

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias



EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA DO MAR
NA REPRODUÇÃO DE *MYTILUS EDULIS*

Teresa Margarida das Neves Casimiro

ESTE PROJECTO FOI DESENVOLVIDO NO
AMBITO DO PROJECTO ACIDBIV (ERA-CIRCLE/0004/2007)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA
RAMO ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE MARINHA

2011

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias



EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA DO MAR
NA REPRODUÇÃO DE *MYTILUS EDULIS*

Teresa Margarida das Neves Casimiro

DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELO PROF. DOUTOR LUÍS
CHÍCHARO E COMO CO-ORIENTADORES O DOUTOR MIGUEL
GASPAR E O DOUTOR PEDRO RANGE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA
RAMO ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE MARINHA

2011

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor. Luís Chícharo que me permitiu fazer o meu trabalho nesta área e pela supervisão dada.

Ao Doutor. Pedro Range pela total ajuda disponibilizada, pelas sugestões, dedicação e paciência a mim dedicadas, que sem elas não saberia seguir em frente com este trabalho.

Ao Doutor Miguel Gaspar por ter aceitado ser meu co-orientador e por me ter ajudado nas minhas dúvidas na parte prática do meu trabalho.

À Dra. Paula Moura por me ensinar tudo aquilo que hoje sei na área laboratorial e a paciência dedicada, que me ajustou consideravelmente na realização deste trabalho.

À Dra. Domitília Matias pela disponibilidade e preocupação demonstradas durante este trabalho.

Ao INRB-IPIMAR por disponibilizar as suas delegações de Olhão e Tavira para a realização deste trabalho.

Ao Dr. David Piló pela ajuda e força que me deu.

À minha mãe pelo carinho, dedicação, ajuda e insistência que me ajudou a tornar-me na pessoa que hoje sou e que sem ela nada disto seria possível.

Ao meu Padrasto que de alguma maneira me deu força para continuar.

Ao Nuno que esteve sempre do meu lado nas melhores e piores fases, ajudando-me a seguir em frente.

À Diana, que mesmo longe, deu-me bastante ajuda moral e boa disposição para seguir em frente.

Finalmente àqueles que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, o meu muito obrigado

Resumo

A concentração de dióxido de carbono atmosférico tem vindo a aumentar, passando de níveis de cerca de 280ppm, no início da revolução industrial para cerca de 380ppm actualmente, devido principalmente a queima contínua de combustíveis fósseis. Com o aumento da pressão de CO₂ na atmosfera aumenta a sua diluição no oceano, causando a redução dos valores de pH. Esta “acidificação” da água do mar afecta muitos organismos marinhos, principalmente os com estruturas calcificadas, como bivalves, que se dissolvem em pH mais ácidos. Para além disso, a redução de pH é potencialmente causadora de stress fisiológico sobre os organismos, com consequências em várias fases do ciclo de vida. Assim, este estudo teve por objectivo analisar, em laboratório, o efeito potencial da redução de pH, em 0,4 e 0,7 unidades, tal como previsto nos relatórios do IPCC (International Panel for Climate Change), na gametogénese e sucesso reprodutivo do mexilhão, *Mytilus edulis*. A experiência abrangeu apenas um período de reprodução, pelo que uma análise mais conclusiva sobre os efeitos da acidificação sobre a reprodução desta espécie é necessária para uma consolidação dos resultados obtidos. Alguns dos indicadores estudados (p.ex. o índice gonado-somático, o diâmetro dos oócitos e o rácio sexual) variaram substancialmente durante a experiência, embora essa variação não pareça estar relacionada com os diferentes níveis de pH. No entanto, a diferença observada nos estados de gametogénese das fêmeas sugere um retardamento da desova no tratamento de acidificação mais extremo (pH-0,7). O desfasamento do desenvolvimento da gónada entre os sexos afigura-se assim como um potencial efeito da acidificação por CO₂ no sucesso reprodutivo de *M. edulis*.

Palavras-chave: alterações climáticas, acidificação, reprodução, gametogénese, *Mytilus edulis*,

Abstract

The concentration of atmospheric carbon dioxide has been increasing, from levels of around 280 ppm, in the beginning of industrial revolution to around 380ppm in the present day, mainly due to continued burning of fossil fuels. With the increase of atmospheric concentrations, more CO₂ dissolves on the ocean, causing a reduction in pH values. This “acidification” of the sea water affects many marine organisms, especially the calcified, like bivalves, whose shells may dissolve at lower pH values. In addition, the pH reduction has the potential to cause physiological stress on the organisms, with consequences at various stages of the life cycle.

The main objective of this study was to analyze, in laboratory controlled experiment, the potential effect of reductions of pH, by 0,4 and 0,7 units, as predicted in the reports of the IPCC (International Panel for Climate Change), on the gametogenesis and reproductive success in mussel (*Mytilus edulis*). This experiment covered only one reproductive period, so a more conclusive study on the effects of acidification in the reproduction of this specie is necessary for a consolidation of results. Some of the indicators studied (eg. gonadsomatic- index, oocyte diameter and rex ratio) varied with substantially during the experiment, although the observed differences cannot be directly attributed to the different levels of pH. Nevertheless, the differences observed in the maturation stages of females suggests a delay of spawning in the most extreme acidification treatment (pH-0,7). Desynchronized gametogenic development constitutes, therefore, a potential effect of ocean acidification on the the reproductive success of *M. edulis*.

Key words: climatic change, acidification, reproduction, gametogenesis, *Mytilus edulis*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
1 Introdução.....	1
1.1 Acidificação da água do mar por aumento da concentração de CO ₂	1
1.2 Efeitos da acidificação na reprodução dos organismos marinhos	2
1.3 Reprodução de <i>Mytilus spp</i>	3
1.4 <i>Mytilus edulis</i> e <i>Mytilus galloprovincialis</i>	5
1.5 Objectivos	5
2 Metodologias	6
2.1 Amostragens	6
2.2 Sistema de cultivo.....	6
2.3 Histologia.....	7
2.4 Identificação dos estados de gametogénese.....	8
2.5 Índice de condição (IC).....	11
2.5.1 Indivíduos do meio natural	11
2.5.2 Indivíduos do sistema de cultivo	11
2.6 Índice gonado-somático (IGS).....	12
2.7 Indução de postura	12
2.8 Composição da concha	12
2.9 Análise de dados	13
3 Resultados.....	14
3.1 Parâmetros físico-químicos da água	14
3.2 Índice gónado-somático (IGS).....	15
3.3 Índice de condição (IC).....	17
3.4 Estados de gametogénese.....	17
3.5 Diâmetro dos oócitos	19
3.6 Evolução temporal do estado reprodutivo e rácio sexual	21
3.7 Composição da concha	23
3.8 Mortalidade.....	25
4 Discussão.....	26
5 Considerações finais.....	30
Referências	31

1 Introdução

1.1 Acidificação da água do mar por aumento da concentração de CO₂

Desde o início da revolução industrial que a concentração de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico tem vindo a aumentar, passando de níveis de cerca de 280 ppm, no início da revolução industrial (séc. XVIII) para cerca de 380ppm nos dias de hoje (Feely et al. 2004). Este aumento é devido principalmente à queima contínua de combustíveis fósseis associada às actividades humanas (Beesley et al. 2008). Cerca de 50% de todo o CO₂ produzido pelas actividades humanas penetra na superfície dos oceanos e é transportado pelas correntes oceânicas para águas mais profundas. O oceano funciona como um reservatório natural de carbono. Este processo pode reduzir, assim, a acumulação atmosférica de CO₂, induzindo a uma diminuição do aquecimento global mas provocando por outro lado uma acidificação dos oceanos (Sabine et al. 2004).

A acidificação dos oceanos pode ser definida como uma alteração química da água do mar conduzida pelos inputs químicos da atmosfera, sendo estes de carbono, nitrogénio e componentes de enxofre (Guinotte & Fabry 2008), que resulta na redução do pH. Assim, quanto maior a dissolução destes gases nos oceanos maior será a redução do pH e conseqüentemente a acidificação do meio. A dissolução do CO₂ na água do mar gera ácido carbónico, levando a um aumento de iões hidrogénio, o que provoca a diminuição do pH, e de iões de bicarbonato (ao diminuir a concentração dos iões carbonato, o que gera implicações biológicas para os organismos marinhos que requerem minerais de carbonato nas suas conchas e esqueletos (Raven 2005b). Estima-se que este processo tenha reduzido o pH do oceano em cerca de 0,1 unidades, até aos dias de hoje, relativamente aos valores registados antes da revolução industrial, no séc. XIX (Orr et al. 2005). No entanto, o continuado aumento das emissões de CO₂ para a atmosfera e a deflorestação são factores considerados pelo IPCC para estabelecer um cenário de decréscimo dos valores de pH que poderá ser de 0,4 unidades até ao final do século 21 e 0,7 unidades até 2250 (Caldeira & Wickett 2003). Segundo Feely et al. (2004), o pH dos oceanos poderá atingir valores que não terão ocorrido durante os últimos 20 milhões de anos. Alterações desta ordem de grandeza naturalmente afectam os organismos marinhos, principalmente aqueles com estruturas calcificadas, já que são dissolúveis em

meios ácidos, tais como corais, foraminíferos, moluscos e equinodermes (Guinotte & Fabry 2008).

Para se compreender o efeito da acidificação do oceano a nível de uma espécie é importante determinar quais os estados do ciclo de vida que são mais sensíveis a estas mudanças do ambiente. Usualmente, são os estados reprodutivos e larvares que são mais afectados com as mudanças do ambiente (Alonso et al. 2007), sendo que o stress ambiental pode afectar a altura da desova, a qualidade dos gâmetas e o sucesso da fertilização (Schreck 2001). De acordo com Gosselin & Qian (1997) a mortalidade dos invertebrados marinhos, incluindo os organismos bentónicos calcificados, excede os 90% durante o estado larvar no seu habitat natural.

1.2 Efeitos da acidificação na reprodução dos organismos marinhos

Quando expostos a altos níveis de CO₂ e baixo pH, muitos organismos conseguem regular o seu sistema ácido-base através de um efeito tampão do ião bicarbonato intra e extracelular (Pörtner et al. 2005). Por sua vez, a longo-prazo, o custo energético destes mecanismos pode ter consequências noutros processos fisiológicos (Michaelidis et al. 2005). Caso haja uma incompleta regulação do balanço ácido-base, o crescimento e reprodução podem ser afectados directamente (Pörtner et al. 2005).

O aumento de CO₂ na água do mar, a diferentes níveis, tem impactos no ciclo de vida dos organismos bentónicos calcificados em diferentes estados ontogénicos tendo como consequência a alteração da sua distribuição e a diminuição da abundância. Como tal, impactos na fertilização e reprodução podem directamente causar o aumento da mortalidade e a diminuição do tamanho da população (Kurihara 2008).

A energia investida nos gâmetas e na reprodução é acompanhada por custos fisiológicos cuja energia é retirada das reservas, no entanto em ambientes de stress pode ocorrer a libertação dos gâmetas ou a sua reabsorção (Stoeckmann & Garton 2001). Assim, a exposição à água acidificada pode levar os organismos a reabsorverem os seus gâmetas como uma estratégia de sobrevivência para poupança de energia (Bibby et al. 2008; Fabry et al. 2008). Um estudo recente efectuado na Ria Formosa sugere que a acidificação da água do mar causada pelo CO₂ pode causar um atraso na gametogénese em ameijoia-boia, *Ruditapes decussatus* (Range et al. 2011).

1.3 Reprodução de *Mytilus spp*

Um dos organismos que têm merecido especial atenção quanto às alterações climáticas e acidificação dos oceanos são os bivalves e particularmente os mexilhões (Michaelidis et al. 2005; Berge et al. 2006; Gazeau et al. 2010). De facto os mexilhões são calcificadores com elevada importância económica. São também considerados “engenheiros do ecossistema” (sensu Jones, Lawton, & Shachak 1994), uma vez que o seu bisso reforça a estabilidade do sedimento e fornece habitat a pequenos invertebrados ou “fauna críptica”, sendo ainda uma importante fonte de alimento para outros organismos como aves e humanos (Nagarajan, Lea, & Gosscustard 2006).

Os mexilhões são geralmente dióicos, já tendo havido referência de casos de hermafroditismo (Seed, 1969). Normalmente produzem gâmetas e desovam pela primeira vez quando têm cerca de um ano de idade. Em condições ambientais adversas podem, contudo, apresentar taxas de crescimento reduzidas e a maturidade sexual por vezes não é atingida antes dos dois anos de idade (Newell 1989).

A gametogénese, a desova e o armazenamento de nutrientes fazem parte de um processo integral denominado ciclo reprodutivo. Este ciclo é resultado de um complexo balanço entre factores exógenos (ex: disponibilidade de alimento, temperatura, salinidade, duração da exposição ao ar, pH) e factores endógenos (reservas de nutrientes, ciclo hormonal e genótipo) (Seed 1969). Assim sendo, a interacção entre estes factores assegura a sincronização do desenvolvimento dos gâmetas dentro da população (Newell 1989). Existem vários índices utilizados para se determinar eventos gametogénicos nos bivalves, tais como: variação sazonal do diâmetro do oócito, uma vez que esta medida está associada aos estados gametogénicos (Maloy 2001); diminuição drástica do peso seco em cinzas do tecido mole (Mallet & Carver 1995); o índice gonado-somático, que é considerado o método mais eficiente para se fazer uma avaliação do estado de desenvolvimento sexual do indivíduo (Blanco, Suárez, & San Juan 2006); e o índice de condição (Joaquim et al. 2008), que considera não só a quantidade de gâmetas mas também a quantidade de tecido conjuntivo no manto (Duinker et al. 2008).

A pré-vitelogénese (i.e formação de oógonias e espermatogónias) ocorre durante o Inverno até ao início da Primavera, aquando da disponibilidade de alimento é menor. A energia utilizada para este acontecimento é suportada por reservas de glicogénio requeridas durante o período de pós-desova (Newel & Hilbish 1982; Thompson &

Sciences 1984) e armazenadas em células especializadas, designadas de adipogranulares, do tecido conjuntivo do manto (Bayne, Gabbott, & Widdows 1975).

A vitelogénese (estado final da gametogénese, quando os espermátócitos e os oócitos estão formados), usualmente ocorre num período relativamente curto de algumas semanas no final da Primavera (Newell 1989). A energia utilizada neste processo, tal como na pré-vitelogénese, é retirada das reservas de glicogénio ou de alimento ingerido. Os gâmetas estão então prontos para serem libertados no entanto, se a desova for retardada, os gâmetas degeneram-se e são reabsorvidos (Newell 1989). A quantidade de glicogénio armazenado durante o período de repouso pode, também, influenciar a fecundidade, a qualidade dos oócitos e o desenvolvimento larval (Fearman & Moltshaniwskyj 2010).

Na altura da desova a gónada ocupa uma parte considerável do peso do corpo, podendo contribuir com cerca de 35% para o peso edível (Widdows, Fieth, & Worrall 1979). A gónada estende-se por quase todo o corpo do mexilhão excepto o pé, brânquias e músculos (Sprung 1983). Assim sendo, os tecidos de reserva de glicogénio decrescem no manto durante a gametogénese e aumentam nos períodos de repouso (Lubet 1959). Nesta fase, o sexo dos mexilhões pode ser distinguido através da coloração da gónada, cor esbranquiçada para os machos e alaranjada nas fêmeas (Figura 1) (Yeats, Gagné, & Hellou 2008).

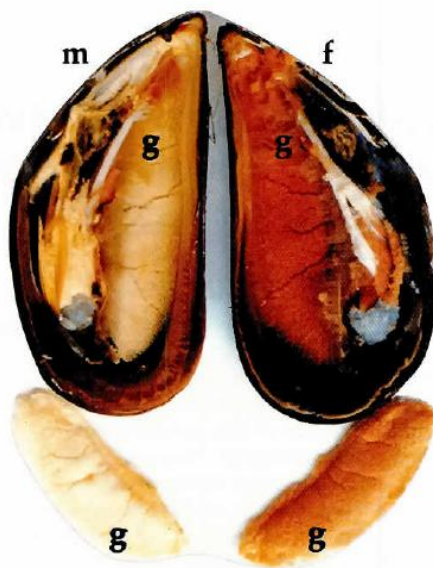


Figura 1: Mexilhão maduro, macho e fêmea aberto, cuja valva contém a gónada e outros tecidos da parte edível; m= macho, f= fêmea, g= gónada (Mikhailov, Torrado, & Méndez 1995).

A fecundação é externa: as fêmeas libertam milhares de ovos para a coluna de água que são fecundados pelos espermatozoides que são simultaneamente libertados pelos machos (Newell 1989).

1.4 *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*

Atualmente, a existência de *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) e *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) é um assunto em discussão, uma vez que não se sabe se se trata de duas espécies distintas, ou da mesma espécie ou de duas sub-espécies de *M. edulis*, uma vez que são muito similares podendo apresentar algumas distinções (Villalba 1995). Segundo Skibinski, Beardmore & Cross (1983) os mexilhões azuis (nome comum) do género *Mytilus* consistem num taxon complexo e bem diferenciado. Como tal, *M. edulis* e *M. galloprovincialis* diferem morfológicamente (McDonald, Seed, & Koehn 1991), fisiologicamente (Hilbish 2005) e geneticamente (Skibinski, Beardmore, & Cross 1983). No entanto são conhecidos por hibridar, uma vez que co-habitam em algumas áreas, como as costas norte, sul e oeste da Irlanda e costas norte e oeste da França (López et al. 2002). Embora possam hibridar, apresentam identidades genéticas relativamente distintas, principalmente porque as suas formas taxonómicas e as suas características estão fisiologicamente adaptadas a diferentes províncias biogeográficas (Schneider et al. 2005; Śmietanka et al. 2004). Segundo Seed (1976), existem duas teorias diferentes sobre a sua existência geográfica. Uma delas considera que o *M. edulis* estende-se por toda a costa atlântica desde a Europa até ao norte de África e a outra considera que o *M. galloprovincialis* é o mexilhão predominante na costa atlântica da Península Ibérica.

1.5 Objectivos

Com este estudo pretendeu-se avaliar experimentalmente o efeito da acidificação água do mar por CO₂ na gametogénese de *Mytilus edulis*. De acordo com os cenários indicados pelo IPCC até final do século XXI, as reduções de pH testadas foram de -0,4 e -0,7 unidades relativamente ao pH natural. As variáveis de resposta consideradas foram, especificamente: o índice de condição, índice gonado-somático, estado de maturação, diâmetro dos oócitos, evolução temporal do estado reprodutivo e rácio sexual e composição da concha.

2 Metodologias

2.1 Amostragens

Em 30 de Março de 2010 foram recolhidos cerca de 600 mexilhões, na praia do Farol, ilha da Culatra (Latitude: 36°58'15,02"E; Longitude: 7°51'58,95"O). Destes foram retirados cerca de 15 machos e 15 fêmeas para determinações de histologia e bioquímica. Os restantes indivíduos foram para o sistema de cultivo em condições de pH controlado, instalado na Estação de Moluscicultura do INRB/IPIMAR, em Tavira. Utilizaram-se três níveis de pH: dois níveis de pH reduzido, em -0,4 e -0,7 unidades relativamente ao pH normal da água e um terceiro em que o pH não foi manipulado (pH controlo). Os mexilhões foram divididos por 9 tanques de 15 litros (3 replicados de cada tratamento), com cerca de 60 indivíduos em cada tanque com sistema aberto e adição de CO₂. Nos meses seguintes foram feitas novas amostragens do meio natural e dos mexilhões do sistema de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1: Desenho experimental de todas as determinações efectuadas ao longo de toda a experiência. AMN: amostragem do meio natural; AT: amostragem dos tanques (2011)

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
Índice de Condição	AMN	AMN	AMN	AMN	AMN	AMN
Índice Gonado-Somático	AMN	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT
Histologia	AMN	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT
Peso concha seca	AMN	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT
Bioquímica	AMN	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT	AMN; AT
Total de mexilhões	AMN: 60	AMN: 30 AT 36	AMN: 30 AT: 90	AMN: 30 AT: 90	AMN: 30 AT: 90	AMN: 30 AT: 90

2.2 Sistema de cultivo

Foi utilizada água da Ria Formosa, previamente filtrada e arejada durante cerca de 2 a 3 dias, para estabilizar a concentração em oxigénio dissolvido e os valores de pH durante

a experiência. Utilizou-se um sistema de fluxo contínuo, regulado manualmente por uma válvula de PVC, para minimizar a interferência dos resíduos metabólicos dos organismos. Cada nível de pH foi replicado em três tanques de 15l, com um caudal de cerca de 140ml/min. Os tanques dos diferentes tratamentos foram intercalados e a sua posição alterada de duas em duas semanas, para evitar qualquer artefacto experimental devido à disposição espacial.

O controlo de pH da água do mar, nos tanques de pH reduzido, foi feito através da difusão do CO₂ puro em reactores fechados (*Aqua Medic* – reactor 1000), instalados no abastecimento de água, antes dos tanques experimentais. O fluxo de gás do tanque de CO₂ para o reactor foi controlado por um sistema de controlo de pH (*Aqua Medic AT Control*), que abria ou fechava a electro-válvula quando as leituras de pH, dos tanques experimentais, estavam 0,1 unidades abaixo ou acima dos valores pré-determinados. Estes valores pré-determinados foram definidos em relação aos valores de pH medidos nos tanques de controlo e ajustados manualmente quando era necessário.

A temperatura, a salinidade e o pH foram monitorizados, de 3h em 3h, durante a experiência usando eléctrodos *Aqua Medic* e um controlador de dados. As leituras automáticas foram validadas com uma multisonda *YSI 556*. A salinidade foi calibrada com um salinómetro *Autosal*, usando água standart IAPSO com uma variação de coeficiente de 0,003%. Os eléctrodos de pH foram regularizados com água tampão Tris (com uma força iónica de 0,7M), com uma precisão de 0,14%.

O alimento disponibilizado aos mexilhões foi produzido na Estação de Moluscicultura de Tavira onde decorreu a experiência e era composto por uma mistura de razão 1:1 de 2 litros de microalgas *Isochrysis galbana* (clone T-ISO) e *Chaetoceros calcitrans*, com uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^6$ na manga de cultivo. O alimento era adicionado aos tanques duas vezes ao dia, para garantir que nunca era limitante para os indivíduos. Os tanques foram limpos dois dias por semana, utilizando água doce, sem adição de qualquer outro produto.

2.3 Histologia

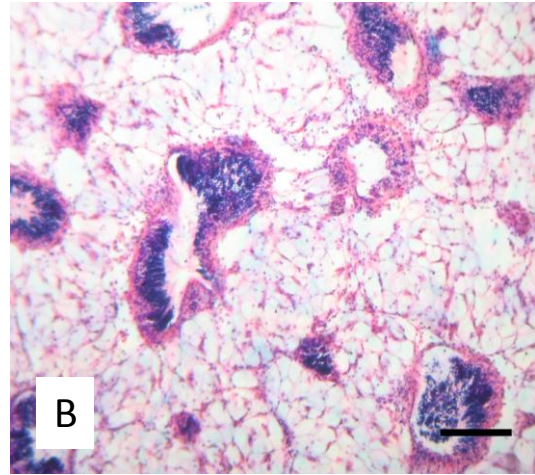
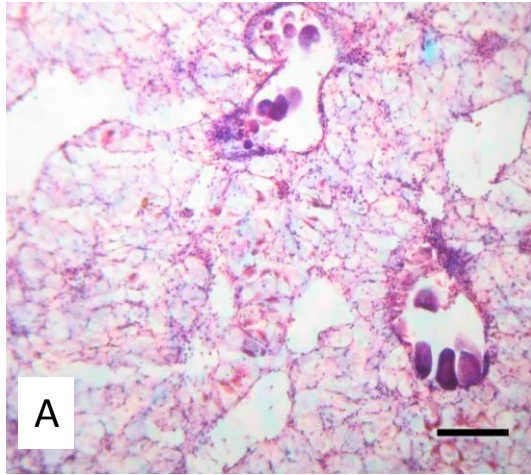
Após cada amostragem, as gónadas foram retiradas com um bisturi, pesadas individualmente numa balança AND de precisão de $\pm 0,01$ g e colocadas em cassetes de histologia, marcadas previamente. Seguidamente foram fixadas durante 48h em fixador Davidson (Howard & Smith 1983). Decorridas as 48h as amostras foram lavadas em

água corrente durante cerca de 1h e conservadas em álcool 70°, de acordo com procedimento descrito por Herrmann et al. (2009).

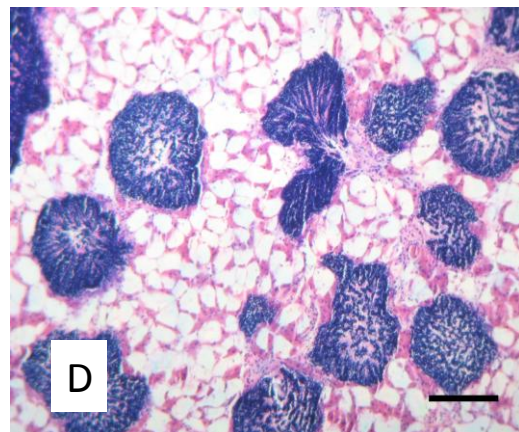
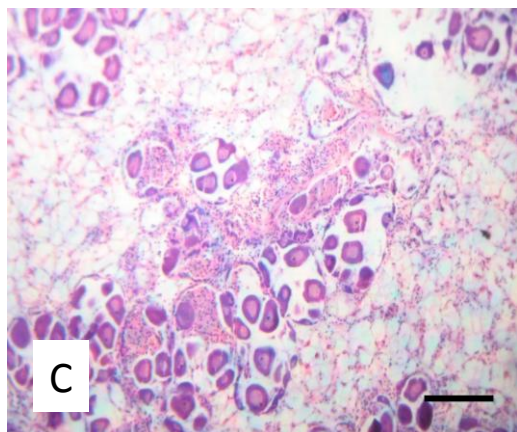
Posteriormente (cerca de 1 a 2 semanas depois) foi feita a desidratação das amostras num processador de tecidos *Leica Jung 1020* e a inclusão destas em parafina num dispensador *Leica EG1140H* (Joaquim et al. 2008). As gónadas em parafina foram cortadas, numa espessura de 7 µm, utilizando para tal um micrótomo *Leica RM 2155*. Foram feitos entre 2 a 6 cortes, dependendo do tamanho da gónada, que foram colocados, com utilização de um pouco de albumina para facilitar a montagem, em lâminas identificadas (Maloy 2001). Posteriormente, os cortes foram desparafinados e desidratados em sucessivos banhos de xilol e etanol com concentrações decrescentes, desde 100% a 50% (Alonso 2007). Os cortes histológicos das gónadas foram corados com hematoxilina-eosina. A montagem entre lâmina e lamela foi feita com resina sintética (DPX) (Howard & Smith 1983; Maloy 2001).

2.4 Identificação dos estados de gametogénese

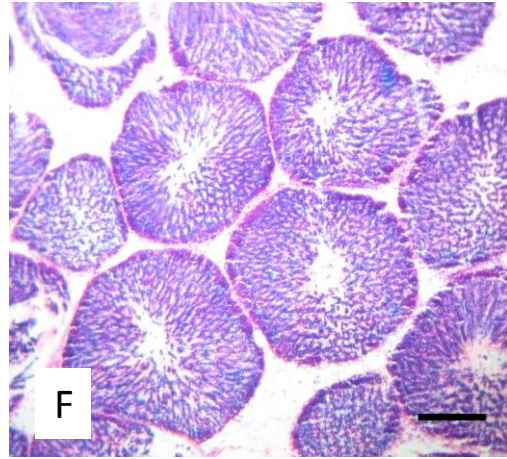
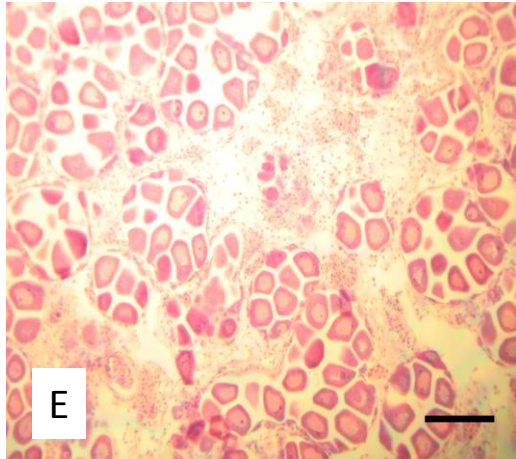
Depois de secas as amostras foram observadas num microscópio numa ampliação de 100x, procedendo-se à identificação dos estados de maturação de cada indivíduo, baseado na escala de Duinker (2008), uma vez que foi a que mais se adequou às características histológicas observadas. Foi acrescentado o estado 4 (desova) uma vez que a escala de Duinker (2008) não caracterizava este estado. Os oócitos foram também medidos com uma ocular micrométrica. Foram considerados os seguintes estados (Figura 2):



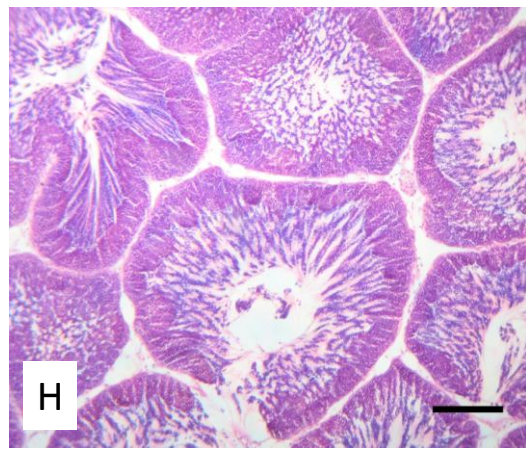
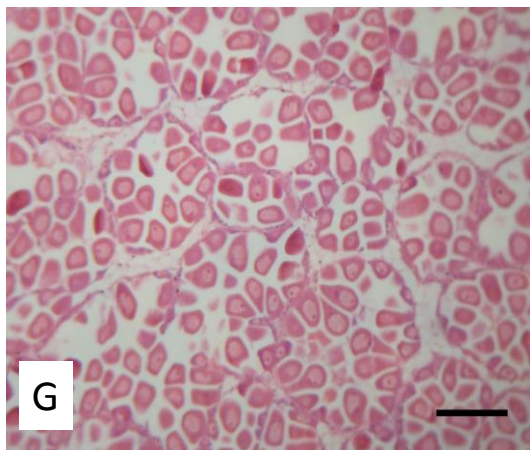
Estado 0 (repouso): estado dominado por tecido do manto, identificando-se pouco tecido gonadal. Normalmente não se consegue identificar o sexo. As células acini, nas fêmeas, podem ser identificadas se existirem oócitos em estado pré-vitelogénese. Já nos machos as células acini podem ser identificadas pela presença de células de esperma em estado inicial, espermátides ou espermatozóides.



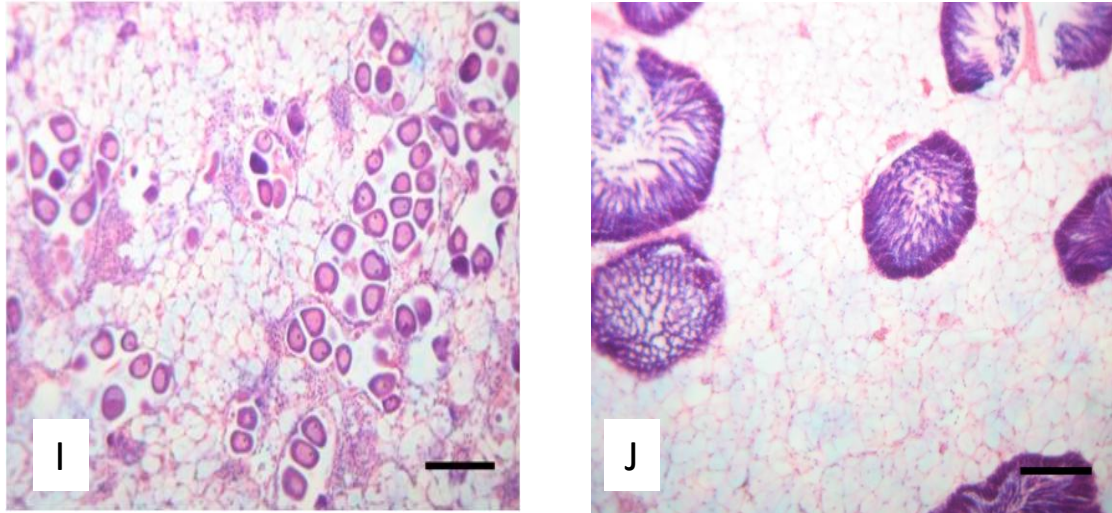
Estado 1 (inicio gametogénese): as células acini são facilmente identificados e o sexo é facilmente determinado. Muitos oócitos estão no início da vitelogénese e alguns já estão maduros. Nos machos as células imaturas do esperma ocupam pelo menos metade das células acini. Os gâmetas maduros residuais podem ser observados individualmente, recuperando da desova.



Estado 2 (gametogénesis): muitos oócitos estão em vitelogénese avançada, com grânulos do vitelo e o invólucro da célula visíveis mas ainda agarrados às paredes das células acini. A maior parte dos oócitos já estão soltos e bastante maduros. Os machos têm mais espermátides mas ainda possuem muitas células de esperma imaturas.



Estado 3 (maturo): este estado é muito similar ao estado 2 mas a proporção de gâmetas maduros nas células acini é maior e a proporção de tecido gonadal em relação ao tecido conjuntivo é normalmente maior.



Estado 4 (desova): emissão total ou parcial dos gâmetas. Neste estado observam-se algumas células maduras juntamente com bastante tecido conjuntivo, conseguindo-se identificar o sexo dos indivíduos devido à presença de oócitos ou espermatozóides.

Figura 2: Identificação de todos os estados de maturação de fêmeas e machos ao microscópio. A- fêmea estado 0; B- macho estado 0; C- fêmea estado 1; D- macho estado 1; E- fêmea estado 2; F- macho estado 2; G- fêmea estado 3; H- macho estado 3; I- fêmea estado 4; J- macho estado 4. Escala: 100 µm

2.5 Índice de condição (IC)

2.5.1 Indivíduos do meio natural

Os indivíduos provenientes do meio natural foram pesados numa balança de precisão AND de $\pm 0,01g$ e medidos com uma craveira com uma precisão de 0,01mm. Seguidamente retirou-se toda a parte edível com um bisturi e colocou-se num cadinho previamente pesado na mesma balança de precisão. Posteriormente colocou-se tudo a secar numa estufa a cerca de 60°C, durante 24h.

O índice foi calculado através da seguinte fórmula (Labarta et al. 2005):

IC= (peso seco parte edível/ peso seco concha)

2.5.2 Indivíduos do sistema de cultivo

Aos indivíduos provenientes do sistema de cultivo foi-lhes retirada a parte edível para a análise histológica. Não foi feito índice de condição para estes indivíduos, uma vez que

lhes foi retirada a gónada para os estudos histológicos e bioquímicos e para o índice de condição é necessária toda a parte edível incluindo a gónada.

2.6 Índice gonado-somático (IGS)

O índice gonado-somático é o método considerado mais eficiente para se fazer uma avaliação do estado de desenvolvimento sexual do indivíduo. Foi calculado este índice para se ter uma ideia mais clara sobre o desenvolvimento da gónada de cada indivíduo. A parte edível dos indivíduos do sistema de cultivo foi retirada com um bisturi e pesada numa balança de precisão AND de $\pm 0,01$ g, juntamente com as gónadas. Posteriormente estas foram pesadas individualmente na mesma balança.

O índice foi calculado através da seguinte fórmula (Grant & Tyler 1983):

IGS: (peso da gónada) / (peso da gónada + peso da parte edível)

2.7 Indução de postura

A indução da postura foi efectuada a 9 de Setembro, depois de todas as amostragens realizadas, por choque térmico. 18 indivíduos de cada tratamento, juntamente com indivíduos provenientes do meio natural foram retirados dos tanques de diferente pH e colocados a -4°C durante cerca de 24h, após o que foram colocados em tanques diferentes com água aquecida a cerca de 28°C . Passado uma hora, os mexilhões foram colocados novamente a -4°C durante cerca meia hora e passado o tempo, colocados novamente a 28°C . Estes choques térmicos foram repetidos 3 vezes. Simultaneamente efectuou-se uma escarificação de um mexilhão, neste caso macho, deitando-se aos poucos a suspensão de esperma nos tanques a fim de estimular a desova (Utting & Spencer 1991). Não houve sucesso com este procedimento, não havendo qualquer taxa de desova.

2.8 Composição da concha

Depois de retirada a parte edível, as conchas foram secas durante 24h a 60°C , para determinar o peso seco (Michaelidis et al. 2005). Decorridas 24h pesaram-se as conchas numa digital AND com precisão de $\pm 0,01$ g. O peso inorgânico foi determinado pela pesagem das conchas depois de queimadas na mufla durante 14 horas a 450°C . O peso

orgânico da concha foi determinado subtraindo o peso inorgânico ao peso seco (Michaelidis et al. 2005).

2.9 Análise de dados

As hipóteses acerca dos efeitos da acidificação por CO₂ na gametogénese dos mexilhões foram testadas por análises de variância (ANOVA) de um ou dois factores. As amostragens em meio natural (AMN) foram sempre consideradas como um controle assimétrico relativamente aos 3 tratamentos de pH controlado (AT – Amostragem Tanques), pelo seguinte procedimento:

- as diferenças entre os 4 tratamentos foram determinadas numa ANOVA com todos os dados; nos casos em que não se verificaram diferenças significativas a análise foi terminada neste passo;
- as somas de quadrados relativas às diferenças entre os 3 níveis de pH controlado foram determinadas numa segunda ANOVA, excluindo os dados de AMN;
- A comparação *a priori* AMN vs. AT foi feita subtraindo as somas de quadrados da 2ª ANOVA às da 1ª.

Em alguns casos, o “Sexo” foi considerado como um segundo factor nas análises, sendo fixo e ortogonal ao “Tratamento”. Em todas as análises o pressuposto da homogeneidade de variâncias foi testado pelo teste de Cochran. Diferenças entre médias foram consideradas significativas para $p < 0.05$. Quando apropriado, foram utilizados testes de comparação múltipla de médias Student Newman Keuls (SNK), para identificar grupos que diferiram significativamente.

3 Resultados

3.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os valores de pH mantiveram-se estáveis, como resultado do controlo automático efectuado (Figura 3), existindo uma clara diferenciação entre os três tratamentos. No entanto, registou-se um aumento dos valores no tratamento pH-0,7 durante o último mês, como consequência de um pequeno aumento de temperatura. Os valores de pH variaram para os vários níveis de controlo testados, dentro dos limites estabelecidos.

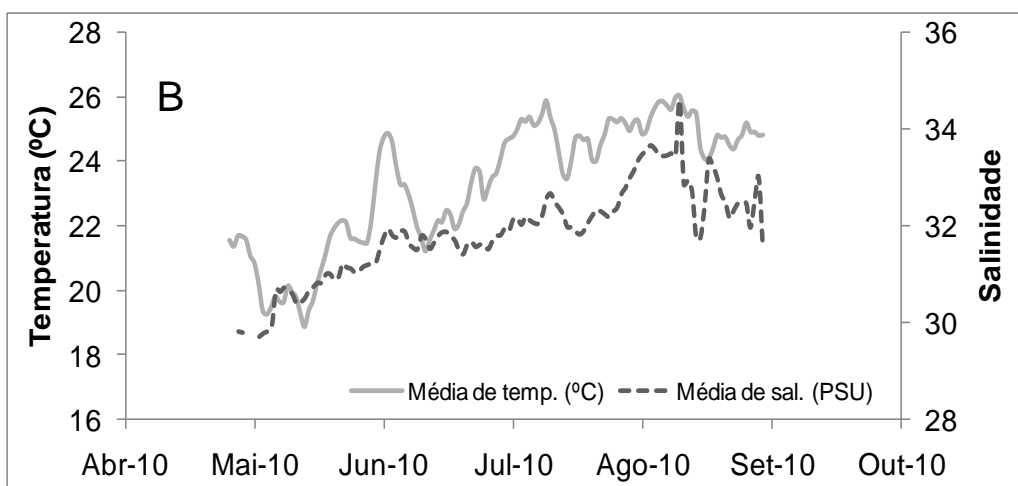
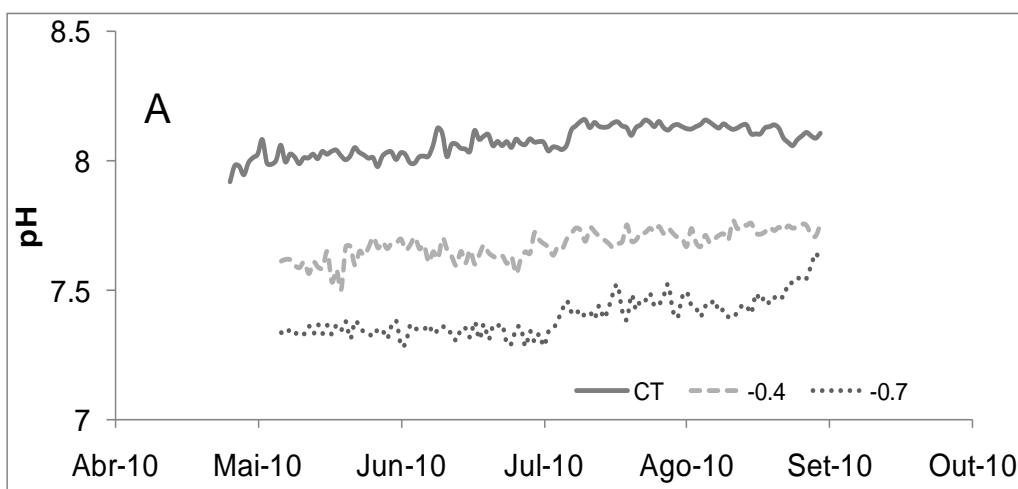


Figura 3: Média diária de valores para pH (A), temperatura e salinidade (B) para a água dos tanques experimentais.

A temperatura variou entre os $19.25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.144$ e os $25.67\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0$, apresentando algumas oscilações, mas com uma tendência crescente durante os 4 meses de duração da

experiência. Os valores de salinidade variaram geralmente entre os $29,73 \pm 0$ e os $33,48 \pm 0$, havendo um ponto máximo de 38.61 ± 2.5 no mês de Agosto.

3.2 Índice gónado-somático (IGS)

Não foram registadas diferenças significativas do índice gónado-somático (IGS) entre os 3 níveis de pH considerados. Em contraste, foram detectadas diferenças significativas entre sexos para todas as amostragens (Tabela 2). De facto, os valores de IGS dos machos foram consistentemente superiores aos das fêmeas, independentemente do tratamento (Figura 4). Nos indivíduos do meio natural os valores de IGS mantiveram-se relativamente constantes ao longo do tempo, enquanto que no sistema de cultivo o IGS apresentou uma tendência decrescente. Assim, a partir do mês de Junho os indivíduos do meio natural apresentam valores de IGS significativamente superiores aos do sistema de cultivo, que não diferiram entre si (Tabela 2)

Tabela 2: Análise de variância para o índice gonado-somático em cada mês de amostragem. O sexo e o tratamento são factores fixos ortogonais; grupos de amostras com heterogeneidade de variância (Cochran's tests, $p < 0.05$) são marcados #; os asteriscos mostram diferenças significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n = 3 (AMN: amostragem meio natural; AT: amostragens nos tratamentos; Tr: tratamento)

Fonte de variação	gl	Abril		Maio		Junho #		Julho		Agosto	
		MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
Tratamento	3										
AMN vs AT	1	177.91	13.52	0.15	0.04	173.48	64.41 ***	140.19	64.21 ***	273.15	106.45 ***
Entre AT	2	2.65	0.20	2.87	0.73	3.19	1.18	0.16	0.07	3.04	1.18
Sexo	1	60.09	4.56 *	144.42	36.59 ***	29.02	10.77 **	115.07	52.70 ***	55.03	21.44 ***
Tr vs Sex	3	9.27	0.70	13.68	3.47 *	1.12	0.41	11.78	5.40	5.37	2.09
Residuo	16	13.16		3.95		2.69		2.18		2.57	

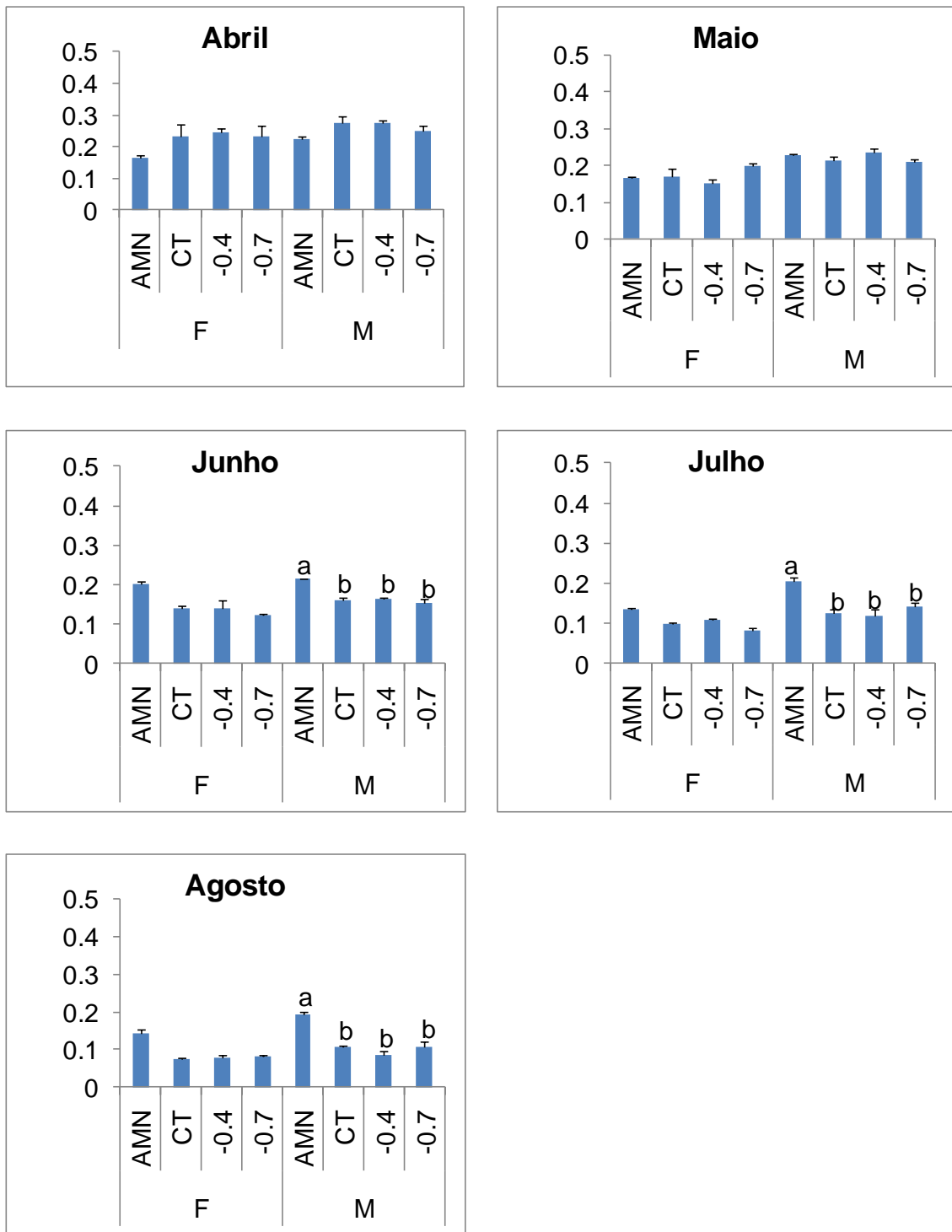


Figura 4: Índice gonado-somático (média ± erro padrão) para cada mês de amostragem. F- fêmeas; M- machos; AMN- amostragem meio natural; CT- controle; pH: -0,4; pH: -0,7. letras a e b indicam grupos de médias que diferem significativamente.

3.3 Índice de condição (IC)

Comparando os valores dos dois índices utilizados para quantificar o estado reprodutivo dos mexilhões em meio natural (IGS e IC), verifica-se que, embora os valores do IGS sejam superiores, existe uma relação directa entre os dois índices (Figura 5). Quando um índice aumenta ou diminui o outro também aumenta ou diminui com excepção do mês de Agosto em que a relação é inversa. O valor máximo para ambos os índices registou-se no mês de Junho, sendo o IC = $0,12 \pm 0,001$ e o IGS = $0,209 \pm 0,005$. O IC apresenta o seu mínimo em Maio ($0,82 \pm 0,0009$) e o IGS em Agosto ($0,177 \pm 0,005$).

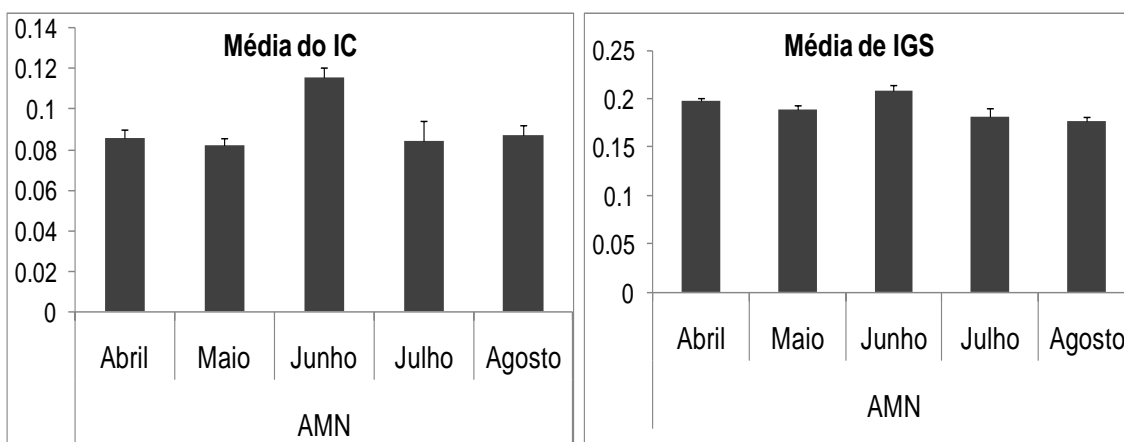


Figura 5: Índice de condição (média \pm erro padrão) e índice gonado- somático (média \pm erro - padrão) para todas as amostragens em meio natural. IC- índice de condição; IGS- índice gonado- somático; AMN- amostragens meio natural

3.4 Estados de gametogénese

Na primeira amostragem do meio natural (Abril) os valores médios de estados de maturação não apresentavam variações significativas entre tratamentos ou sexos (). Em Maio foi possível observar maior número de fêmeas em estado maturo no tratamento pH -0,7, do que nos restantes níveis de pH ou no meio natural. Em relação aos machos, não houve diferenças significativas, o que resulta na interacção observada (Tr x Sex - Tabela 3). A partir do mês de Junho verificaram-se diferenças significativas apenas entre os sexos, sendo que o estado de maturação das fêmeas foi consistentemente inferior ao dos machos, para todos os tratamentos. Esta tendência acentuou-se nos meses de Julho e Agosto, em que a larga maioria das fêmeas se encontrava em estado zero, enquanto os machos se encontram maioritariamente no estado 2, independentemente do tratamento.

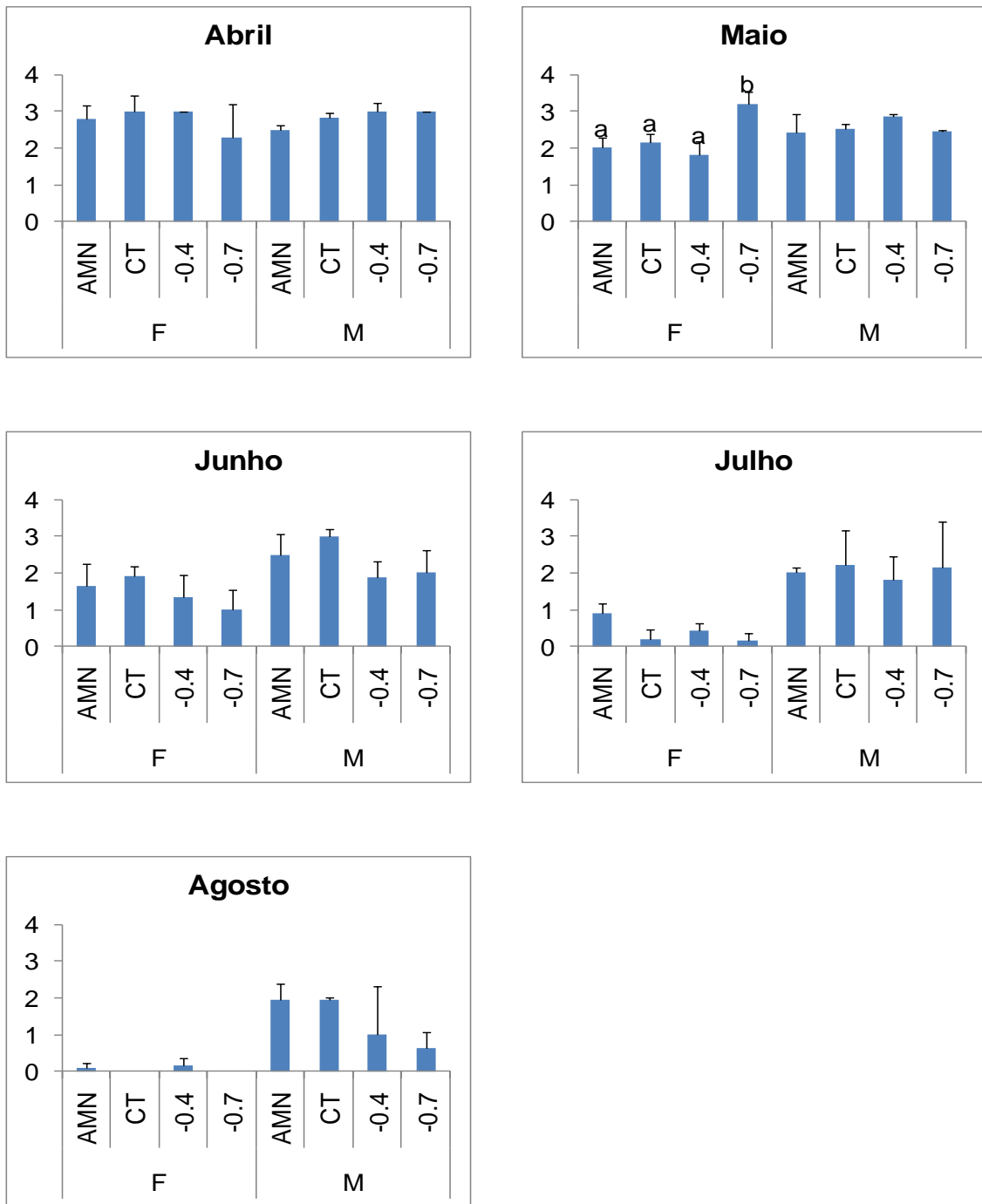


Figura 6: Estados de maturação (média \pm erro padrão) em cada mês de amostragem. F- fêmeas; M- machos. AMN- amostragem meio natural; CT- controle; pH: -0,4; pH: -0,7. letras a e b indicam grupos de médias que diferem significativamente.

Tabela 3: Análise de variâncias para o estado de maturação em cada mês de amostragem. O sexo e o tratamento são factores fixos ortogonais; grupos de amostras com variância de heterogeneidades (Cochran's tests, $p < 0.05$) são marcados #; os asteriscos mostram diferenças significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$

Fonte de variação	df	Abril #		Maio		Junho		Julho		Agosto #	
		MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
Tratamento	3										
AMN vs AT	1	0.13	0.27	15.12	6.08 *	0.91	1.05	0.26	0.23	0.57	0.69
Entre AT	2	0.68	1.45	0.48	0.19	2.23	2.60	0.39	0.35	0.59	0.71
Sexo	1	0.60	1.27	0.23	0.93	6.32	7.36 *	16.17	14.39 **	11.82	14.32 **
Tr vs Sex	3	0.56	1.19	8.32	3.35 *	0.15	0.17	0.62	0.55	0.53	0.64
Residuo	16	0.47		2.49		0.86		1.12		0.83	

3.5 Diâmetro dos oócitos

Na primeira amostragem não se registaram diferenças significativas do tamanho médio dos oócitos (Tabela 4). No mês de Maio os indivíduos do meio natural apresentaram valores significativamente inferiores aos do sistema de cultivo (Tabela 4) e o tratamento pH: -0,7 apresentou os valores mais elevados (Figura 5). A partir de Junho o tamanho médio dos oócitos é consistentemente superior nos indivíduos de meio natural, embora essa diferença não seja significativa. Para o mês de Agosto a maioria das fêmeas encontrava-se no estado de maturação zero, não existindo, assim, oócitos para serem medidos com excepção dos bivalves recolhidos no meio natural e do tratamento de pH: -0,4 em que existiam alguns oócitos mas pequenos. O valor máximo dos oócitos medidos no meio natural foi de $60 \mu\text{m} \pm 0,05$ no mês de Abril e o valor mínimo foi de $36 \mu\text{m} \pm 0,04$, em Agosto. Já para o sistema de cultivo o valor máximo foi de $63 \mu\text{m} \pm 0,04$ para o tratamento de controlo no mês de Abril e o valor mínimo foi de $36 \mu\text{m} \pm 0,04$ para o tratamento de pH: -0,4 no mês de Agosto.

Tabela 4: Análise de variâncias para o tamanho médio dos óocitos em cada mês de amostragem; o tratamento é um factor fixo; grupos de amostras com heterogeneidade de variâncias (Cochran's tests, $p < 0.05$) estão identificados com #; os asteriscos denotam diferenças significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 2$

Fonte de variação	gl	Abril #		Maio		Junho #		Julho		Agosto	
		MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
Tratamento	3										
AMN vs AT	1	74.15	0.26	75.43	14.41 *	449.60	3.13	1853.78	4.57	60.49	0.27
Entre AT	2	337.04	1.18	32.53	6.21	265.98	1.85	193.83	0.48	193.83	0.87
Residuo	8	286.21		5.24		143.60		405.32		224.07	

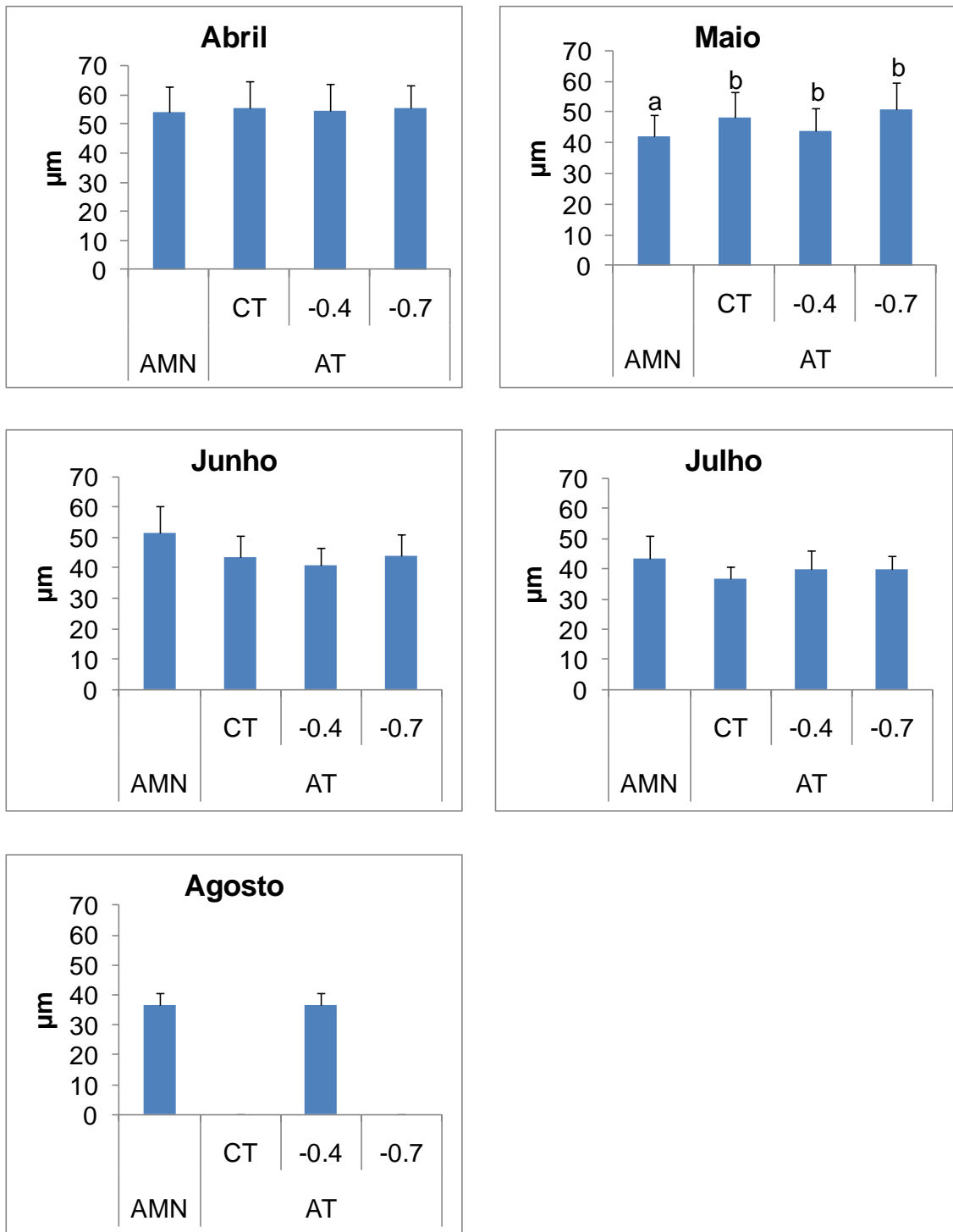


Figura 7: Diâmetro dos óocitos (média \pm erro padrão) para cada mês de amostragem; AMN- amostragem meio natural. AT- mostragem tanques (CT- controlo; pH: -0,4; pH: -0,7). As letras a e b identificam grupos que diferiram significativamente ($p < 0,05$).

3.6 Evolução temporal do estado reprodutivo e rácio sexual

Os mexilhões mantidos no sistema de pH controlado apresentaram alterações acentuadas no estado gametogénico das gónadas e um decréscimo do índice gonadosomático ao longo da experiência, independentemente do nível de pH (Figura 8). O padrão foi particularmente claro para as fêmeas sendo que, a partir de Julho, a maioria (80% a 124%) se encontrava em estado zero (repouso). Já em relação aos machos verificou-se em Agosto, no meio natural e no pH controlo, o mesmo número de indivíduos nos estados zero e 4. Nos indivíduos do meio natural a alteração do estado gametogénico, ao longo do tempo foi pouco notável.

O rácio sexual (n° machos / n° fêmeas) variou consideravelmente ao longo da experiência (Figura 8). De facto, nos meses de Abril, Maio e Junho o rácio aproxima-se de 1, não existindo diferenças significativas entre tratamentos (Tabela 5). Já nos meses de Julho e Agosto rácio difere significativamente entre os indivíduos do meio natural (AMN: $M > F$) e os do sistema de pH controlado (AT: $F \geq M$), independentemente do nível de pH.

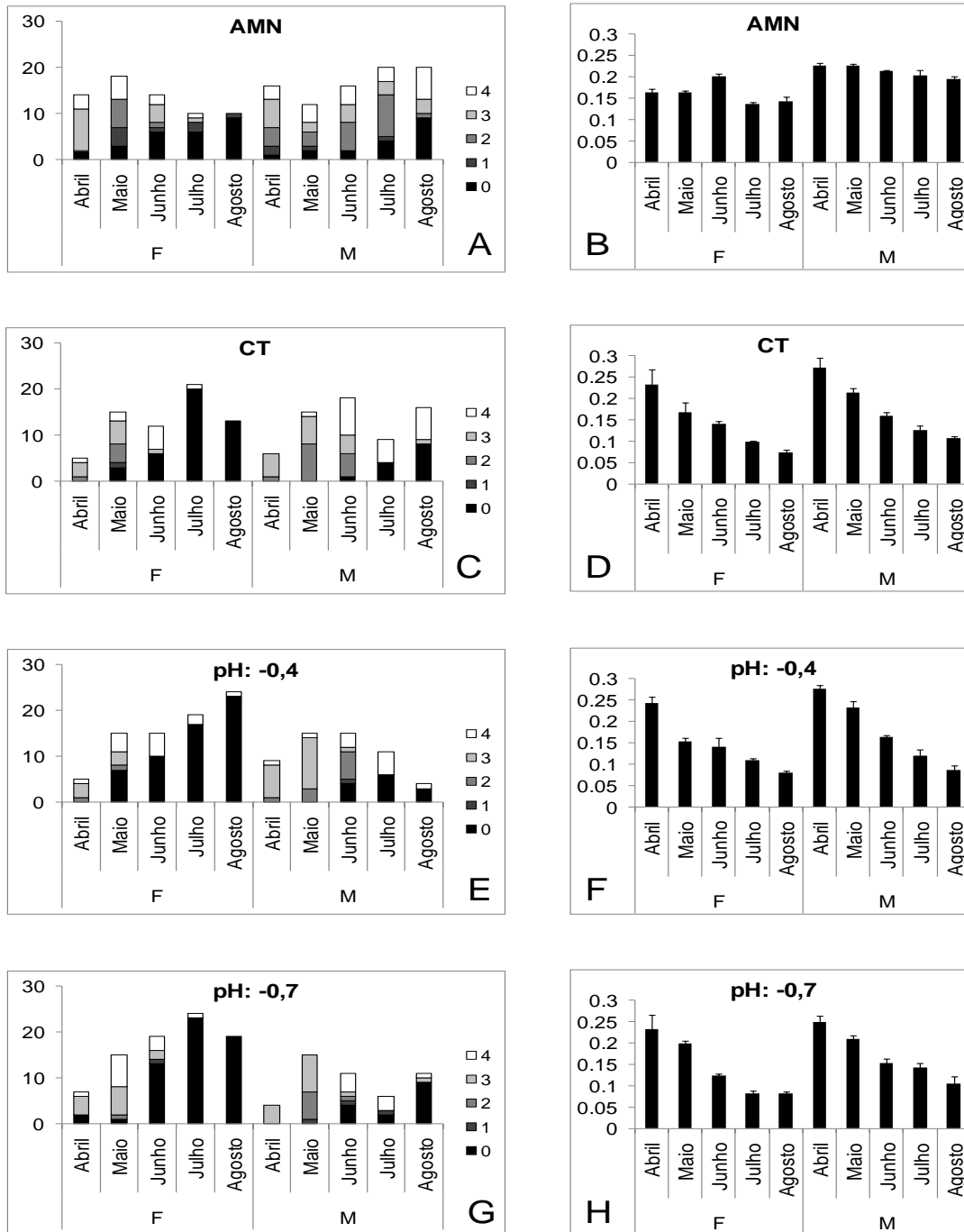


Figura 8: Gráficos A, C, E e G – média do número de indivíduos em cada estado de maturação em cada mês de amostragem. F- fêmeas, M- machos; Gráficos B, D, F e H – Índice gonado- somático (média ± erros padrão) para cada mês de amostragem. F- fêmeas; M- machos; Número de indivíduos amostrados em Abril =36; restantes meses =90

Tabela 5: Análise de variâncias para o rácio sexual em cada mês de amostragem. O tratamento é um factor fixo; grupos de amostras com heterogeneidade de variâncias (Cochran's tests, $p < 0.05$) estão identificados com #; os asteriscos denotam diferenças significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$

Fonte de Variação	gl	Abril		Maio		Junho		Julho		Agosto #	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Tratamento	3										
AMN vs AT	1	0.04	0.03	0.29	1.88	0.20	0.43	5.80	50.08 ***	3.58	7.73 *
Entre AT	2	1.26	1.04	0.00	0.00	0.74	1.59	0.08	0.73	0.95	2.04
Residuo	8	1.22		0.15		0.46		0.12		0.46	

3.7 Composição da concha

Nos meses de Maio e Agosto os indivíduos do meio natural apresentaram valores médios de peso seco da concha significativamente superiores aos do sistema de pH controlado, que não diferiram entre si (Tabela 6A). No mês de Maio a média para o meio natural foi de $9,099 \pm 0,179$ g e para o pH controlado de $7,057 \pm 0,284$ g. Para o mês de Agosto a média para o meio natural foi de $9,293 \pm 0,222$ g e para pH controlado foi de $7,862 \pm 0,371$ g.

O peso da concha para os indivíduos do meio natural é superior para os indivíduos com maior peso de matéria orgânica (Figura 9A) e menor peso de matéria inorgânica (Figura 9B). Para o peso da matéria orgânica as diferenças foram significativas em todas as amostragens, excepto em Julho (Tabela 6C). Relativamente ao peso da matéria inorgânica, as diferenças foram significativas apenas no mês de Maio (Tabela 6B).

Tabela 6: Análise de variâncias para o peso seco da concha (A); peso inorgânico (B) e peso orgânico (C) em cada mês de amostragem. O tratamento é um factor fixo; grupos de amostras com heterogeneidade de variâncias (Cochran's tests, $p < 0.05$) estão identificados com #; os asteriscos denotam diferenças significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$

A	Fonte de variação	gl	Abril		Maio		Junho		Julho		Agosto	
			MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
	Tratamento	3										
	AMN vs AT	1	0.10	0.04	93.82	18.99 **	2.45	0.15	0.13	0.01	48.75	5.66 *
	Entre AT	2	5.90	2.34	10.30	2.08	5.96	0.37	7.81	0.68	16.57	1.92
	Residuo	8	2.52		4.94	1.00	16.20		11.42		8.61	

B	Fonte de variação	gl	Maio		Junho		Julho		Agosto	
			MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
	Tratamento	3								
	AMN vs AT	1	38.68	8.87 *	17.17	1.11	12.65	1.20	28.67	3.73
	Entre AT	2	0.97	0.22	0.58	0.04	0.70	0.07	1.56	0.20
	Residuo	8	4.36		15.49		10.56		7.69	

C	Fonte de variação	gl	Maio		Junho		Julho		Agosto	
			MQ	F	MQ	F	MQ	F	MQ	F
	Tratamento	3								
	AMN vs AT	1	554.19	12.50 **	317.48	11.00 *	27.29	0.14	160.60	12.56 **
	Entre AT	2	10.30	0.23	2.51	0.09	451.99	2.25	15.02	1.17
	Residuo	8	44.33		28.87		201.22		12.79	

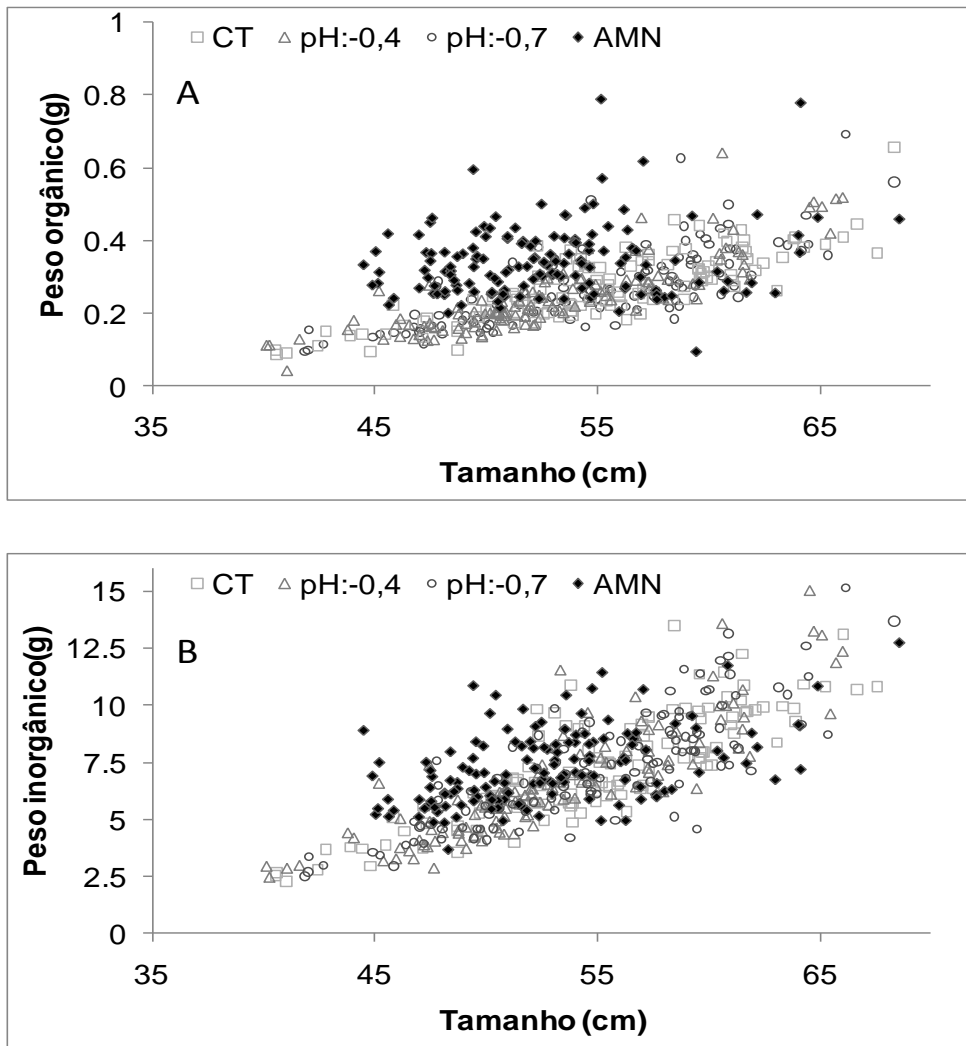


Figura 9: Relação do comprimento da concha com: (A) o peso orgânico da concha em todas as amostragens e (B) o peso inorgânico da concha em todas as amostragens;

3.8 Mortalidade

Durante os 4 meses de duração da experiência e independentemente do tratamento morreram em média 5 a 6 indivíduos por tanque, o que se traduz numa taxa de mortalidade inferior a 10%.

4 Discussão

A concentração de CO₂ atmosférico tem vindo a aumentar, tal como a sua diluição no oceano, com a conseqüente redução dos valores de pH. Por conseqüência muitos organismos marinhos são afectados, principalmente os calcificados. Como tal, é importante testar experimentalmente o efeito potencial da redução do pH na gametogénese e no sucesso reprodutivo do mexilhão, *M. edulis*.

Como já referido existem vários índices indicativos do estado fisiológico e que podem relacionar-se com a ocorrência de eventos gametogénicos em bivalves, um deles é o índice gonado-somático. Nesta experiência os valores mínimos encontrados, para as amostragens no meio natural, foram nos meses de Verão (Julho e Agosto), depois do valor máximo ter ocorrido no mês de Junho, indicando uma desova dos mexilhões. Segundo Blanco, Suárez, & San Juan (2006) os menores valores do índice gónado-somático ocorrem no final da Primavera inícios de Verão, para indivíduos recolhidos no Estuário de Vigo, com temperaturas a rondar os 15°C e os 17°C. Estes valores ocorrem depois da desova principal, coincidindo com o observado no presente estudo, não sendo os meses coincidentes. Segundo este autor a disponibilidade de alimento é menor, o que pode justificar esta diminuição do valor do índice, o que coincide com este estudo uma vez que se trata de amostragens no meio natural.

As diferenças significativas nos valores de IGS entre as fêmeas e os machos, nos vários tratamentos, podem ser justificada pela não resistência das fêmeas a um ambiente stressante, despoletando uma desova. No entanto, os indivíduos do meio natural, a partir de Junho, apresentam valores superiores aos dos de sistema de cultivo, podendo indicar que o stress causado pelas condições de cultivo pode ter conduzido a um evento de desova. Segundo os dados obtidos, foi uma desova parcial, pelo menos para os machos, uma vez que não houve emissão total dos gâmetas.

Outro índice referido é o índice condição (IC). O valor máximo obtido para este índice no presente estudo foi no mês de Junho, em indivíduos do meio natural (0,12), estando de acordo com os resultados obtidos por Duinker et al. (2008) para a mesma espécie, com dois anos (cerca de 5,1 ± 0,5 cm de comprimento e 12,4g de peso, estando perto das medidas dos mexilhões utilizados nesta experiência) na Noruega Ocidental. Este autor atribui este pico em Junho à acumulação de tecido conjuntivo e de gâmetas, aumentando o número de indivíduos no estado 3 (maturo), combinado com uma

actividade de desova reduzida ou inexistente. No entanto, segundo Cravo et al. (2009), o valor mais alto foi obtido no Verão (0,146), para indivíduos recolhidos na costa sul de Portugal com uma salinidade 36,9 e uma temperatura de 19°C. Segundo estes autores este aumento do valor de índice de condição no Verão, deve-se a um aumento de temperatura.

Outro estudo feito foi a determinação do diâmetro dos oócitos. Para o mês de Maio observou-se uma diferença significativa entre o meio natural e o sistema de cultivo, sendo o diâmetro dos oócitos no meio natural inferior aos restantes tratamentos. Isto pode significar que pode ter ocorrido um pequeno evento de desova no meio natural. O superior tamanho médio dos oócitos nos indivíduos de meio natural, relativamente aos do sistema de cultivo, foi aparente nos meses de Junho e Julho, não sendo esta diferença significativa. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de as fêmeas no sistema de cultivo terem tido um evento de desova massivo, não havendo início de outro ciclo gametogénico, enquanto que as do meio natural tiveram uma desova continua durante esse período (Maloy 2001).

Os estados de gametogénese também foram estudados, uma vez que também são um bom indicador de eventos de desova. Os mexilhões em situações adversas apresentam várias estratégias de desova (Maloy, 2001). Assim sendo, a diferença significativa entre os níveis de pH registada unicamente para as fêmeas no mês de Maio pode indicar um retardamento da desova no nível de pH -0,7, ou seja um desfasamento da reprodução entre machos e fêmeas. Este padrão poderá corresponder a uma estratégia de acumulação de reservas de glicogénio para o seu crescimento ou para uma futura desova, eventualmente despoletado por algum stress ambiental associado ao sistema de cultivo (Alonso et al. 2007). Não parecem ter ocorrido eventos massivos de desova para os machos durante o estudo, tanto no meio natural como no sistema de cultivo. Isto pode indicar que os machos utilizaram a energia reservada para o crescimento ou para outros processos fisiológicos. Holcomb, Cohen, & McCorkle (2011) descrevem um padrão semelhante num estudo com o coral *Astrangia poculata*, concluindo que o maior investimento reprodutivo nas fêmeas traduz a sua maior sensibilidade aos níveis de CO₂ na água, relativamente aos machos.

Para os indivíduos do sistema de cultivo o estado predominante no início das amostragens era o estado 3 (maturo), tanto para fêmeas como para machos, não coincidindo com o estado predominante no final das amostragens, sendo este o estado 0

(repouso) para as fêmeas e estado 1 e 2 para os machos. Já para os indivíduos do meio natural, o mesmo não acontece, uma vez que o estado predominante no início das amostragens era o estado 3, tanto para fêmeas como para machos e no final era o estado 0 para as fêmeas e estado 2 para os machos. Esta diferença de estados predominantes pode indicar que algum stress justificado pela temperatura, salinidade ou disponibilidade de alimento, que passou a ser maior no final desta experiência, uma vez que a quantidade de alimento foi a mesma em toda a experiência mas o número de indivíduos em cada tanque foi diminuindo, o que terá despoletado eventos de desova que não ocorreram no meio natural. Estes eventos de desova foram massivos para as fêmeas do sistema de cultivo, uma vez que no final das amostragens estavam praticamente todas em estado zero (repouso). Em relação aos machos do sistema de cultivo não se verificou o mesmo que as fêmeas, uma vez que houve regressão de estado durante as amostragens. Ao longo da experiência os estados de gametogénese dos indivíduos deveriam seguir uma evolução natural dos estados de 0 para 4, o que não acontece. Isto é particularmente evidente em Maio, para o pH -0,4, uma vez que o estado predominante é o estado 3 e em Junho o estado predominante é 2, sendo suposto ser o estado 4 o estado predominante. Segundo Beesley et al (2008) a regressão de estado ocorre quando os animais ficam expostos a ambientes stressantes, levando a uma necessidade de reabsorção de tecido para recuperação de energia para outros processos vitais, tais como a respiração. No entanto estas alterações podem-se dever às alterações dos factores físico- químicos como a temperatura, salinidade que aumentaram (Alonso et al. 2007) e quantidade de alimento (Newell & Hilbish 1982) e não directamente à redução do pH. Existem estudos relacionados com os efeitos da acidificação para esta e outras espécies mas para outros factores que não a gametogénese, nomeadamente a mortalidade e dissolução da concha de amêijoas (Bamber 1987), efeitos nos ovos e larvas de mexilhão (Gazeau et al. 2010), efeitos na qualidade do mexilhão (Beesley et al. 2008), efeitos no desenvolvimento embrionário e fecundação de ostra (Parker, Ross, & O'Connor 2009). Existe ainda um estudo sobre a gametogénese de *M. galloprovincialis*, mas incide sobre os efeitos da temperatura (Fearman & Moltschaniwskyj 2010) e não da acidificação.

Outro aspecto estudado foi o rácio sexual, uma vez que ao longo da experiência se notou diferenças entre o número de fêmeas e o número de machos. Esta diferença é mais notável no final da experiência e dificilmente poderá ser justificada pela

mortalidade existente, pois esta foi bastante reduzida e não diferiu entre os níveis de pH considerados, afigurando-se como causa mais provável algum erro de identificação do sexo na determinação dos estados gametogénicos. Ainda assim, não é possível excluir que a mortalidade tenha incidido preferencialmente nos machos, uma vez que quando os indivíduos eram encontrados mortos já não possuíam parte edível de modo a ser possível identificar o sexo.

A composição da concha, em relação aos seus componentes orgânicos e inorgânicos, foi outro aspecto estudado nesta experiência (Beesley et al. 2008; Hubbard, McManus, & Al-Dabbas 1981). Este índice foi desenvolvido porque durante a experiência foi verificado que alguns indivíduos apresentavam danos no periostracum, principalmente na zona do umbo, o que poderia facilitar a dissolução da concha. A diferença observada entre os indivíduos do meio natural e os do sistema de cultivo não pode ser justificada pelo tamanho dos indivíduos, que diferiu apenas nos meses de Abril e Julho, em sentido oposto ao verificado para o peso orgânico (os indivíduos do sistema de cultivo eram de maiores dimensões). O peso inorgânico apenas diferiu no mês de Maio, enquanto que o peso orgânico diferiu em todos os meses, excepto Junho. Estas diferenças não podem portanto ser atribuídas aos diferentes níveis de pH, mas a um artefacto experimental, provavelmente devido à presença de organismos epífitos (cracas, algas) que não tenham sido completamente removidos dos indivíduos do meio natural.

5 Considerações finais

Durante esta experiência ocorreram períodos de emissão, mesmo em ambiente de pH reduzido, uma vez que os mexilhões nesses tratamentos apresentaram alterações no estado gametogénico das suas gónadas. Alguns dos indicadores de eventos gametogénicos estudados, como o índice gónado-somático, o diâmetro dos oócitos e o rácio sexual, sofreram alterações associadas aos diferentes níveis de pH. Essas alterações foram, no entanto, inconsistentes, o que dificultou a sua interpretação e a atribuição de causalidade. No entanto, a diferença observada nos estados de gametogénese das fêmeas sugere um retardamento da desova no tratamento de acidificação mais extremo (pH-0,7). O desfasamento do desenvolvimento reprodutivo entre os sexos afigura-se assim como um potencial efeito da acidificação por CO₂ no sucesso reprodutivo de *M. edulis*. A curta duração desta experiência (4meses), também não foi suficiente, uma vez, que abrangeu apenas um pico de reprodução, não havendo uma longa adaptação dos indivíduos maduros aos diferentes níveis de pH na época de desova. Como tal, é difícil prever quais os efeitos da acidificação na reprodução *M. edulis* com base nos resultados obtidos. Sugere-se assim um estudo mais longo, abrangendo pelo menos um ciclo anual, de modo possibilitar uma análise mais conclusiva sobre os efeitos da acidificação sobre a reprodução desta espécie.

Referências

- Alonso, P.S., González, C.Á., García, P.M., San, F. & Serrano, J. (2007) Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultivado en la ría de Vigo (Noroeste de la Península Ibérica). *Instituto Español de Oceanografía*, **23**, 3-10.
- Bamber, R. (1987) The effects of acidic sea water on young carpet-shell clams *Venerupis decussata* (L.) (Mollusca: Veneracea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **108**, 241-260.
- Bayne, B.L., Gabbott, P.A. & Widdows, J. (1975) Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **55**, 675-689.
- Beesley, A., Lowe, D., Pascoe, C. & Widdicombe, S. (2008) Effects of CO₂-induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. *Climate Research*, **37**, 215-225.
- Berge, J.A., Bjerkeng, B., Pettersen, O., Schaanning, M.T. & Øxnevad, S. (2006) Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere*, **62**, 681-7.
- Bibby, R., Widdicombe, S., Parry, H., Spicer, J. & Pipe, R. (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology*, **2**, 67-74.
- Blanco, S.L., Suárez, M.P. & San Juan, F. (2006) Seasonal changes of nucleotides in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, **143**, 384-90.
- Caldeira, K. & Wickett, M.E. (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Most*, 1-7.
- Cravo, A., Lopes, B., Serafim, A., Company, R., Barreira, L., Gomes, T. & Bebianno, M.J. (2009) A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, **11**, 1673-86.
- Duinker, A., Håland, L., Hovgaard, P. & Mortensen, S. (2008) Gonad development and spawning in one and two year old mussels (*Mytilus edulis*) from Western Norway. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **88**, 1465.
- Fabry, V.J., Seibel, B. A., Feely, R. A. & Orr, J.C. (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, **65**, 414-432.
- Fearman, J. & Moltschaniwskyj, N. A. (2010) Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, **305**, 20-25.

- Feely, R. A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V.J. & Millero, F.J. (2004) Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science (New York, N.Y.)*, **305**, 362-6.
- Gazeau, F., Gattuso, J.P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., Heip, C.H.R. & Middelburg, J.J. (2010) Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*, **7**, 2051-2060.
- Gosselin, L. & Qian, P. (1997) Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, **146**, 265-282.
- Grant, A. & Tyler, P. (1983) The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. 1. Introduction and statistical- analysis of gonad indexes and maturity indexes. *International Journal Of Invertebrate Reproduction*, **6**, 259-269
- Guinotte, J.M. & Fabry, V.J. (2008) Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1134**, 320-42.
- Herrmann, M., Alfaya, J.E.F., Lepore, M.L., Penchaszadeh, P.E. & Laudien, J. (2009) Reproductive cycle and gonad development of the Northern Argentinean *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Helgoland Marine Research*, **63**, 207-218.
- Hilbish, T.J. (2005) Implications of movement behavior on mussel dislodgement : exogenous selection in a *Mytilus spp.* hybrid zone. *Marine Biology*, **146**, 333-343.
- Holcomb, M., Cohen, a L. & McCorkle, D.C. (2011) A gender bias in the calcification response to ocean acidification. *Biogeosciences Discussions*, **8**, 8485-8513.
- Howard, D.W. & Smith, C.S. (1983) Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks. *Fisheries (Bethesda)*.
- Hubbard, F., McManus, J. & Al-Dabbas, M. (1981) Environmental influences on the shell mineralogy of *Mytilus edulis*. *Geo-Marine Letters*, **1**, 267-269.
- Joaquim, S., Matias, D., Lopes, B., Arnold, W. & Gaspar, M. (2008) The reproductive cycle of white clam *Spisula solida* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Aquaculture*, **281**, 43-48.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. & Shachak, M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**, 373-386.
- Kurihara, H. (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, **373**, 275-284.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Garrido, J., Babarro, J., Bayona, J. & Albaigés, J. (2005) Response of mussel recruits to pollution from the ‘Prestige’ oil spill along the Galicia coast. A biochemical approach. *Marine Ecology Progress Series*, **302**, 135-145.

- Lubet, P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **23**, 395- 547.
- López, J., Marina, A., Vázquez, J. & Alvarez, G. (2002) A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Marine Biology*, **141**, 217-223.
- Mallet, A.L. & Carver, C.E. (1995) Comparative growth and survival patterns of *Mytilus trossulus* and *Mytilus edulis* in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 1873–1880.
- Maloy, A. (2001) Gametogenic cycles of Marine Mussels, *Mytilus Edulis* and *Mytilus Trossulus*, in Cobscook Bay, Maine. Thesis for the degree of Master Science in Marine Biology
- McDonald, J.H., Seed, R. & Koehn, R.K. (1991) Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Marine Biology*, **111**, 323-333.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Palaras, A. & Pörtner, H. (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, **293**, 109-118.
- Mikhailov, a T., Torrado, M. & Méndez, J. (1995) Sexual differentiation of reproductive tissue in bivalve molluscs: identification of male associated polypeptide in the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *The International Journal of Developmental Biology*, **39**, 545-8.
- Mladineo, I., Peharda, M., Orhanović, S., Bolotin, J., Pavela-Vrančić, M. & Treursić, B. (2007) The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgoland Marine Research*, **61**, 183-192.
- Nagarajan, R., Lea, S. & Goss-custard, J. (2006) Seasonal variations in mussel, *Mytilus edulis* L. shell thickness and strength and their ecological implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **339**, 241-250.
- Newell.R, Hilbish. T, Koehn, R. and Newell, C. (1982) Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus Edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Journal of Fish Biology*, **162**, 299-310.
- Newell, R. (1989) Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (North and Mid- Atlantic). *Biological Report*, **82**, 11-102.
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.-K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig,

- M.-F., Yamanaka, Y. & Yool, A. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, **437**, 681-686.
- Parker, L.M., Ross, P.M. & O'Connor, W.A. (2009) The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biology*, **15**, 2123-2136.
- Peharda, M., Mladineo, I., Bolotin, J., Kekez, L. & Skaramuca, B. (2006) The reproductive cycle and potential protandric development of the Noah's Ark shell, *Arca noae* L.: Implications for aquaculture. *Aquaculture*, **252**, 317-327.
- Pörtner, H.O., Langenbuch, M. & Michaelidis, B. (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research*, **110**, 1-15.
- Range, P., Chícharo, M. a, Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, a P. & Chícharo, L. (2011) Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased pCO₂ and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Raven, J. (2005a) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *Coral Reefs*, **12**, 60.
- Raven, J. (2005b) Ocean acidification due to increasing. *Coral Reefs*.
- Sabine, C.L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T. & Rios, A.F. (2004) The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science (New York, N.Y.)*, **305**, 367-71.
- Schneider, K., R., Wethey, D.S., Helmuth, B.S.T & Hilbish, T.J. (2005) Implications of movement behavior on mussel dislodgement: exogenous selection in a *Mytilus spp.* hybrid zone. *Marine Biology*, **146**, 333-343.
- Schreck, C. (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, **197**, 3-24.
- Seed, R. (1976) *Ecology. In: Marine mussels: Their ecology and physiology*, BL Bayne (ed) Cambridge Univ Press, Cambridge pp.13-65.
- Seed, R. (1969) The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia*, **3**, 277-316.
- Skibinski, D.O.F., Beardmore, J.A. & Cross, T.F. (1983) Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, **19**, 137-183.

- Śmietanka, B., Zbawicka, M., Wołowicz, M. & Wenne, R. (2004) Mitochondrial DNA lineages in the European populations of mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Biology*, **146**, 79-92.
- Sprung, M. (1983) Reproduction and fecundity of the mussel *Mytilus edulis* at Helgoland (North sea). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **36**, 243-255.
- Stoeckmann, A.M. & Garton, D.W. (2001) Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *Journal of the North American Benthological Society*, **20**, 486-500.
- Thompson, R.J. & Sciences, M. (1984) The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. *Water*, **288**, 277-288.
- Utting, S.D.; Spencer, B. (1991) The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. *Fisheries Research*, Lowestoft, **68**, 31pp
- Villalba, A. (1995) Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, **130**, 269-277.
- Widdows, J., Fieth, P. & Worrall, C.M. (1979) Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **50**, 195-207.
- Yeats, P., Gagné, F. & Hellou, J. (2008) Body burden of contaminants and biological effects in mussels: an integrated approach. *Environment International*, **34**, 254-64.