.; MELNICK, J. L.; CECH, I.; BODGAN, G. F. (1980). Relationship between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 39: 588-596.
- LEE R.; KAY D.; WILKINSON R.J.; FEWTRELL L.; STAPLETON C. (2003). Impact of intermittent discharges on the microbial quality of shellfish. RandD Technical report P2-266/TR Environment Agency, Bristol., pp. 48.
- LIMA, C.; VALE, C. (1980). Alguns dados físico-químicos e bacteriológicos sobre a Ria Formosa. Boletim do Instituto Nacional de Investigação das Pescas, 3: 5-25.
- LLEONART, M.; HANDLINGER, J.; POWELL, M. (2003). Spionid mudworm infestation of farmed abalone (*Haliotis* spp.). Aquaculture, 221: 85-96.
- LOOSANOFF, V. L. (1958). Some aspects of behavior of oysters at different temperatures. Biological Bulletin, 114: 57-70.
- LUCAS, A. (1982). Remarques sur les rendiments de production chez les bivalves marines. Haliotis, 12: 47-60.
- MANN, R.; BURRESON, E.M.; BAKER, P.K. (1991). The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake Bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Journal of Shellfish Research, 10: 379-388.
- MARINO, R. P.; GANNON, J. J. (1991). Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storms drain sediment. Water Research, 25: 1089-1098.
- MARTINEZ-CORDOVA, L.; MARTINEZ-PORCHAS, M. (2006). Polyculture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, giant oyster, *Crassostrea gigas* and black clam, *Chione fluctifraga* in ponds in Sonora, Mexico. Aquaculture, 258: 321-326.
- MCCAMBRIDGE J.; MCMEEKIN T.A. (1981). Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 41: 1083-1087.

- MCKINDSEY, C.W.; ANDERSON, M.R.; BARNES, P.; COURTENAY, S.; LANDRY, T.; SKINNER, M. (2006). Effects of shellfish aquaculture on fish habitat. Department of Fisheries and Oceans (DFO)- Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2006/011, Fisheries and Oceans Canada, Ottawa, ON, Canada.
- MESTRE, P. (2008). Elaboração de um projecto de uma unidade de piscicultura. Mestrado integrado em medicina veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 1-115.
- MILONE, G. (2009). Estatística geral e aplicada. São Paulo: Centage Learning.
- MIOSSEC, L.; LE DEUFF R.M.; GOULLETQUER, P. (2009). Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific Oyster). International Council for the Exploration of the Sea. ICES Cooperative Research Report, 299: 4.
- MORI, K.; SATO, W.; NOMURA, T.; IMAJIMA, M. (1985). Infestation of the Japanese Scallop *Patinopecten yessoensis* by the boring polychaetes, *Polydora*, on the Okhotsk Sea Coast of Hokkaido, especially in Abashiri Waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51: 371-380 (In Japanese with English abstract).
- MOTES, M.L.; DEPAOLA, A.; COOK, D.W.; VEAZEY, J.E.; HUNSUCKER, J.C.; GARTHRIGHT, W.E.; BLODGETT, R. J.; CHIRTEL, S. J. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). Applied and Environmental Microbiology, 64: 1459-1465.
- MUDGE S.M.; BEBIANNO M.J. (1997). Sewage contamination following an accidental spillage in the Ria Formosa, Portugal. Marine Pollution Bulletin, 34: 163-170.
- NATARO J. P.; KAPER J. B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11(2): 403.
- NEORI, A.; CHOPIN, T.; TROELL, M.; BUSCHMANN, A.H.; KRAEMER, G.P.; HALLING, C.; SHPIGEL, M.; YARISH, C. (2004). Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. Aquaculture, 231: 361-391.
- NEWTON, A. (1995). The water quality of the Ria Formosa lagoon, Portugal. Dissertation submitted to the Scholl of Ocean Sciences for the degree of doctor of philosophy. United Kingdom : University of Wales.

- NEWTON, A.; MUDGE, S. (2003). Temperature and salinity regimes in a shallow, mesotidal lagoon, the Ria Formosa, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57: 73-85.
- NOBLE, R. T.; LEECASTER, M. K.; MCGEE, C. D.; WEISBERG, S. B.; RITTER, K. (2004). Comparison of bacterial indicator analysis methods in stormwater-affected coastal waters. *Water Research*, 38 (5): 1183-1188.
- OLIVER J. D.; JAPER J. B. (1997). *Vibrio* species. In: Doyle MP, Beuchat LR; Montville TJ. *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: ASM Press, pp. 228-264.
- ORBAN, E.; DI LENA, G.; MASCI, M.; NEVIGATO, T.; CASINI, I.; CAPRONI, R.; GAMBELLI, L.; PELLIZZATO, M. (2004). Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1929-1938
- PEDRO S.; CASTILHO M.F.; SILVA H.A. (2008). Principais perigos associados aos bivalves; contaminantes microbiológicos; generalidade. In: SILVA, H.A.; BAPTISTA, I. (Eds.), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. Publicações avulsas do IPIMAR, Lisboa, pp. 74-75.
- PÊRA, M. T. R. (1986). Algumas considerações sobre o sistema lagunar algarvio. In Os sistemas lagunares do Algarve. *Actas do Seminário Comemorativo Dia Mundial do Ambiente*. Faro: Universidade do Algarve, pp. 18-21.
- PHLEGAR, F. B. (1969). Some general features of coastal lagoons. In Ayala-Castaiieres, A. A.; Phleger, F. B. (eds.). *Lagunas Costeras, un Simposio*. Universidad Nacional Autónoma do México: 5-26.
- POPNR (2007). *Revisão do Plano do Ordenamento do Parque Natural da Ria*.
- PROT-ALGARVE (2002). *Plano Regional do Ordenamento do Território do Algarve. Relatório Preliminar de Caracterização e Diagnóstico, vol. II – Caracterização e Diagnóstico, Parte 1*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve.
- QUIVY, R.; CAMPENHOUDT, L. V. (1998). *Manual de investigação em ciências sociais*. Lisboa: Gradiva.

RAJAEI, M.; POORBAGHER, H; FARAHMAND, H.; MORTAZAVI, M.; EAGDERI, S. (2014). Interpopulation differences in shell forms of the pearl oyster, *Pinctada imbricata radiata* (Bivalvia: Pterioidea), in the northern Persian Gulf inferred from principal component analysis and elliptic Fourier analysis. *Turkish Journal of Zoology*, 38: 42-48.

Relatório do Projeto "Estudos de Monitorização do Impacte das Dragagens na Ria Formosa" (1999-2000). Instituto de Conservação da Natureza (ICN) e IPIMAR, no âmbito do Convénio Pescas-Ambiente.

REN J. S.; MARSDEN I.D.; ROSS A. H.; SCHIEL D. R. (2003) Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37:1, 171-182.

REN, J.; STENTON-DOZEY, J; PLEW, D; FANG, J.; GALL, M. (2012). An ecosystem model for optimising production in integrated multitrophic aquaculture systems. *Ecological Modelling*, 246: 34-46.

REPORT OF PROJECT "ESTUDOS DE MONITORIZAÇÃO DO IMPACTE DAS DRAGAGENS NA RIA FORMOSA" (1999-2000). Instituto de Conservação da Natureza (ICN) e IPIMAR, no âmbito do Convénio Pescas-Ambiente.

RESEARCH DOCUMENT (2006). In Canadian Science Advisory Secretariat Research. Document, 2006/011.

RHEINHEIMER, G. (1992). *Aquatic Microbiology*, fourth ed. Wiley, London.

RIOU P.; LE SAUX J.C.; DUMAS F.; CAPRAIS M.P.; LE GUYADER S.F.; POMMEPUY M. (2007). Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. *Water Research*, 41: 2774-2786

ROWSE, A.J.; FLEET, G.H. (1984). Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella* charity and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 1061-1063.

ROYER, J.; ROPERT, M.; COSTIL, K. (2007). Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Journal of Shellfish Research*, 26 (4): 973-984.

ROZEN Y.; BELKIN S. (2001). Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 513- 529.

RUIZ, C. S.; ABAD, M.; RODRIGUEZ, T.; SANCHEZ, J. L. (1990). Variacion estacionai en la condicion, actividade reproductora y composiçã bioquímica en *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Actas III Congreso Nacional de Acuicultura*: 421-426.

SAMAIN, J. F.; BOUDRY, P.; DÉGREMONT, L.; SOLETCHEV, P.; ROPERT, M.; BÉDIER, E.; MARTIN, J. L.; MOAL, J.; MATHIEU, M.; POUVREAU, S.; LAMBERT, C.; ESCOUBAS, J. M.; NICOLAS, J. L.; LE ROUX, F.; RENAULT, T.; BURGEOT, T.; BACHER, C. (2005). Information on the Distribution, Causes and Significance of the Summer Mortality Syndrome in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and Other Bivalve Species. Report on the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms. ICES CM 2005/F:02, March, pp 8-12.

SANTOS, S.; CARDOSO, J.F.; CARVALHO, C.; LUTTIKHUIZEN, P.C.;VAN DER VEER, H.W. (2011). Seasonal variability in somatic and reproductive investment of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along a latitudinal gradient. *Estuarine Coastal and Shelf Sciences*, 92: 19-26.

SARÀ, G.; MAZZOLA, A. (1997). Effects of trophic and environmental conditions on the *Crassostrea gigas* growth in culture. *Aquaculture*, 153: 81-91.

SATO-OKOSHI, W.; OKOSHI, K.; SHAW, J. (2008). Polydorid species (Polychaeta: Spionidae) in south-western Australian waters with special reference to *Polydora uncinata* and *Boccardia knoxi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88: 491-501.

SATO-OKOSHI, W.; ABE, H. (2012). Morphological and molecular sequence analysis of the harmful shell boring species of *Polydora* (Polychaeta: Spionidae) from Japan and Australia. *Aquaculture*, 368-369: 40-47.

SCHULLER, M. I. (1998). Ostra {*Crassostrea sp. e Ostrea sp.*}. In HENRIQUES, M. A. *Manual de Aquacultura*. 1ª ed. Porto: Marca-Artes Gráficas. pp 59-70.

SIMON, C.A.; LUDFORD, A.; WYNNE, S. (2006). Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. *African Journal of Marine Science* 28: 167-171.

SINTON L.W.; DAVIES-COLLEY R.J.; BELL R.G. (1994) Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2040-2048.

SOLETCHNIK, P.; LA MOINE, O.; GOULLETQUER, P.; GEAIRON, P.; RAZET, D.; FAURY, N.; FOUCHE, D.; ROBERT, S. (2000). Optimisation of the traditional Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) culture on the French Atlantic coastline: autumnal fattening in semi-closed ponds. *Aquaculture*, 199: 73-91.

SOLETCHNIK, P.; LAMBERT, C.; COSTIL, K. (2005). Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research*, 24: 197-207.

SOLETCHNIK, P.; LE MOINE, O.; FAURY, N.; RAZET, D.; GEAIRON, P.; GOULLETQUER, P. (1999). Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environmental and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources*, 12: 131-143.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 24: 411-416.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N.; JOZIC, S.; CURAC, D. (1999). The rate of concentration of fecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment International*, 25(8): 991-1000.

SONIER, R.; MAYRAND, E.; BOGHEN, A.D.; OUELLETTE, M.; MALLET, V. (2008). Concentration of *Escherichia coli* in sediments as an indicator of the sanitary status of oyster (*Crassostrea virginica*) aquaculture sites. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(6): 678-684.

SOTO, D. (2009). *Integrated Mariculture: A Global Review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 529, Rome.

SOUZA, N. (2010). *Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Escherichia coli em água*. Dissertação apresentada à Escola de Química, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências. Rio de Janeiro: Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SPRUNG, M. (1994). Macrobenthic sedentary production in the intertidal zone of the Ria Formosa - a lagoon in southern Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 38: 539-558.

SUFFREDINI, E.; MIONI, R.; MAZZETTE, R.; BORDIN, P.; SERRETORE, P.; FOIS, F.; PIANO, A.; COZZI, L.; CROCI, L. (2014). Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 184: 14-20.

TANTILLO, G.M.; FONTANAROSA, M.; DI PINTO, A.; MUSTI, M. (2004). Updated perspectives on emerging *Vibrios* associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 117-126.

TAYLOR, M.D.; DODGSHUN, T.J.; DE ZWART, E. (2005). Biosecurity management plan for a proposed south Kaipara oyster farm. Cawthron Report 1123. New Zealand: Cawthron Institute, Nelson.

THUNBERG (1793). *Crassostrea gigas*. World Register of Marine Species. In <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140656>. Consultado a 30 outubro de 2013.

TIRAPÉ, A.; BACQUE, C.; BRIZARD, R.; VANDENBULCKE, F.; BOULO, V. (2007). Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 31 (9): 859.

TORO, J. E.; PAREDES, P. I.; VILLAGRA, D. J.; SENN, C. M. (1999). Seasonal variation in the phytoplanktonic community, seston and environmental variables during a 2-year period and oyster growth at two mariculture sites, southern Chile. *Marine Ecology*, 20 (1): 63-89.

TROELL, M.; JOYCE, A.; CHOPIN, T.; NEORI, A.; BUSCHMANN, A.; FANG, J. (2009). Ecological engineering in aquaculture. Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297: 1-9.

TROUSSELIER, M.; GOT, P.; BOUVY, M.; M'BOUP, M.; ARFI, R.; LEBIHAN, F.; MONFORT, P.; CORBIN, D.; BERNARD, C. (2004). Water quality and health status of the Senegal River estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 48 (9-10): 852-862.

TWEDT, R. M.; MADDEN, J. M.; HUNT, J.; FRANCIS, D. W.; PEELER, J. T.; DURAN, A. P.; HEBERT W. O.; MCCAY, S. G.; RODERICK, C. N.; SPITE, G. T.; WAZENSKI, T.

J. (1981). Characterization of *Vibrio cholerae* Isolated from Oysters. Applied and environmental microbiology, 41(6): 1475-1478.

VIEIRA R.H.S.F.; ATAYDE M.A.; CARVALHO E.M.R.; CARVALHO F.C.T.; FILHO A.A.F. (2008). Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacotu (Eusébio, Estado do Ceará): isolamento e identificação de *Escherichia coli* e a sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science, 45: 180-189.

YOUNGER A.D.; LEE R.J.; LEES D.N. (2003). Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales – rationale and approach. In: VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, J.L.; BEIRAS, R. (Eds.), Molluscan Shellfish Safety. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, pp. 265-277.

YOUNG-JOO, A.; KAMPBELL, D. H.; BREIDENBACH, G. P. (2002). *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. Environmental Pollution, 120: 771-778.

ZWARTS, L. (1991). Seasonal variation in body weight of the bivalves *Macoma balthica*, *Scrobicularia plana*, *Mya arenaria* and *Cerastoderma edule* in the Dutch Wadden Sea. Netherlands Journal of Sea Research, 28: 231-245.

ANEXOS

Anexo I – Preparação dos meios de cultura

PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Métodos utilizados na elaboração dos meios de cultura para análise microbiológica

- ⇒ **Solução de Triptona Sal (OXOID LTD., Basingstone, Hampshire, UK) com Cloreto de Sódio (MERCK KGaA, Darmstadt, Germany):**

Dissolver 1 g de triptona e 8,5 g de cloreto de sódio num litro de água destilada, agitar muito bem até se obter uma mistura homogênea. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos (pH final de $7,2 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). (www.oxid.com e www.merck.com);

- ⇒ **Meio de Triptona BÍlis X-Glucoronídeo (TBX) (OXOID LTD., Basingstone, Hampshire, UK):**

Dissolver 36,6 g de TBX num litro de água destilada, aquecer numa placa de aquecimento com agitação até o meio ficar completamente dissolvido e deixar entrar em ebulição. Esterilizar em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Deixar arrefecer até à temperatura de 45 ° - $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e distribuir em placas de Petri estéreis (pH final de $7,2 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após solidificação do meio, as placas são armazenadas no frigorífico, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de uma semana. (www.oxid.com).

- ⇒ **Agar ChromoCult® para Coliformes (CHR) (MERCK KGaA, Darmstadt, Germany).**

Dissolver 26,5 g de CHR num litro de água destilada esterilizada, aquecer numa placa com agitação. Por vezes pode surgir alguma turvação, mas isso não afeta do desempenho do meio. Não se faz a esterilização na autoclave e não se deve aquecer demasiado (pH final de $6,8 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Deixar arrefecer até à temperatura de 45 ° - $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e distribuir em placas de Petri estéreis. Após solidificação do meio, as placas são armazenadas no frigorífico, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de uma semana. (www.merck.com).

- ⇒ **Agar Triptona de Soja (Meio TSA) (OXOID LTD., Basingstone, Hampshire, UK).**

Dissolver 40,0 g de TSA num litro de água destilada, aquecer numa placa de aquecimento com agitação até o meio ficar completamente dissolvido e deixar entrar em ebulição. Distribuir por tubos. Esterilizar em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante

15 minutos (pH final de $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após solidificação do meio, os tubos são armazenadas no frigorífico, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de uma semana. (www.oxid.com).

⇒ **Minerals modified glutamate médium (MMGB) (OXOID LTD.):**

- Concentração dupla: Dissolve-se 12,7g de glutamato de sódio LP0124 e 22,7g de MMGB em 1l de água destilada contendo 5g de cloreto de amónia. Misturar até dissolver completamente. Esterilizar na autoclave durante 10 minutos a $116\text{ }^{\circ}\text{C}$, em alternativa calor a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos em três dias sucessivos.
- Concentração simples: Dissolve-se 6,4 g de sódio glutamato LP0124 e 11,4 g de MMGB, em 1l de água destilada contendo 2,5g de cloreto de amónia. Misturar até dissolver completamente. Esterilizar por autoclave durante 10 minutos a $116\text{ }^{\circ}\text{C}$, em alternativa calor a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos em três dias sucessivos

⇒ **Meio TCBS (OXOID LTD)**

Suspender 88g de TCBS CM0333 em 1 litro de água destilada. Ferva para dissolver o meio completamente. Não autoclavar.

Anexo II – Metodologia utilizada para a realização da coloração histológica

Coloração Hematoxilina e Eosina (45 min)			
Tina nº	Reagente	Tempo	Observações
1	Xilol	15 min.	
2	Xilol	6 Imersões	
3	Álcool 100%	6 Imersões	
4	Álcool 100%	6 Imersões	
5	Álcool 96%	6 Imersões	
6	Álcool 70%	6 Imersões	
7	Álcool 50%	6 Imersões	
8	Água destilada	2 min.	
9	Hematoxilina	10 min.	Pode ser necessário mais tempo
10	Água da torneira	5 min.	
11	Álcool ácido	2 min.	
12	Água da torneira	5 min	
13	Álcool 96%	3 min	
14	Eosina	30 seg.	Pode ser necessário mais tempo
15	Água da torneira	30 seg.	Enxaguar
16	Álcool 96%	6 Imersões	
17	Álcool 96%	6 Imersões	
18	Álcool 100%	6 Imersões	
19	Álcool 100%	6 Imersões	
20	Xilol	Cerca de 25 min	
21	Xilol	até montagem	