

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia



**Ritmos de postura do sargo (*Diplodus sargus*) e da
safia (*Diplodus vulgaris*). Identificação da microflora
associada aos ovos**

(Tese para a obtenção do grau de mestre no ramo de Aquacultura e Pescas,
especialidade de Aquacultura)

Cátia Margarida Lopes Ribeiro dos Santos

Faro
(2011)

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Ritmos de postura do sargo (*Diplodus sargus*) e da safia
(*Diplodus vulgaris*). Identificação da microflora associada aos

OVOS

(Tese para a obtenção do grau de mestre no ramo de Aquacultura e Pescas,
especialidade de Aquacultura)

Cátia Margarida Lopes Ribeiro dos Santos

Dissertação orientada por: Professora Doutora Maria Teresa Dinis, Doutora Catarina
Oliveira e Doutora Florbela Soares

Faro
(2011)

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Teresa Dinis pela oportunidade de trabalhar neste projecto, onde tanto aprendi, e também pelas dicas finais para esta tese.

À Doutora Florbela Soares e à Doutora Catarina Oliveira pelo acompanhamento, orientação e ensinamento durante estes meses de trabalho.

Ao Doutor Pedro Pousão pela oportunidade de trabalhar e aprender nas instalações da EPPO-IPIMAR.

Às pessoas que todos os dias se esforçam por tratar bem dos “peixinhos” no IPIMAR de Olhão, e também àquelas que lá estiveram mas já se foram embora, pelo apoio moral, pelo que me ensinaram, pelo que me ajudaram um muito obrigada.

Aos meus amigos por me proporcionarem bons momentos de distração, que também são precisos.

À minha família pelo apoio que sempre me deram.

Resumo

Uma das características mais marcantes da reprodução em teleósteos de zonas temperadas peixes é a sazonalidade. No entanto, a reprodução não deve ser considerada um fenómeno exclusivamente anual, visto poder apresentar também uma ritmicidade lunar e diária em alguns casos. Neste estudo foram investigados os ritmos estacionais e diários de postura em duas espécies da família Sparidae, na safia (*Diplodus vulgaris*) e no sargo (*Diplodus sargus*), bem como o seu possível controlo endógeno em condições de luz constante (LL) no sargo. A época de postura da safia e do sargo, neste estudo, teve uma duração de cerca de dois meses e de cinco meses, tendo deixado de desovar abaixo dos 15° C e dos 12 ° C, respectivamente. Ambas as espécies apresentaram ritmos diários de postura muito marcados, ocorrendo um pico por volta das 21h00. No caso do sargo, quando os peixes foram expostos a um fotoperíodo LL, o ritmo de postura manteve-se durante os cinco dias de ensaio, sugerindo a presença de um relógio endógeno a controlar este ritmo. Contudo, após a mudança do ciclo LL de novo para o fotoperíodo inicial, luz/escuridão (LD), os peixes ressincronizaram a sua postura, atrasando-a 4 horas durante os primeiros dias, após os quais voltaram ao ritmo de postura inicial. Um conhecimento mais aprofundado destes ritmos em espécies cultivadas em aquacultura representa uma mais-valia na melhora dos protocolos de produção de ovos nas maternidades. Assim como o conhecimento da composição específica e quantidades relativas de bactérias normalmente associadas aos ovos. Neste estudo o número total de bactérias presentes nos ovos de safia rondou os 10^5 - 10^6 ufc.g⁻¹ e 10^4 - 10^5 ufc.g⁻¹ nos ovos de sargo. Os géneros identificados nos ovos de ambas as espécies foram *Vibrio* e *Aeromonas*, bem como *Flavobacterium* e *Micrococcus* nos ovos de safia.

Palavras-chave: *Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, Ritmos estacionais, Ritmos diários, Posturas, Ovos, Flora bacteriana.

Abstract

One of the most striking features of fish reproduction is the seasonality. However, reproduction should not be considered an exclusively annual phenomenon since it can also show a lunar or daily rhythmicity. In this study we investigated the seasonal and the daily spawning rhythm in two species of the Sparidae family, the banded seabream (*Diplodus vulgaris*) and the white seabream (*Diplodus sargus*) and its possible endogenous control in conditions of constant light (LL) in the white seabream. The banded seabream and the white seabream spawning season, in this study, had a duration of about two months and five months, having stopped to spawn below 15° C and 12 ° C, respectively Both species showed very marked daily spawning rhythms, with a peak occurring around 21h00. In the case of the white seabream, when fish were exposed to an LL photoperiod, the spawning rhythm remained during the five days of the experiment, suggesting the presence of an endogenous clock mechanism controlling this rhythm. However, after changing the LL cycle back to the initial light/dark (LD) photoperiod, fish resynchronized their spawning, delaying 4 hours during the first days, after which they returned the initial rhythm. A more deepen knowledge of these rhythms in species cultivate in aquaculture represents an advantage for the optimization of eggs production protocols in hatcheries. As well as the knowledge of the composition and relative amounts of bacteria, normally associated with the eggs of each species. In this study the total number of bacteria present in banded seabream eggs was around $10^5 - 10^6$ cfu.g⁻¹ and $10^4 - 10^5$ cfu.g⁻¹ in white seabream eggs. The genera identified in eggs of both speacies were *Vibrio* and *Aeromonas*, as well as *Flavobacterium* and *Micrococcus* in banded seabream eggs.

Keywords: *Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, Seasonal rhythms, Daily rhythm, Spawning, Eggs, Bacterial flora.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO	1
1. Aquacultura.....	1
2.Reprodução em peixes	2
3.Ritmos Biológicos	3
3.1. <i>Ritmos de reprodução em peixes</i>	6
a) <i>Ritmos sazonais</i>	6
b) <i>Ritmos lunares</i>	6
c) <i>Ritmos diários</i>	7
4. Qualidade de ovos de peixe e microflora ambiental	8
5. Caracterização das espécies	10
6. Objectivos	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
Condições de estabulação	13
A - Ritmos de postura	14
Experiência 1: Ritmos estacionais de postura	14
Experiência 2: Ritmos diários de postura	14
a) <i>Ritmos circadianos de postura do sargo</i>	15
B – Colonização Bacteriana dos ovos	16
Análise de dados	16
RESULTADOS	18
Experiência 1: Ritmos estacionais de postura na safia e no sargo	18
Experiência 2: Ritmos diários de postura na safia e no sargo	20
a) <i>Quantidade de ovos ao longo do dia</i>	20
b) <i>Estados de desenvolvimento</i>	22
c) <i>Taxas de eclosão</i>	25
d) <i>Ritmos circadianos de postura do sargo</i>	26
Colonização Bacteriana dos ovos	27
a) <i>Carga bacteriana e relação com a temperatura</i>	27
b) <i>Percentagem de Vibrio</i>	28
c) <i>Taxa de eclosão</i>	29
d) <i>Identificação bacteriológica</i>	29
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	36
BIBLIOGRAFIA	38

Introdução

1. Aquacultura

O cultivo de peixes é uma prática milenar, havendo evidências de que na China a aquacultura era praticada desde 2500 a.C. mantendo e alimentando carpas em lagoas, ao passo que os romanos começaram a cultivar peixes em lagos. Na Europa Central os primeiros mosteiros cristãos adoptaram a prática de aquacultura dos romanos sendo as principais espécies a carpa e a truta, tendo-se espalhado durante a Idade Média, em que o peixe era raro e muito caro nas zonas longe da costa ou dos grandes rios (Rabanal, 1988). No entanto, a melhoria dos transportes durante o século 19, levou a um aumento da disponibilidade de peixe mesmo em zonas mais interiores, tornando a aquacultura menos popular. Já no século 20, a partir dos anos 80, a aquacultura europeia desenvolveu-se com fins comerciais, no Mediterrâneo (robalo e dourada) e na Noruega (salmão), regiões ainda hoje com maior produção na Europa.

Hoje em dia a aquacultura é o sector que apresenta um crescimento mais rápido no área da produção alimentar, sendo responsável por 50% do peixe consumido no mundo, e é considerado como tendo maior potencial para atender a procura crescente de pescado (FAO 2010).

Durante muito tempo, a criação de peixes marinhos na região do Mediterrâneo e Ásia era baseada na captura e engorda de juvenis selvagens do mar. Contudo esta técnica pode ter efeitos no recrutamento dos juvenis para os stocks explorados pela pesca. Por esse motivo a necessidade da existência de maternidades tornou-se indispensável na produção de juvenis para engorda. As primeiras maternidades tiveram de enfrentar vários problemas, tais como a estabulação de reprodutores nas condições adequadas para que pudessem produzir ovos de qualidade, a definição de dietas adequadas para as larvas, o estabelecimento de unidades de cultura em massa de produção sincronizada de alimentação viva, formação de pessoal especializado e ainda o controlo de doenças e qualidade das larvas (Moretti *et al.*, 1999). Também o estudo dos ritmos e fenómenos físicos e bioquímicos periódicos que ocorrem nos peixes permite um melhor entendimento dos ciclos biológicos destes animais, o que em aquacultura é uma mais-valia permitindo uma optimização nos protocolos de cultivo de peixe, principalmente no que diz respeito ao ciclo reprodutivo.

2. Reprodução em peixes

O conhecimento do ciclo sexual é um dos aspectos mais importantes no estudo do ciclo de vida dos recursos pesqueiros.

O processo de formação, desenvolvimento e amadurecimento dos gâmetas denomina-se de gametogénese, e o período de postura pode ser mais ou menos extenso e ocorrer em intervalos regulares ou irregulares consoante a espécie. Os estímulos que induzem o desenvolvimento e a reactivação das gónadas podem ser de natureza exógena, factores ambientais como a luz, salinidade, alimento, fase da lua e temperatura, ou endógena, acontecimentos internos relacionados com o crescimento e com a reprodução (Bye, 1984).

Nas espécies de zonas temperadas a desova dá-se normalmente na Primavera, de modo a que as larvas possam alimentar-se dos blooms de fitoplâncton que ocorrem nessa altura. A desova é induzida por factores diferentes dos que induzem a maturação das gónadas, na medida em que estes factores devem ser acontecimentos ambientais de curta duração, enquanto que os que induzem a maturação das gónadas necessitam de ter uma influência mais sustentada, uma vez que é um processo relativamente longo.

A maioria das espécies marinhas têm sexos separados e não mudam de sexo durante toda a sua vida. No entanto, há espécies que apresentam ambos os sexos no mesmo indivíduo (espécies hermafroditas) em simultâneo ou sequencialmente (Hamlett, 2001). A maioria dos casos de hermafroditismo provém de baixas latitudes, cerca de 50% das famílias de peixes teleósteos tropicais contém espécies hermafroditas. O hermafroditismo sequencial pode ser de dois tipos: protogínico, quando as fêmeas mudam de sexo tornando-se machos e protândrico, quando os machos mudam de sexo tornando-se fêmeas. Entre os peixes teleósteos, os membros da família Sparidae apresentam muitas espécies hermafroditas, tanto protogínicas (pargo, choupa, boga) como protândricas (besugo, goraz). A mudança de sexo nas espécies hermafroditas faz-se quando se verificam vantagens adaptativas nessa mudança (Shapiro, 1984).

A fecundação pode ser interna, quando ocorre no corpo do indivíduo que produz os óvulos, ou externa, quando ocorre no meio ambiente fora do corpo. Os peixes ósseos reproduzem-se por fecundação externa em que a fêmea liberta grandes quantidades de oócitos para a água, ao mesmo tempo que um macho ou vários machos libertam esperma, de maneira a garantir a hipótese de encontro entre os gâmetas originado o maior número de zigotos. No entanto, apenas um pequeno número de zigotos consegue

sobreviver às adversidades do meio ambiente e chegar a adultos, dando continuidade à espécie.

O ovo fecundado passa por vários estados de desenvolvimento até ao momento da eclosão. Segundo Kamacı *et al* (2005), na dourada (*Sparus aurata*) a uma temperatura de 18.5°C, o ovo começa as primeiras divisões celulares cerca de 1:00h após a fecundação, atingindo o estado de mórula após cerca de 4:00h. Os estádios seguintes, blástula, gástrula e neurula ocorrem entre as 6:00 e as 16:00h após a fertilização, sendo que a partir das 18:00h já é possível ver o embrião. No entanto, a velocidade a que o ovo se desenvolve depende muito das condições de incubação, principalmente da temperatura.

3. Ritmos biológicos

O ambiente na terra é caracterizado por várias alterações cíclicas que ocorrem com periodicidades diferentes: a periodicidade anual, que está relacionada com a rotação da Terra à volta do sol, a periodicidade lunar associada com a rotação da lua à volta da Terra, e a periodicidade diária, alteração entre luz e escuridão, associada à rotação da Terra sobre o seu eixo.

Estes ciclos actuam nos organismos vivos levando ao aparecimento de osciladores moleculares ou relógios biológicos, que lhes permite medir o tempo e antecipar estas alterações cíclicas no ambiente. O relógio biológico é sincronizado por factores ou sinais denominadas de “*Zeitgebers*” que podem ser abióticos e /ou bióticos. Nos factores abióticos destacam-se os ciclos de luz e temperatura como as de maior relevo no comportamento diário e nos ritmos moleculares (Aschoff, 1981; Ruoff and Resing, 2004), tendo também um importante papel nos ritmos sazonais, como a reprodução dos peixes (Bromage *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005). O período de alimentação é o factor biótico apontado como um forte sincronizador, uma vez que os peixes alimentados à mesma hora durante vários dias demonstraram maior actividade locomotora e digestiva antes do momento da alimentação (Vera *et al.*, 2007).

Os ritmos biológicos são inicialmente sincronizados pelos ciclos ambientais, iniciando ou ajustando a sua periodicidade, e a posteriori podem ou não ter uma origem endógena, que é determinada pela persistência dos ritmos na ausência dos estímulos ambientais (Cymborowski, 2010). Os ritmos biológicos podem ser classificados como: ritmo diário, quando a frequência oscilatória está dentro das 24 horas, ou ritmo circadiano quando o ritmo continua dentro de condições ambientais constantes. Quando

a periodicidade é menor que um dia ($< 20h$) o ritmo é chamado de ultradiano e para uma periodicidade maior que um dia ($> 28h$) é classificado como infradiano, neste último estão inseridos os ritmos circalunar, ciclo lunar com periodicidade de cerca de 29 dias, e o circanual associado à periodicidade anual (relacionado com a sazonalidade).

O termo circadiano deriva das palavras Gregas *circa* (cerca) e *dian* (dia). Na ausência de um sinal temporal, ou seja, em condições não cíclicas do ambiente como por exemplo na escuridão e a uma temperatura constante, os ritmos demonstram um período natural que é próximo, mas diferente do encontrado durante o dia. Nestas condições é normalmente usado o termo tempo circadiano (CT) referindo-se ao tempo do relógio interno. A maioria dos ritmos estão sincronizados com os ciclos ambientais, como tal os cronobiologistas referem-se ao tempo como definido por estes ciclos ambientais de “*Zeitgeber time*” (ZT), em que um ciclo de 24 horas consiste em 12 horas de luz (ZT₀ ao ZT₁₂) e 12 horas de escuridão (ZT₁₂ ao ZT₂₄). No entanto, uma vez que a periodicidade do relógio interno é normalmente diferente de 24 horas, CT não é o mesmo que ZT (Cymborowski, 2010).

Uma propriedade importante nos ritmos circadianos é a compensação de temperatura dos seus períodos, sendo este um pré-requisito completamente funcional para o mecanismo de qualquer relógio. A taxa da maioria dos processos fisiológicos aumenta o dobro com um aumento de 10°C na temperatura, no entanto não se verifica nos ritmos circadianos visto que os seus períodos se mantêm constantes dentro de um grande intervalo de temperatura, o que indica a possível existência de um mecanismo compensatório de alterações induzidas pela temperatura (Cymborowski, 2010).

Um sistema circadiano básico (figura 1-A) inclui receptores ambientais, uma via de entrada bioquímica e/ou biofísica, o próprio relógio biológico e uma via de saída que leva à oscilação do ritmo (por exemplo, a melatonina) (Falcón *et al.*, 2007 e Cymborowski, 2010). Contudo com o aumento da complexidade dos organismos há um aumento da necessidade de ter relógios específicos para diferentes funções fisiológicas (figura 1-B), tendo sido encontrados relógios nos tecidos nervosos, glândulas endócrinas, gónadas, etc. (Cymborowski, 2010).

Nos animais existe normalmente um relógio central principal localizado no cérebro, sendo os relógios localizados noutras zonas do corpo chamados de relógios periféricos. A componente chave no sistema circadiano dos vertebrados é o órgão pineal, responsável pela transdução dos sinais ambientais num sinal hormonal, a melatonina, que é produzida e libertada em grandes quantidades para a corrente

sanguínea durante a noite (Falcón *et al.*, 2007). Nos mamíferos o relógio circadiano localiza-se no núcleo supraquiasmático (SCN), que recebe a informação fótica dos olhos laterais e regula a produção da melatonina no órgão pineal através da via multisináptica, em vez de se localizar no órgão pineal, pois nestes organismos perdeu a sua capacidade fotossensível (Falcón *et al.*, 2007). Nos peixes o órgão pineal mantém a sua fotossensibilidade e apresenta um oscilador auto-sustentável, o que indica a presença do relógio circadiano neste órgão, sendo que a biosíntese de melatonina ocorre neste órgão e na retina.

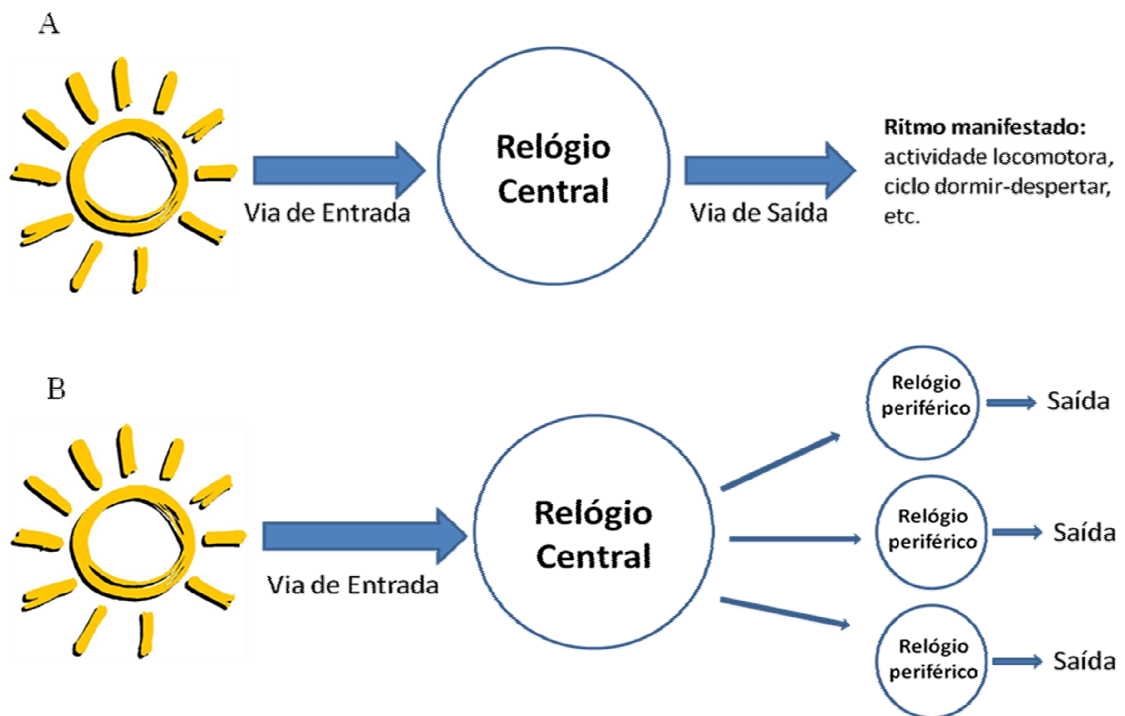


Figura 1: Representação esquemática de um sistema circadiano básico (A) e de um sistema circadiano com relógios periféricos (B) (adaptado de Cymborowski, 2010)

O fotoperíodo determina o comprimento da elevação de melatonina, no entanto a temperatura também desempenha um papel importante no ritmo da melatonina, pois determina a sua amplitude. O perfil de melatonina no plasma muda consoante a estação do ano, sendo que nos peixes apresenta curta duração e amplitude elevada no Verão, e longa duração e baixa amplitude no Inverno, com situações intermédias na Primavera e Outono. Assim, o perfil de melatonina no plasma é um indicador tanto do comprimento do dia como da estação do ano (Falcón *et al.*, 2007).

3.1. Ritmos de reprodução em peixes

a) Ritmos sazonais

A sazonalidade é uma das características mais marcantes nos peixes, com os eventos de desenvolvimento e maturação sincronizados com as alterações sazonais e climáticas, comprimento do dia e fontes de alimento, permitindo que os juvenis sejam criados quando as condições ambientais são mais adequadas à sua sobrevivência (Bromage *et al.*, 2001).

São vários os factores ambientais apontados como possíveis sinais para o ciclo reprodutivo incluindo o fotoperíodo, temperatura, chuva, alimentação e hormonas, no entanto é o padrão sazonal de alterações no comprimento do dia o provável responsável pelo timing da reprodução da maioria dos peixes. Foi já demonstrado ser o principal determinante nos salmonídeos, em alguns esparídeos, nos sciaenídeos e serriolídeos e também na perca e na tainha, constituindo a maioria das espécies cultivadas intensivamente (Bromage *et al.*, 2001).

Nos peixes teleósteos, a postura está programada para ocorrer durante um aumento ou diminuição do fotoperíodo, de acordo com as preferências de cada espécie. A sincronização da reprodução pelo fotoperíodo parece ter como mediador o órgão pineal, que como já foi referido anteriormente, desempenha um papel chave na regulação dos ritmos diários e sazonais através da produção de melatonina (Amano *et al.*, 2000; Bromage *et al.*, 2001; Bayarri *et al.*, 2004; Falcón *et al.*, 2007).

As modificações na taxa de variação do ciclo anual de luz induzem alterações profundas no tempo da maturação e postura, no entanto os componentes de aumento e diminuição das alterações sazonais do fotoperíodo podem ser substituídos por outras combinações do comprimento do dia ou por fotoperíodos de comprimento constante (Bromage *et al.*, 2001).

b) Ritmos Lunares

Outro factor ambiental usado por alguns peixes teleósteos para o começo da sua actividade reprodutiva é o ciclo lunar. Esta influência verifica-se principalmente em peixes que habitam zonas tropicais, onde as alterações sazonais de temperatura e fotoperíodo são mínimas. (Petersen & Hess, 1991; Rahman *et al.*, 2002). Segundo Rahman *et al.* (2000) os ritmos lunares e de maré são sincronizadores dos órgãos endócrinos de peixes induzindo o início da maturação da gónada e da postura.

A fase lunar activa a sincronização no passo final da actividade reprodutiva, p.e, no *Siganus sp.* existe uma correlação entre os esteróides sexuais da gónada e o ciclo lunar (Rahman *et al.*, 2003). No entanto, esta influência não está patente só nas zonas tropicais, no linguado o ciclo lunar parece ter influência nos níveis de esteróides sexuais nos machos e fêmeas, sendo mais elevados na lua cheia e significativamente mais baixos durante a lua nova (Oliveira *et al.*, 2010). A fase lunar também parece influenciar a quantidade de ovos libertada, no linguado verificou-se uma preferência para desovar a partir do último quarto e na lua nova, com uma menor percentagem de desovas durante a lua cheia (Oliveira *et al.*, 2009). Já na dourada a quantidade de ovos recolhidos nos dias de lua cheia foi quase o dobro do que se obteve durante a lua nova, sendo esta fase lunar a que apresentou menor quantidade de ovos (Saavedra e Pousão-Ferreira, 2006).

c) Ritmos diários

A reprodução nos peixes é um processo tipicamente sazonal na maioria das espécies que vivem nas latitudes temperadas. No entanto, a reprodução não deve ser considerada um fenómeno exclusivamente anual, uma vez que também mostra uma ritmicidade lunar e diária. Os ritmos comportamentais diários, tais como a alimentação e actividade locomotora, já são bem conhecidos para muitas das espécies de peixes (Vera *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2007), bem como os ritmos de secreção dos factores neuroendócrinos, que têm sido bastante estudados nas últimas duas décadas (Bolliet *et al.*, 1996; Cahill, 1996; Bayarri *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). No entanto, não existem ainda muitos estudos ao nível dos ritmos de postura. Na Dourada (*Sparus aurata*) verificou-se a existência de um ritmo de postura de 24h, com um pico antes do anoitecer, e uma capacidade de ressincronização gradual após uma inversão de 12h no ciclo luz-escuridão (LD) (Meseguer *et al.*, 2008). No linguado (*Solea senegalensis*) foi visível um ritmo de postura nocturno, com a postura a começar imediatamente depois do anoitecer (Oliveira *et al.*, 2009). Ambas as espécies mantiveram a sua ritmicidade durante alguns dias após a alteração dos fotoperíodos, sugerindo a existência de um relógio endógeno que controla o ritmo diário de postura nestas duas espécies (Oliveira *et al.*, 2009 e Meseguer *et al.*, 2008).

4. Qualidade de ovos de peixe e microflora ambiental

A qualidade do ovo foi definida por Kjørsvik *et al.* (1990), como “o potencial do ovo produzir larvas viáveis” e seria determinada quando o ovo desovava e era fertilizado. Os critérios morfológicos, bem com as taxas de fertilização e eclosão, podem ser um indicativo da qualidade dos ovos, mas não nos dizem nada sobre quais os factores que determinam a qualidade do ovo. No entanto, a qualidade dos ovos de peixe pode ser afectada por vários factores: idade materna e factor de condição, timing do ciclo de postura, processos de sobrematuração, factores genéticos e por propriedades intrínsecas do próprio ovo (Kjørsvik *et al.*, 2003). Para além destes deve-se considerar também a presença de bactérias na superfície do ovo ou no seu interior, uma vez que podem influenciar a sua viabilidade, e qualidade (Bergh, 1999) e que podem depender da microflora existente na água.

A composição bacteriana da água pode variar muito dependendo do tipo de água, e é influenciada pelo conteúdo em sais, matéria orgânica, pH, turbidez e temperatura. A maioria das bactérias marinhas são halofílicas, ou seja, precisa de NaCl para um desenvolvimento óptimo, apresentando um melhor crescimento em concentrações de sal de 2.5-4.0 %, podendo ser classificadas através do seu óptimo de sal: entre 2-5 % como fracamente halofílicas, entre 5-20 % moderadamente e 20-30 % extremamente halofílicas. Em águas costeiras podem também existir bactérias terrestres que possuam um melhor crescimento em água doce e que são viáveis no mar apenas por um período de tempo limitado (Rheinheimer, 1992).

A maioria das bactérias marinhas são Gram negativas (através do método de coloração de Gram), com mobilidade e anaeróbias facultativas, no entanto crescem melhor na presença de oxigénio. Existem relativamente poucas aeróbias obrigatórias e ainda menos anaeróbias obrigatórias (Rheinheimer, 1992). A temperatura óptima para o seu crescimento está normalmente entre os 18 e os 20° C. As bactérias psicrófilas facultativas conseguem crescer bem a 0° C, no entanto o seu óptimo é a 20° C ou mais, as psicrófilas obrigatórias têm um crescimento óptimo a menos de 20° C (Rheinheimer, 1992).

Morfologicamente as bactérias marinhas podem ser compostas por células de várias formas, sendo a maioria correspondente aos quatro tipos básicos: cocos, bacilos, vibrios e espirais. As formas filamentosas e ramificadas também são encontradas no meio marinho mas em menor número (Rheinheimer, 1992). Os géneros e famílias a que correspondem as bactérias encontradas no meio marinho são numerosos. De acordo com

Starr *et al.* (1981) os géneros *Pseudomonas*, *Beneckea*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* estão fortemente distribuídos nas regiões marinhas.

A matéria orgânica particulada, o plâncton e as superfícies sólidas podem ser fortemente colonizadas por bactérias. A microflora aderente varia de alguns pontos percentuais para 94% do número total de bactérias, dependendo da abundância e da composição em superfícies adequadas e disponibilidade de nutrientes na água (Hansen & Olafsen, 1989). Sabe-se que a superfície dos ovos de peixe é um habitat para a colonização e crescimento bacteriano. No entanto o ambiente confinado e rico em nutrientes da incubação intensiva de ovos apresenta uma microflora diferente daquela encontrada no oceano, o que pode afectar a relação comensal entre a microflora indígena normal e as estirpes autóctones adversas ou patogénicas oportunistas nas superfícies mucosas de ovos e larvas (Hansen & Olafsen, 1989).

Quando a larva eclode o saco vitelino fica exposto tanto às bactérias que se encontram na superfície do ovo como às que estão presentes no ambiente envolvente. Essa exposição do saco vitelino a bactérias patogénicas e oportunistas pode resultar em doenças e mortalidades. Segundo Bergh (1999), os diferentes padrões de mortalidade reflectem as diferentes estratégias ecológicas da bactéria se desenvolver. Apontando três estratégias: a estratégia ecológica da *Flexibacter ovolyticus* (p.e), que é directamente patogénico para o ovo, teria que ter a capacidade enzimática de penetrar ou pelo menos danificar o córion do ovo, ou a capacidade de acumular tão grande quantidade à superfície que impediria a troca de oxigénio ou de outros metabolitos; já a estratégia apresentada pela *Vibrio anguillarum* e a *Aeromonas Salmonicida*, que aparentemente não necessitam da capacidade de penetrar o córion do ovo e que, no entanto, podem aderir à superfície do ovo e infectar a larva pós-eclodida, provocando a mortalidade nos estádios de vida posteriores à larva com saco vitelino; uma terceira estratégia seria a das bactérias patogénicas intra-ovulares que poderiam causar a mortalidade directa no estado de ovo, ou representar um meio através do qual o agente patogénico é transmitindo verticalmente para fases posteriores da vida do hospedeiro (Bergh, 1999).

Nos géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, e *Cytophaga* estão incluídos patógenos e é comum isolá-las de peixes saudáveis normais, mas apenas algumas destas bactérias possuem o factor de virulência necessária para induzir uma doença (Cahill, 1990).

Em ovos de salmão as espécies *Cytophaga* e *Pseudomonas* foram isoladas de ovos embrionados saudáveis, já nos ovos mortos foram isoladas principalmente espécies

de *Pseudomonas* fluorescentes. Também foram isoladas *Aeromonas hydrophila* tanto dos ovos vivos como da água. As espécies de *Pseudomonas* isoladas dos ovos mortos foram provavelmente estimuladas pela lixiviação de nutrientes do ovo morto sendo pouco provável que sejam a causa da morte. Neste caso as condições físicas e químicas do ambiente foram considerados os principais factores que asseguraram a sobrevivência dos ovos, uma vez que não foram isoladas nenhuma bactérias patogénicas responsáveis pela mortalidade de ovos (Bell *et al.*, 1971 in Cahill, 1990).

5. Caracterização das espécies

A safia, *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817) é um teleósteo marinho da família Sparidae, possui o corpo alongado e apresenta geralmente cor cinzenta, podendo variar entre o acastanhado e o esverdeado, e uma banda preta na nuca até à margem superior do opérculo e outra ao longo do pedúnculo caudal (figura 2). A barbatana dorsal apresenta onze a doze espinhos e a barbatana anal três. O tamanho máximo registado foi de 45cm e um peso máximo de 1,3 Kg. É uma espécie eurialina bentopelágica que se encontra em zonas de fundo rochoso ou arenoso, a profundidades que podem ir até aos 160 m, sendo mais comum dos 0 aos 30 m. Os juvenis são por vezes encontrados em pradarias de ervas marinhas e os adultos habitam águas costeiras de clima subtropical. A sua distribuição está representada na figura 3.



Figura 2:Safia (*Diplodus vulgaris*)
www.oceanario.pt/cms/248/

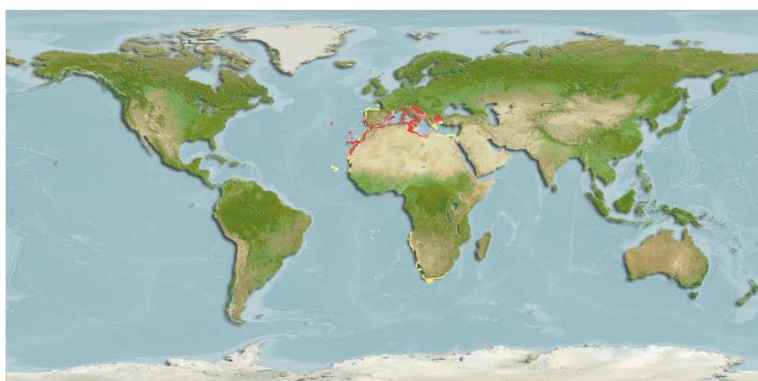


Figura 3:Distribuição geográfica da Safia (*Diplodus vulgaris*)
www.pesca-embarcada.com/informacoes/peixes/html/peixe_sargo_safia.html

A sua dieta é constituída principalmente por crustáceos, moluscos e vermes. É uma espécie hermafrodita potencial, em que os indivíduos apresentam no estado juvenil, gónadas imaturas intersexuais (Henriques, 1997), atingindo a maturação como fêmeas

ou como machos, sendo que a idade de primeira maturação ocorre aos dois anos com cerca de 15 a 20 cm de comprimento.

As épocas de reprodução variam consoante a distribuição geográfica, sendo que no Mediterrâneo Oeste ocorre de Outubro a Novembro, na região Este de Dezembro a Janeiro. Os ovos pelágicos são esféricos, com superfície transparente (Henriques, 1997). A safia possui valor económico na pesca comercial, na aquariofilia e também na pesca de recreio.

O sargo, *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758) é também um teleóstero marinho da família Sparidae, tem o corpo comprimido lateralmente e apresenta cor cinza prateado (figura 4). A barbatana dorsal normalmente apresenta onze a doze espinhos e a barbatana anal três. O tamanho máximo observado foi de 45cm sendo o mais comum 25cm. A sua distribuição geografia encontra-se representada na figura 5.



Figura 4:Sargo (*Diplodus sargus*)
<http://www.oceanario.pt>

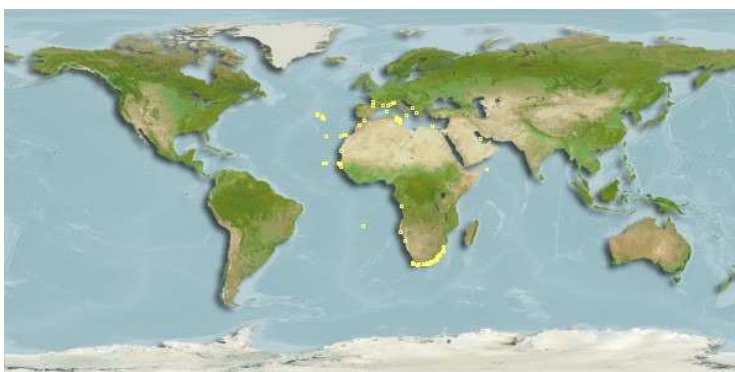


Figura 5:Distribuição geográfica do Sargo (*Diplodus sargus*)
<http://species-identification.org/index.php>

O sargo é um peixe bentopelágico que se encontra normalmente em zonas costeiras. Usam os estuários como maternidade, e os seus juvenis habitam fundos rochosos e pradarias de ervas marinhas, encontrando-se em profundidades até aos 150 metros. São omnívoros, alimentando-se de algas e invertebrados bentónicos (FAO 2010).

Em termos reprodutivos são animais protândricos hermafroditas, sendo machos no início de vida podendo posteriormente desenvolver-se para fêmea. No golfo de Tunis a sua actividade sexual começa em Janeiro e estende-se até Junho, e a postura estende-se de Março a Maio apresentando um pico nos meses de Março – Abril (Mouine *et al.*, 2007). À medida que diminui a latitude o período de postura começa mais cedo e a sua duração aumenta de 3 para 5 meses (Mouine *et al.*, 2007 e Morato *et al.*, 2003). Um

período de postura mais longo indica que também as condições ambientais favoráveis à eclosão e desenvolvimento larvar, estão disponíveis por um maior período de tempo (Gonçalves *et al.*, 2003). Os ovos, tais como os da safia são transparentes.

6. Objectivos

Todos os membros da família Sparidae do Mediterrâneo aparecem como potenciais espécies com interesse para a aquacultura, devido ao seu preço de mercado ser satisfatório, ao bom desempenho do crescimento e à sua fácil adaptação ao cativeiro (Abellan & Garcia-Alcazar, 1995).

Como já foi referido anteriormente as primeiras maternidades tiveram de enfrentar diversos problemas, como tal um conhecimento mais aprofundado nos ritmos de postura nas espécies cultivadas poderá ser uma mais-valia na produção de ovos para as maternidades; conhecer o momento do ano e do dia em que ocorre a postura permite otimizar os protocolos de recolha dos ovos, levando a uma menor mortalidade e melhor qualidade dos mesmos e consequentemente maior sobrevivência nas fases posteriores. Como tal o primeiro objectivo desta tese foi o de estudar os ritmos de postura de duas espécies da família Sparidae, *Diplodus vulgaris* e *Diplodus sargus*. Por um lado, caracterizar os ritmos estacionais, descrevendo a época de reprodução de cada espécie; e por outro, investigar a existência de ritmos diários de postura. Foi também investigado o possível controlo endógeno dos ritmos diários em condições de luz constante no caso do sargo.

Outro aspecto importante para as maternidades e em qualquer sistema de cultivo é o de determinar a composição específica, quantidades relativas e potenciais fontes de bactérias normalmente associadas aos ovos e larvas nos diferentes estados de desenvolvimento, com o objectivo de definir protocolos de incubação que permitam a optimização da taxa de eclosão Assim o segundo objectivo deste estudo é o de identificar as espécies de bactérias e a sua respectiva abundância nos ovos de peixe de ambas as espécies, *Diplodus vulgaris* e *Diplodus sargus*, no período da colheita

Material e métodos

O presente estudo foi realizado nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do INRB, I.P. – IPIMAR, usando os reprodutores das espécies *Diplodus vulgaris* (safia) e *Diplodus sargus* (sargo) estabelecidos nesta Estação.

Condições de estabulação

Os reprodutores de safia e sargo encontravam-se em tanques que funcionavam em sistema aberto com fotoperíodo natural. A temperatura da água foi controlada de acordo com o estabelecido pela EPPO. As características dos lotes de reprodutores de ambas as espécies, bem como as condições de estabulação em que se encontravam estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1 Condições de estabulação e características dos lotes

	Tanques		Água		Peixes				
	Volume (m ³)	Profundidade (m)	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	Nº	Peso médio (g)	Comprimento médio (cm)	Biomassa (g)	Densidade (kg/m ³)
Safia	8,2	1,5	36 ± 1	14,3 - 20	21	823,0 ± 176,4	33,68 ± 2,61	17283	2,11
Sargo	10,6	1,5	36 ± 1	11 - 24,4	18	1462,5 ± 253,13	41,7 ± 2,78	26325	2,48

Ambos os tanques foram monitorizados ao longo da época de postura de cada espécie, tendo sido recolhidos diariamente os dados de temperatura, salinidade e O₂ dissolvido utilizando um medidor multiparâmetro.

A proporção de sexos era desconhecida em ambas as espécies. Os peixes eram alimentados uma vez por dia entre as 11h00 e o 12h30, alternando entre pota (*Illex argentinus*), sardinha (*Sardina pilchardus*) e ração da Skretting Vitalis-Repro (8mm).

No sentido de avaliar a variação da qualidade das posturas foram efectuados ensaios onde a qualidade das posturas foi relacionada com os ritmos estacionais, diários e com a sua composição bacteriológica.

A - Ritmos de postura

Experiência 1: Ritmos estacionais de postura

Para caracterizar as épocas naturais de postura das duas espécies em estudo, os tanques estavam equipados com colectores de ovos, nos quais se verificava a presença de ovos diariamente entre as 10h00 e as 11h00. Nos dias em que se verificava a ocorrência de uma postura era feita a separação dos ovos viáveis dos não viáveis. Os ovos eram colocados num copo com água de mar, e após algum tempo os não fecundados ou mortos afundavam e os viáveis mantinham-se na superfície permitindo a sua separação. Depois de separados foi feita a pesagem de ambas as porções. Na porção de ovos viáveis foi ainda determinada a taxa de eclosão utilizando três replicados de 30 ovos, em que ao fim de dois dias se verificou o número de larvas eclodidas. As flutuações das posturas ao longo da época foram posteriormente relacionadas com parâmetros da água, como temperatura ou oxigénio, que foram monitorizados todos os dias.

Experiência 2: Ritmos diários de postura

Como segundo objectivo deste trabalho, pretendeu-se estudar os ritmos diários de postura. Depois de caracterizar as flutuações estacionais, pretendemos investigar qual a hora que cada uma destas espécies escolhe para desovar. Para responder a esta pergunta usámos um colector de ovos autónomo e automático desenvolvido na universidade de Múrcia, Espanha (Meseguer *et al.*, 2008).

O colector de ovos era formado por duas partes: uma mecânica e outra eléctrica. A componente mecânica era constituída por uma caixa estanque de aço inoxidável que continha o equipamento electrónico (figura 6-1). A cobertura, composta pelo interruptor (figura 6-a) e um ponto para carregar a bateria (figura 6-b), estava ligada a um suporte de polietileno atravessado por uma haste de aço inoxidável que ligava a parte eléctrica ao distribuidor. O distribuidor (figura 6-2) era circular e feito de PVC. Todos os compartimentos tinham um buraco coberto com rede para a drenagem da água. O fundo do distribuidor estava coberto com a mesma rede de 500 mm.

A componente eléctrica do colector consistia na bateria, que conferia a autonomia, o circuito de controlo electrónico e solenóide. O dispositivo eléctrico podia ser programado para fazer o distribuidor rodar em intervalos de tempo desde 5 s até 120 min., permitindo saber a que horas os ovos eram libertados do tanque.

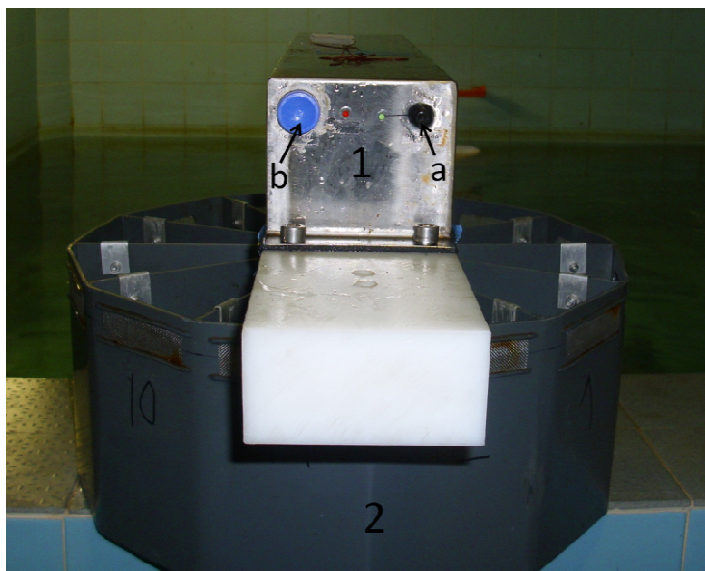


Figura 6 Constituição do colector de ovos autónomo. 1 - componente mecânica; 2 - distribuidor; a - interruptor; b - entrada do carregador de bateria.

As posturas foram monitorizadas usando o colector de ovos autónomo referido anteriormente programado para intervalos de 2 horas, localizado na saída de água do tanque dos reprodutores, o que permitia a colheita de ovos periódica e a identificação do momento do dia em que os ovos eram libertados do tanque. O colector era ligado às 14h00 e a recolha dos ovos dos diferentes compartimentos do distribuidor feita no dia seguinte entre as 10h00 e as 11h00. O volume total de ovos e os parâmetros de qualidade (taxas de eclosão), bem como o estado de desenvolvimento dos ovos, foram determinados para cada um dos intervalos de tempo, como descrito anteriormente.

As posturas da safia foram monitorizadas em 21 dias (15 de Janeiro a 9 de Fevereiro), e as de sargo em 27 dias (entre 2 de Fevereiro a 29 de Abril).

a) Ritmos circadianos de postura no sargo

Para determinar a presença de um possível controlo endógeno dos ritmos diários de postura no sargo, os reprodutores desta espécie foram expostos inicialmente ao fotoperíodo normal LD (10h luz - 14h escuridão) e depois a condições de luz constante (LL) durante cinco dias. Durante este período os ritmos diários de postura foram monitorizados como descrito anteriormente. Após este período, os peixes voltaram a ser expostos ao fotoperíodo inicial, com um ciclo luz/escuridão LD.

B- Colonização Bacteriana dos ovos

Para a caracterização bacteriológica dos ovos de ambas as espécies, foram efectuadas três colheitas de ovos em diferentes alturas da época de postura. Para a safia a primeira colheita foi feita em Dezembro e as seguintes em Fevereiro, enquanto que no sargo foram recolhidas amostras uma vez em Janeiro, outra em Março e a última em Junho. Foi efectuada a identificação bacteriológica a 15 de Dezembro nos ovos de safia e a 14 de Janeiro nos ovos de sargo. Em cada ponto foi usada uma amostra de 200 ovos, não desinfectados, macerados e transferidos para 2ml de solução salina a 1.5%. O volume total foi então ajustado para 10ml. Destes 10ml foram feitas mais 4 diluições, ficando assim com 5 diluições (0, -1, -2, -3 e -4). Para a contagem e identificação das unidades formadoras de colónias (UFC) foi usado um meio de cultura não específico Tryptic Soy Agar (TSA), para contagem do número total de bactérias aeróbias, e um meio de cultura para identificação de vibrios Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS Chorella). No meio de TSA foram usadas as diluições do -1 ao -4 e no meio de TCBS as diluições do 0 ao -3. Foram inoculados 100 µl de cada diluição e espalhados nas placas de agar em triplicado. As placas foram encubadas a 24°C na estufa, e as contagens das unidades formadoras de colónias foram feitas após 2 e 7 dias. O número de unidades formadoras de colónias por g (ufc's g⁻¹) foi estimado tendo em conta o factor de diluição e o peso dos 200 ovos por espécie.

Após os 2 e os 7 dias algumas das colónias foram inoculadas em placas de TSA para posterior identificação. Os testes para determinação das características bioquímicas das bactérias isoladas foram feitos de acordo com Holt (1994) e Buller (2004).

Análise de dados

As análises estatísticas foram efectuadas usando o Excel, o SPSS e um software de Cronobiologia (CRONOBIO, D. Noguera, Universidade de Barcelona, Espanha).

As series de dados das posturas diárias foram analisadas usando o SPSS e o Cosinor. No Cosinor a “amplitude” (distância entre o ponto máximo e mínimo da escala de tempo ao valor médio da série temporal), o “mesor” (média da série de tempo), e a “acrophase” (pico em relação à escala de tempo) (figura 7) foram estimados conforme determinado pela aproximação dos mínimos quadrados da função cosseno. Os dados dos estados de desenvolvimento, e gramas de ovos dos vários dias e da média dos dias foram submetidos a “one-way” ANOVA, com nível de significância de p<0,05. Os

dados das taxas de eclosão foram analisados através do teste “t de student”. Foi feita também uma “one-way” ANOVA para comparar os três pontos de microbiologia.

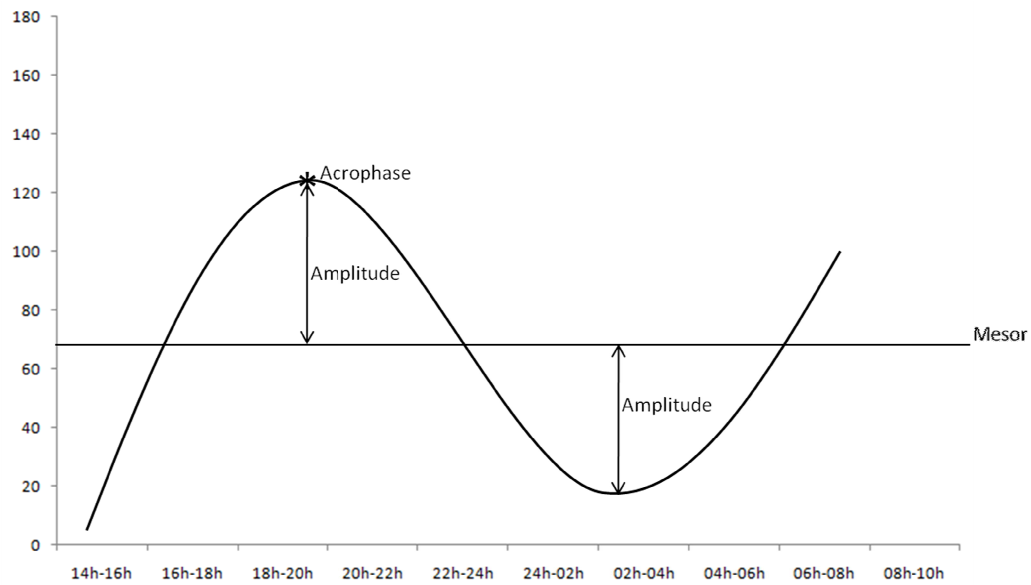


Figura 7: Representação gráfica das componentes do cosinor.

Resultados

Experiência 1: Ritmos estacionais de postura

Safia

A primeira postura da safia ocorreu a meio de Dezembro e a época de reprodução desta espécie estendeu-se até Fevereiro (figura 8). Durante este período, a temperatura oscilou entre 14,3° e 20° C.

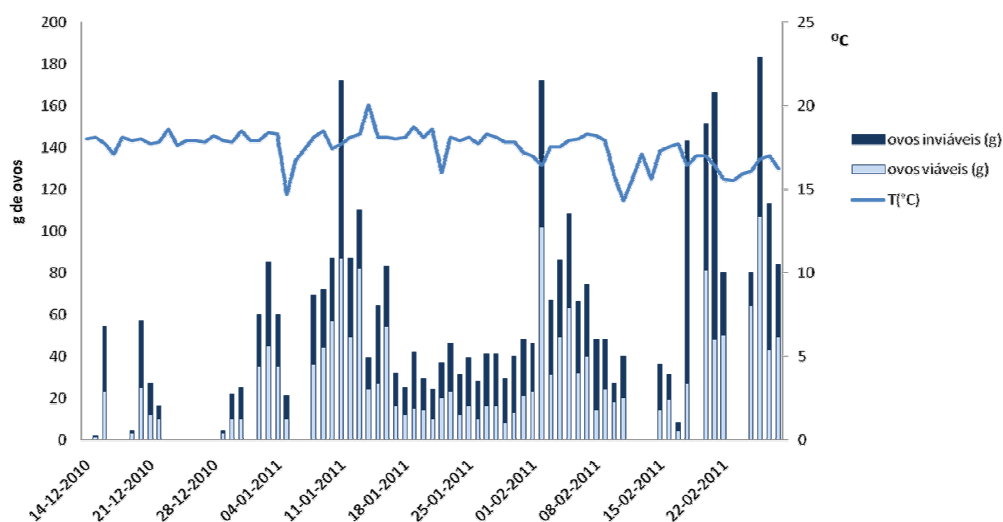


Figura 8 Evolução da quantidade diária de ovos, em gramas, ao longo da época de reprodução da safia (*Diplodus vulgaris*).

No início da época a quantidade de ovos variou entre 1g e 60g. Durante toda a época de postura verificaram-se seis dias com maior quantidade de ovos (figura 8). O primeiro ocorreu a meio de Janeiro, após uma descida seguida de uma subida de 4° C, apresentando um total de 172g de ovos dos quais cerca de metade eram inviáveis. O segundo pico aconteceu no início de Fevereiro, tendo ocorrido durante uma descida de aproximadamente 1° C, com cerca de 41% de ovos inviáveis. Os seguintes pontos ocorreram após pequenas variações de temperatura, dois dos quais aconteceram durante descidas da temperatura e outros dois após subida de temperatura.

Sargo

As posturas do sargo tiveram início em Janeiro e terminaram em Junho, tendo a temperatura da água oscilado entre 11° e 24,4° C durante este período (figura 9). A quantidade de ovos diária variou ao longo de toda a época de postura. No entanto, verificou-se que no início e no fim da época as posturas apresentaram valores mais baixos. Entre Fevereiro e Junho registaram-se vários picos na quantidade de ovos. Em Fevereiro a quantidade máxima de ovos não ultrapassou os 800g e em Março ocorreu um pico de 868g de ovos, tendo atingido o máximo a 23 de Abril com 1021g de ovos.

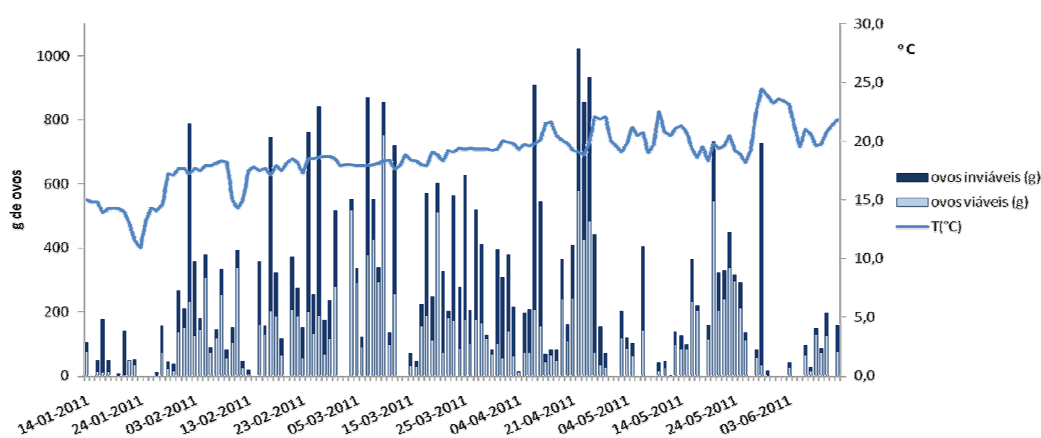


Figura 9 Evolução da quantidade diária de ovos, em gramas, ao longo da época de reprodução do sargo (*Diplodus sargus*).

Em Maio as posturas voltaram a não ultrapassar as 800g de ovos. Em grande parte dos casos, as posturas com mais gramas de ovos ocorreram durante ou após alterações na temperatura da água, alguns acontecem após uma descida seguida de uma subida, noutros durante subida ou ligeira descida da temperatura (figura 9).

Experiência 2: Ritmos diários de postura

a) Quantidade de ovos ao longo do dia

Safia

No gráfico que descreve a evolução das posturas ao longo de 5 dias não consecutivos (figura 10a) é evidente a repetição de uma oscilação. No entanto, não é clara a hora em que se produz um pico na quantidade de ovos.

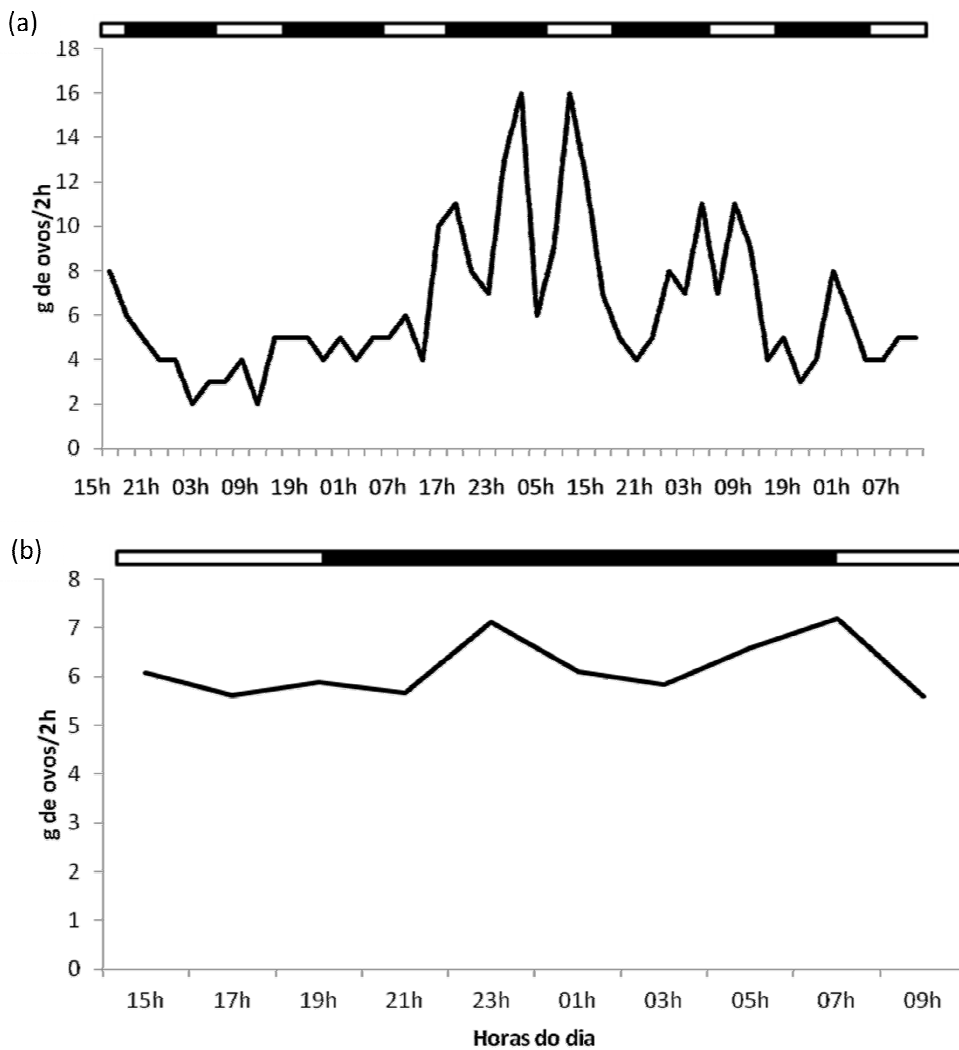


Figura 10 (a) Ritmos diários de postura na safia (*Diploodus vulgaris*) durante cinco dias não consecutivos em condições LD. (b) Onda média do ritmo diário de postura. As barras horizontais pretas e brancas no topo dos gráficos representam as horas correspondentes à noite e ao dia, respectivamente.

No que diz respeito à onda média das gramas de ovos (figura 10-b) observaram-se dois picos, às 23h00 e às 07h00. No entanto, a aplicação da análise ANOVA não revelou a presença de diferenças significativas. Os resultados do COSINOR deram uma acrofase às 00h18, com um mesor de 5,25g de ovos/2h e uma amplitude de 2,11g de ovos/2h, no entanto o $p > 0,05$.

Sargo

No que diz respeito aos ritmos de postura no sargo observou-se um padrão muito marcada, com o pico de postura observado entre as 21h00 e as 23h00 (figura 11-a).

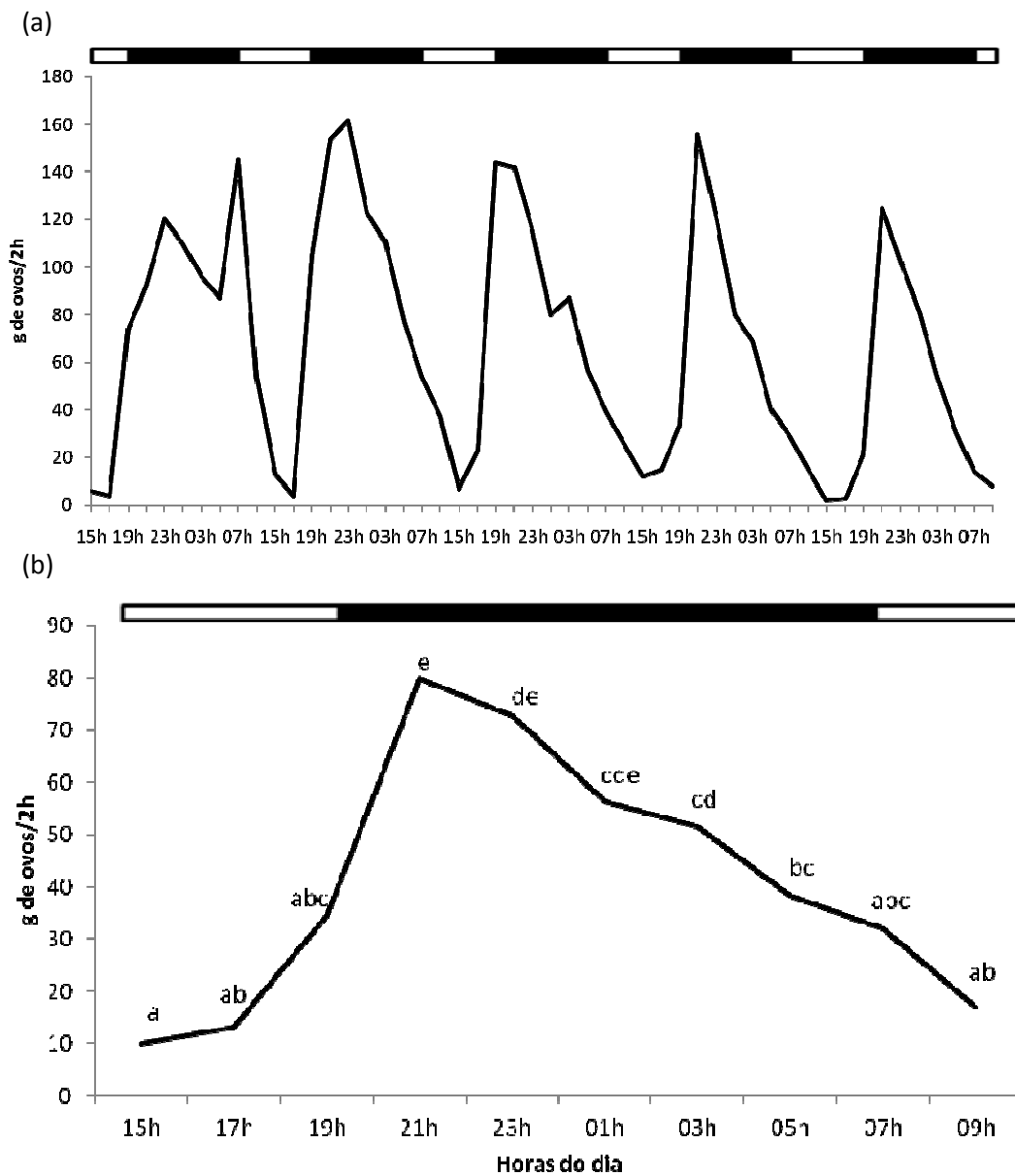


Figura 11 (a) Ritmos diários de postura no sargo (*Diplodus sargus*) durante cinco dias não consecutivos em condições LD. (b) Onda média do ritmo diário de postura. As barras

horizontais pretas e brancas no topo dos gráficos representam as horas correspondentes à noite e ao dia, respectivamente. As diferentes letras indicam diferentes significâncias estatísticas (one-way ANOVA).

O mesmo se verificou ao calcular a onda média (figura 11-b), em que o pico de postura ocorre às 21h00. Ambos os resultados foram significativos quando submetidos a “one-way” ANOVA e através do COSINOR ($p < 0,0001$). Os resultados do COSINOR apresentaram um mesor de 33,75g de ovos/2h, uma amplitude de 34,23g de ovos/2h e uma acrofase às 00h00.

b) Estados de desenvolvimento dos ovos

No tanque das safias foi possível ver ovos no início do desenvolvimento em apenas algumas células, como se verifica na figura 12-A, onde se encontram ovos de quatro e oito células.

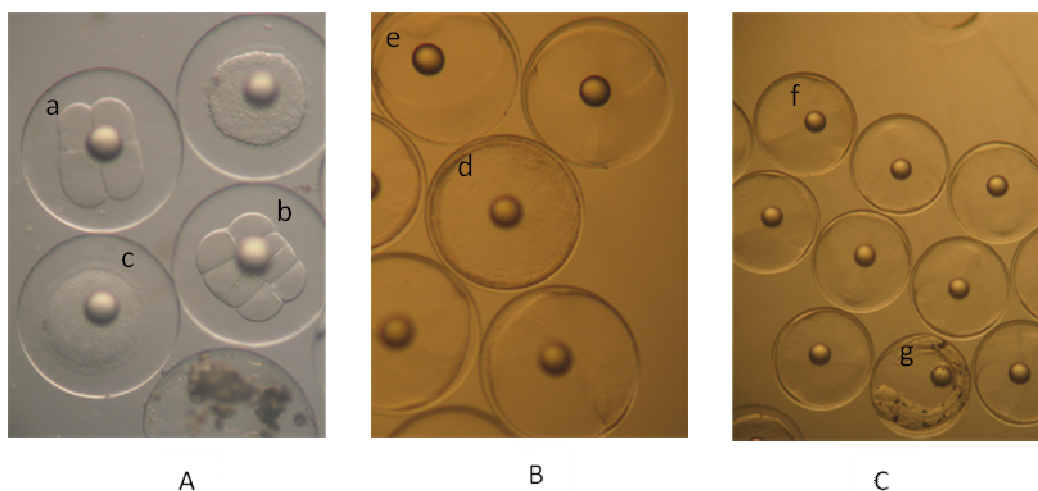


Figura 12 A) ovos de safia (*Diplodus vulgaris*) em quatro células (a), oito células (b) e em morula (c) com uma ampliação de 20x (4x5x); B) ovos de sargo (*Diplodus sargus*) em blástula (d) e em gástrula (e) com uma ampliação de 20x (4x5x); C) ovos de sargo em estado de neurula inicial (f) e neurula avançada (g) com uma ampliação de 16x (4x4x).

No sargo o estado de desenvolvimento mais inicial encontrado foi a morula, seguindo-se a blástula e a gástrula (figura 12-B ovos d e e, respectivamente). Foi também possível ver ovos num estado de neurula inicial (figura 12-C ovo f) e num estado de neurula avançada (figura 12-C ovo g).

Safia

Do tanque das safias foram recolhidos ovos em diferentes estados de desenvolvimento que vão desde apenas algumas células até neurula (figura 13). Os ovos que saíram do tanque entre as 15h00 e as 19h00 encontravam-se, quando retirados do colector, maioritariamente em neurula, sendo que a sua percentagem vai diminuindo nas horas seguintes.

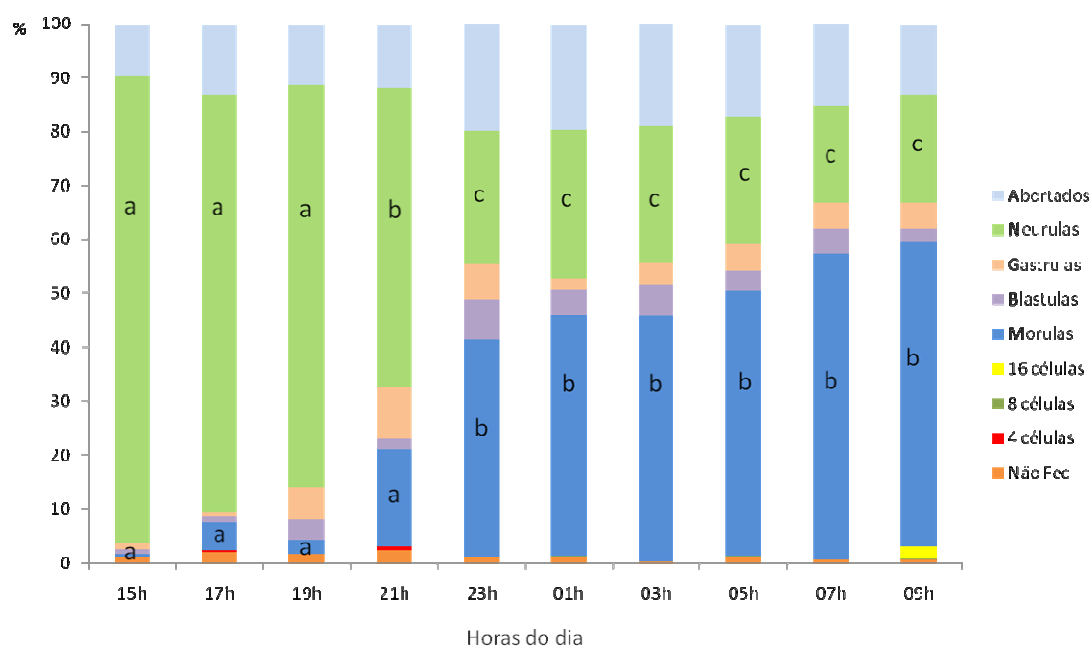


Figura 13 Percentagens médias dos estados de desenvolvimento dos ovos de safia (*Diplodus vulgaris*) nos compartimentos correspondentes às diferentes horas do dia. As diferentes letras indicam diferentes significâncias estatísticas, as barras que não possuem letras não apresentaram resultados significativos (one-way ANOVA).

A percentagem do estado de morula, ao contrário da neurula, foi aumentando ao longo da noite e das primeiras horas da manhã, apresentando percentagens baixas durante a tarde. A percentagem de ovos encontrados noutros estados de desenvolvimento não foi significativa quando testado com “one-way” ANOVA. A percentagem de abortados é ligeiramente menor nas horas iniciais de saída do tanque (15h-21h).

Sargo

No tanque dos sargos (figura 14), o estado de desenvolvimento em que a maioria dos ovos se encontra, durante as primeiras horas de saída do tanque para o colectador (15h00, 17h00 e 19h00), corresponde a neurula. A percentagem de ovos abortados durante estas horas foi baixa.

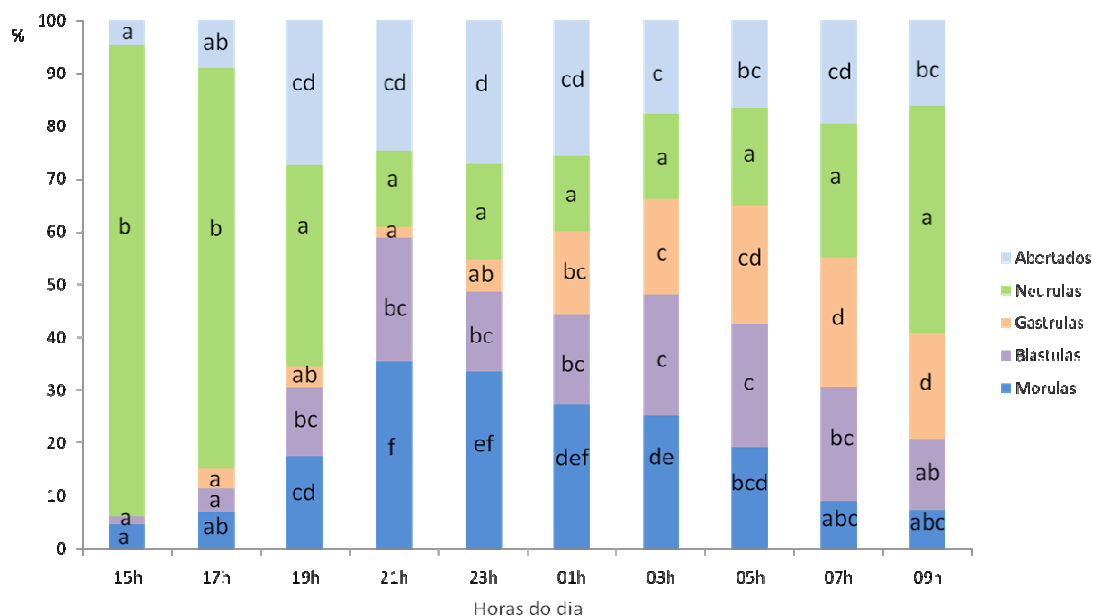


Figura 14 Percentagens médias dos estados de desenvolvimento do ovo de sargo (*Diplodus sargus*) nos compartimentos correspondentes às diferentes horas do dia. As diferentes letras indicam diferentes significâncias estatísticas (one-way ANOVA).

A quantidade de neurulas nas horas seguintes foi diminuindo, contudo verifica-se um aumento na percentagem de ovos neste estado que saíram do tanque por volta das 09h00. A partir das 21h00 começam a aparecer maiores percentagens de morulas e blástulas, sendo esta hora e a seguinte as que apresentam maiores percentagens de morulas, após as quais volta a diminuir. No entanto a quantidade de blástulas mantém-se mais ou menos a mesma entre as 03h00 e as 07h00. As gástrulas são mais visíveis a partir da 01h00 até às 09h00. Entre as 19h00 e a 01h00 verifica-se uma maior quantidade de ovos abortados quando comparado com as restantes horas, e nas seguintes horas há uma diminuição de cerca de 10%.

c) Taxas de eclosão dos ovos

A safia não apresentou resultados significativos no que diz respeito às taxas de eclosão de ovos que saíram do tanque em diferentes horas.

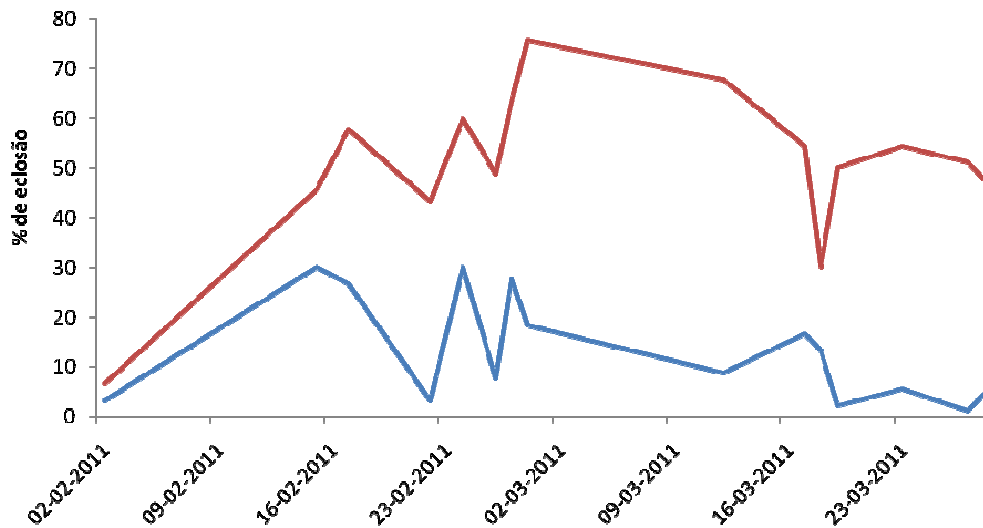


Figura 15 Taxa de eclosão de ovos de sargo (*Diplodus sargus*) recolhidos nas primeiras (linha azul) e últimas (linha vermelha) horas de postura, durante vários dias.

Já os dados de taxas de eclosão das posturas do sargo (figura 15) apresentaram uma diferença entre as primeiras e as últimas posturas diárias. Os ovos recolhidos nas primeiras horas de postura de cada dia apresentaram menores taxas de eclosão do que os recolhidos nas últimas horas, não passando dos 30% de ovos eclodidos. Enquanto que nas últimas posturas diárias, de alguns dias, chegaram a cerca de 75% de ovos eclodidos. O teste t revelou diferenças entre os dois grupos com uma significância de $p < 0,001$.

d) Ritmos circadianos de postura do sargo

Durante vários dias consecutivos, sob um fotoperíodo LD, o sargo começou a postura logo após escurecer, entre as 18h00 e as 20h00 observando-se um pico às 21h00 (figura 16).

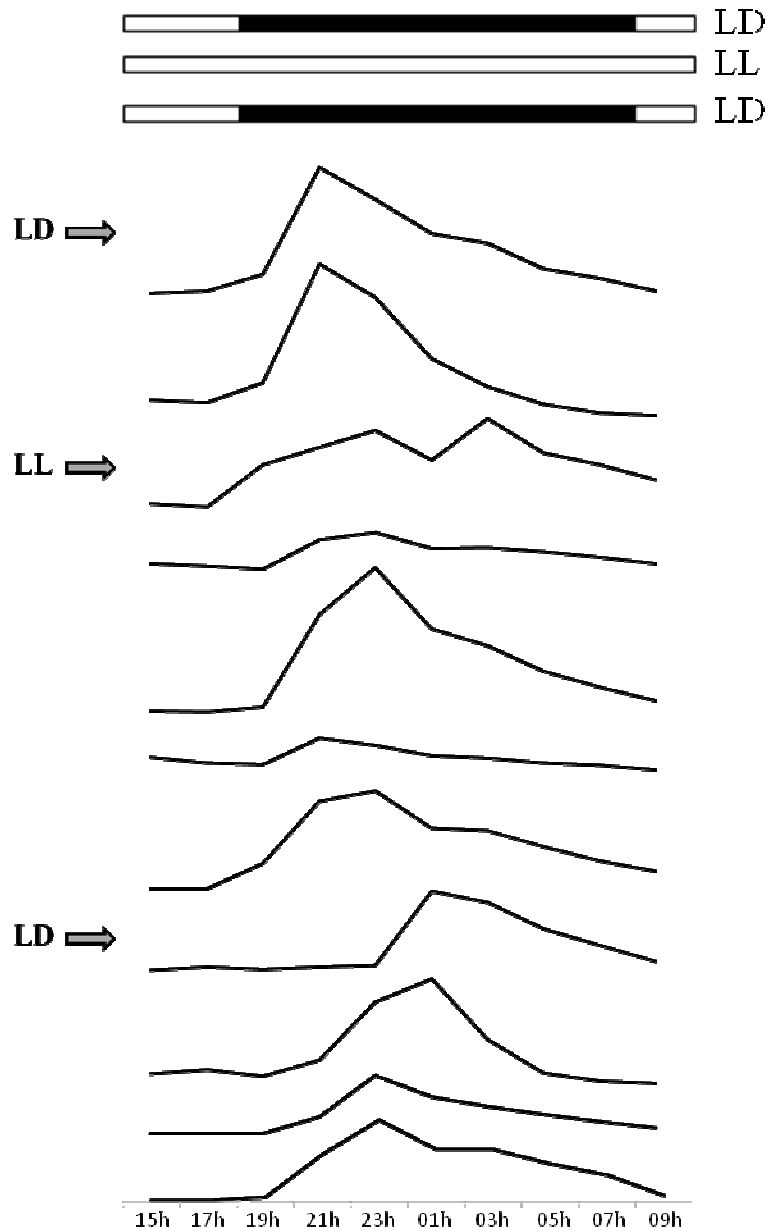


Figura 16 Ritmos diários de postura no sargo (*Diplodus sargus*) durante vários dias consecutivos em diferentes regimes de fotoperíodo (LD – 14h luz e 10h escuridão; LL – luz constante). Os valores são expressos em volume de ovos/2h. As barras brancas e pretas indicam períodos de luz e escuridão, respectivamente. As setas do lado esquerdo indicam os momentos em que foram aplicadas as mudanças de fotoperíodo.

Quando expostos a um fotoperíodo LL em curto termo, 5 dias, o ritmo de postura diária manteve-se durante este período (figura 16). No primeiro dia após a mudança do ciclo LL para o ciclo LD, os peixes não desovaram, e nos dias seguintes verificou-se um atraso no momento da postura, começando às 23h00 e com um pico à 01h00. Após este período de ressincronização, o *timing* da postura volta a ser igual ao verificado inicialmente (figura 16). Os resultados do COSINOR para a média dos cinco dias em condições LL deram uma acrofase às 00h17, com um mesor de 36,42g de ovos/2h e uma amplitude de 37,99g de ovos/2h, $p=0,00023$. Após a mudança do ciclo LL para o ciclo LD obteve-se um acrofase à 1h13, com um mesor de 31,04g de ovos/2h e uma amplitude de 42,19g de ovos/2h, $p=0,00009$.

Colonização bacteriana dos ovos

a) Carga bacteriana e relação com a temperatura

O número total de bactérias presentes nos ovos das espécies estudadas variou entre 10^4 - 10^5 ufc g^{-1} no sargo e 10^5 - 10^6 ufc g^{-1} na safia. Ao nível das *Vibrionaceae* variou entre 10^0 - 10^4 ufc g^{-1} e 10^0 - 10^5 ufc g^{-1} no sargo e na safia, respectivamente (figura 17).

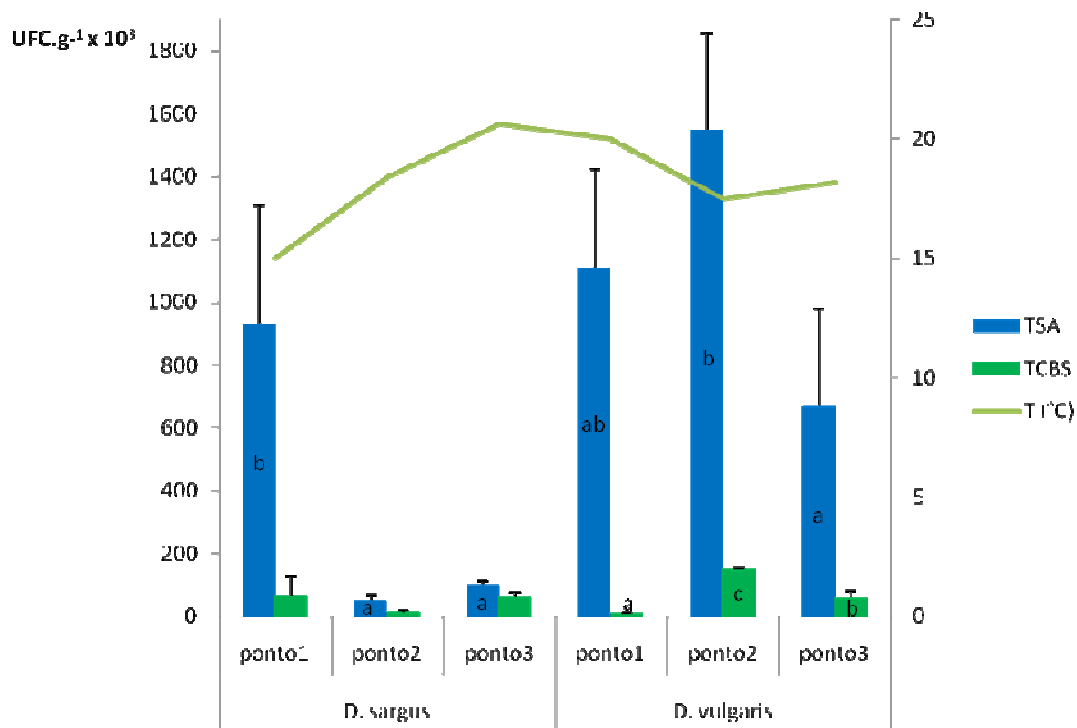


Figura 17 Unidades formadoras de colónias (ufc) do número total de bactérias (barras azuis) e de *Vibrionaceae* (barras verdes) dos ovos de *Diplodus sargus* e *Diplodus vulgaris* e a sua relação com a temperatura da água dos respectivos tanques em três colheitas diferentes (*D.*

sargus: ponto 1-14/01/11, ponto 2-15/03/11, ponto 3-07/06/11; *D. vulgaris*: ponto 1-15/12/10, ponto 2-04/02/11, ponto 3-08/02/11). TSA - tryptic soy agar; TCBS - thiosulfate citrate bile salts sucrose agar. As diferentes letras indicam diferentes significâncias estatísticas, as barras que não possuem letras não apresentaram resultados significativos (one-way ANOVA).

Quando relacionado com a temperatura verifica-se uma correlação negativa, com mais ufc's do número total de bactérias nas colheitas em que se registaram temperaturas mais baixas, ponto 1 (14 de Janeiro) no *D. sargus* e ponto 2 (4 de Fevereiro) no *D. vulgaris* (figura 17).

b) Percentagem de Vibrios

A percentagem de ufc's de vibrios foi aumentando ao longo dos três pontos de colheitas para o sargo (figura 18-A), estando abaixo dos 10% no mês de Janeiro e acima dos 60% no ponto de Junho.

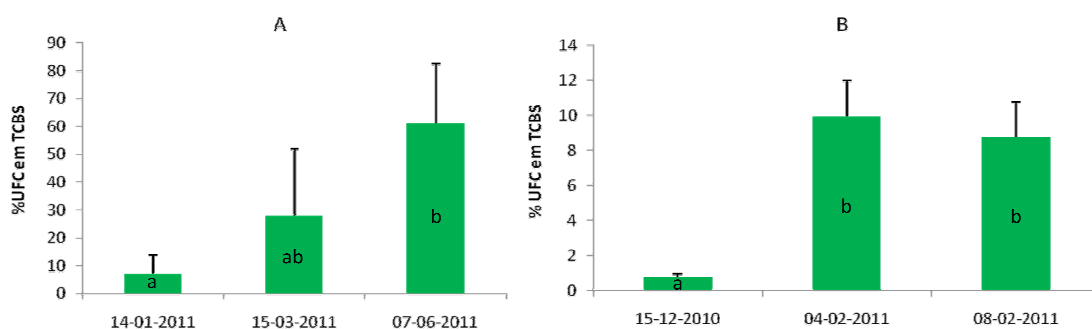


Figura 18 Percentagem de ufc de *Vibriaceae* quanto ao número total de bactérias. A) *Diplodus sargus*, B) *Diplodus vulgaris*. As diferentes letras indicam diferentes significâncias estatísticas (one-way ANOVA).

Também na safia se registou uma percentagem de vibrios mais baixa na primeira colheita de ovos, em Dezembro, do que nas efectuadas em Fevereiro (figura 18-B). No entanto, na safia as percentagens de vibrios não ultrapassaram os 10% em relação ao número total de bactérias em nenhum dos pontos amostrados.

c) Taxa de eclosão dos ovos

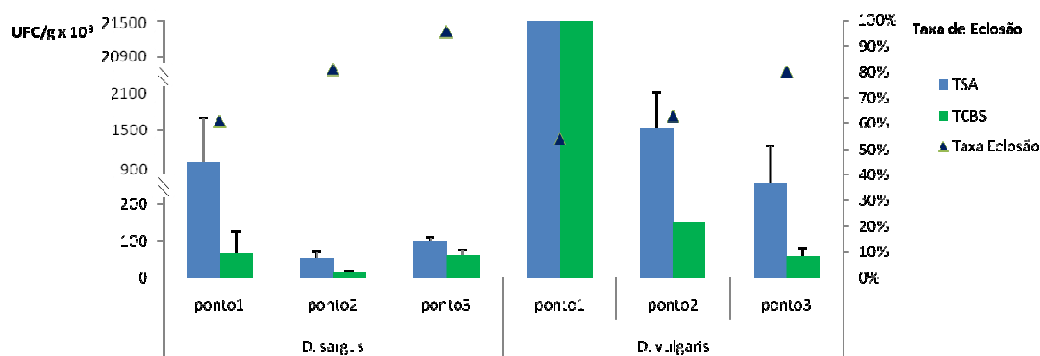


Figura 19 Relação entre o número de ufc's e a taxa de eclosão dos ovos das espécies *Diplodus sargus* e *Diplodus vulgaris*.

Nos ovos de *D. sargus* e *D. vulgaris* verifica-se uma correlação negativa entre as ufc's do número total de bactérias e *Vibrionaceae* e as taxas de eclosão (figura 19), com menores taxas de eclosão nos primeiros pontos de colheita de ovos de ambas as espécies, onde o número de ufc's foi maior, sendo que com a diminuição do número de ufc's observa-se um aumento na taxa de eclosão nos ovos das duas espécies estudadas (figura 19). Registrando-se uma diferença de 35% e de 26% do primeiro ponto para o último do sargo e da safia, respectivamente.

d) Identificação bacteriológica

A identificação microbiológica indica que os ovos de *D. sargus* (figura 20a) e *D. vulgaris* (figura 20b) apresentam bactérias do género *Vibrio* e *Aeromonas*. Nos ovos de *D. vulgaris* foram também encontradas bactérias do género *Flavobacterium* bem como da espécie *Micrococcus* (figura 20b).

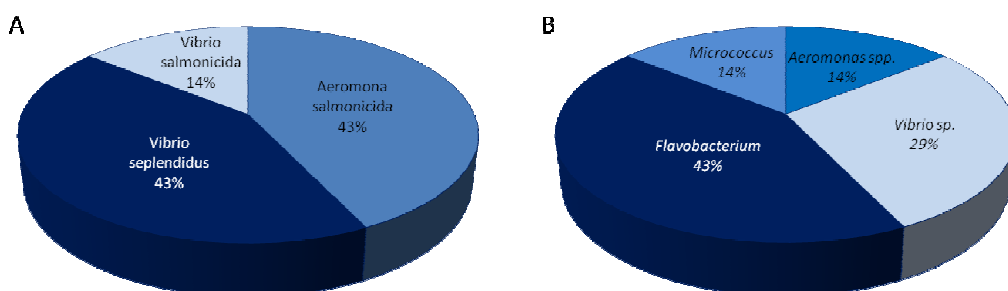


Figura 20 Identificação bacteriológica de algumas das colónias encontradas num ponto de amostragem nas primeiras colheitas, nos ovos de sargo (A) e nos ovos de safia (B).

Das colónias isoladas dos ovos de *D. sargus* a maioria correspondia a *Vibrio splendidus* e a *Aeromona salmonicida*, e apenas uma pequena percentagem de *Vibrio salmonicida* (figura 20a). Nos ovos de *D. vulgaris* foram identificadas maioritariamente colónias de *Flavobacterium* e *Vibrio sp.*.

Discussão

A época de postura da safia (*D. vulgaris*), nas instalações do IPIMAR, teve uma duração de cerca de dois meses, tendo-se iniciado em Dezembro e terminado em Fevereiro. Em meio natural, na Costa Portuguesa o período de desova desta espécie estendeu-se de Outubro a Novembro (Henriques, 1997), ligeiramente mais cedo do que foi observado no presente estudo, mas ainda assim coincidindo com os meses mais frios. Já no caso do sargo (*D. sargus*) a época de postura ocorreu durante cerca de cinco meses com início em Janeiro e fim em Junho, semelhante ao que se observou anteriormente por Mouine *et al.* (2007) e Morato *et al.* (2003) no meio natural, em que se estendeu de três a cinco meses, dependendo da temperatura.

Em ambas as espécies, as oscilações em quantidade de ovos observadas ao longo da época parecem ser influenciadas pelas flutuações na temperatura da água. Na figura 4, verifica-se que os dias em que se observaram maiores posturas na safia ocorreram após variações na temperatura. No sargo, também se observa que os dias em que houve maiores quantidades de ovos, ocorreram durante ou após alterações na temperatura da água. Nesta espécie em meio natural a temperatura óptima para a postura encontra-se entre os 15° C e os 17 ° C (Morato *et al.*, 2003). Sabe-se que a temperatura tem uma forte influência na fase final da maturação dos oócitos e na postura (Van Der Kraak & Pankhurst, 1997 in Sandström *et al.*, 1997). Na *Perca fluviatilis* a postura começava mais cedo e era mais extensa nas áreas onde a água era mais quente (Sandström *et al.*, 1997), e no linguado (*Solea senegalensis*) a temperatura tem também um papel importante no início e na duração do período de postura, sendo que abaixo dos 16 ° C deixam de desovar (Dinis *et al.*, 1999). A safia, neste estudo, deixou de desovar abaixo aos 15° C e o sargo abaixo dos 12 ° C. Seria interessante estudar de que maneira a

variação da temperatura realmente afecta ou não a quantidade diária e qualidade dos ovos nestas duas espécies.

No que se refere aos ritmos diários de postura, neste estudo tanto o sargo como a safia revelaram ritmos diários muito marcados. Na safia é evidente a repetição de uma oscilação nas posturas ao longo de 5 dias não consecutivos. No entanto, não é clara a hora em que se produz um pico. Esta espécie apresentou, durante toda a época de reprodução, posturas com quantidades de ovos muito baixas e o fluxo de água não era muito elevado o que levou a que os ovos demorassem mais tempo a sair do tanque, por este motivo as variações entre as horas não foram significativas. Contudo, quando olhamos para os estados de desenvolvimento em que os ovos se encontravam de manhã ao serem recolhidos, é possível ver diferenças significativas nas diferentes horas da postura. Inicialmente, entre as 15h00 e as 19h00, verifica-se a presença maioritária de ovos em neurula, que já serão da postura do dia anterior. Às 21h00 observa-se um aumento de morulas, atingindo o pico às 23h00, quando o seu aumento se torna significativo, o que indica que a postura do dia terá começado por volta das 21h00, tendo os ovos desta postura continuado a sair do tanque durante toda a noite e início da manhã.

No caso do sargo o ritmo diário é mais claro, observando-se uma repetição ao longo de vários dias na hora a que ocorre o pico de postura, entre as 21h00 e as 23h00, padrão este que se reflecte também na onda média em que a hora que apresenta maior quantidade de ovos é 21h00. Este resultado repete-se quando olhamos para os estados de desenvolvimento em que se encontravam os ovos nos diferentes compartimentos do colectador, à hora que foram recolhidos pela manhã. Nos compartimentos correspondentes às primeiras horas, entre as 15h00 e as 19h00, os ovos encontravam-se na sua maioria em neurula, que tal como já foi referido para a safia, correspondiam provavelmente a ovos da postura do dia anterior que demoraram mais tempo a sair do tanque. A partir das 19h00 começam a aparecer mais ovos em morula, o que indica o início da postura, apresentando um pico de morulas às 21h00. Segundo Kamacı *et al.* (2005), para a dourada (*Sparus aurata*) a uma temperatura de 18.5°C, o ovo começa as primeiras divisões celulares cerca de 1:00h após a fecundação, chegando ao estado de mórula após cerca de 4:00h e a neurula após 16:00h. No entanto, a velocidade a que o ovo se desenvolve e o tempo que leva a eclodir depende das condições de incubação, principalmente da temperatura. No caso do linguado senegalês observou-se que os ovos incubados a 18° C demoravam mais cerca de 24h00 a eclodir do que quando incubados

a 24° C (Blanco-Vives, comunicação pessoal). No presente estudo, no caso do sargo, desde o momento em que o ovo entrava no colector, por volta das 21h00 (p.e.), até ser recolhido e visto à lupa passavam cerca de 12 a 13 horas e o ovo encontrava-se em morula. Nos últimos dias de recolha de dados para o estudo dos ritmos diários de postura do sargo, no fim de Abril, a temperatura já se encontrava um pouco mais elevada, entre 21,9° C e 22,1° C, e verificou-se que a grande maioria dos ovos já se encontravam em neurula, em todas as horas de recolha, e nas primeiras já era possível visualizar o embrião (dados não mostrados). É preciso ter em conta que os dados dos estados de desenvolvimento foram retirados em diferentes temperaturas, uma vez que esta, nos dias em que houve postura, variou entre 16 e 20° C e 13,9 e 24° C, no tanque das safias e dos sargos, respectivamente, e que os gráficos apresentados nas figuras 9 e 10 representam as percentagens médias de todos os dias de recolha.

No que diz respeito às taxas de eclosão, na safia não se observaram diferenças significativas entre os ovos que saíram do tanque a diferentes horas. Já os dados de taxas de eclosão das posturas do sargo mostraram valores significativamente mais baixos nos ovos que foram libertados do tanque nas primeiras horas da noite, assim que os animais começaram a pôr, quando comparados com os que foram libertados a horas mais avançadas da noite. Estas diferenças nas taxas de eclosão das primeiras para as últimas horas do dia, estão provavelmente relacionadas com diferenças na qualidade dos ovos, que pode variar consoante vários factores: idade materna e factor de condição, timing do ciclo de postura, processos de sobrematuração, factores genéticos e por propriedades intrínsecas do próprio ovo (Kjørsvik *et al.*, 2003). Não sabemos que fêmeas estão a desovar em cada momento, mas muito provavelmente não são as mesmas no princípio e no fim da noite. Diferentes indivíduos poderão apresentar diferente qualidade na sua postura, tanto devido ao factor genético como a nível da alimentação. Apesar dos peixes da mesma espécie estarem no mesmo tanque e como tal terem a mesma alimentação, poderão não ter igual acesso ao alimento, e este é um factor muito importante na qualidade dos ovos, especialmente no conteúdo em lípidos, sendo este um dos aspectos mais estudados no que toca à qualidade e viabilidade do ovo (Brooks *et al.*, 1997). Outra hipótese é o facto dos ovos que foram libertados do tanque por volta das 21h00 estarem durante mais tempo dentro do colector antes de serem recolhidos, estando expostos a um elevado hidrodinamismo e perdendo qualidade. Já os ovos que saíram do tanque por volta das 3h00 estiveram menos tempo no colector, e o stress causado pelo movimento da água e a falta de espaço foi menor, e a qualidade dos

ovos poderá ter sido menos afectada. A possível perda de qualidade dos ovos expostos a este tipo de stress hidrodinâmico é um factor pertinente que seria interessante estudar de futuro. Este tipo de estudo poderá trazer benefícios a nível das maternidades, permitindo a optimização dos protocolos de recolha dos ovos e conseqüentemente os níveis de sobrevivência dos mesmos. Muito provavelmente a recolha imediata dos ovos após a entrada no colector, permitirá a obtenção de ovos de melhor qualidade.

Quando os sargos foram expostos a um fotoperíodo LD durante vários dias consecutivos, com o intuito de estudar a possível existência de um relógio interno a controlar o seu ritmo de postura, observou-se o mesmo ritmo referido anteriormente, em que os peixes iniciaram as posturas ao escurecer, por volta das 19h00, com um pico às 21h00. O ritmo manteve-se durante os cinco dias que durou o ensaio em LL, e portanto podemos sugerir a existência de um relógio endógeno a controlar este ritmo, o que vem de acordo com resultados anteriores noutras espécies como a dourada (*Sparus aurata*) (Meseguer *et al.*, 2008) ou o linguado (*Solea senegalensis*) (Oliveira *et al.*, 2009). No entanto, uma exposição a luz continua a longo prazo parece inibir a maturação sexual na arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) (Davie *et al.* 2007), na perca (*Perca fluviatilis*) (Migaud *et al.* 2004), e nos machos de robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Felip *et al.* 2008). Quando o ciclo LL foi novamente alterado para um ciclo LD, ocorreu uma ressincronização no *timing* da postura. No primeiro dia depois de LL, os peixes não desovaram, e nos dias seguintes observou-se um atraso no momento da postura, de cerca de 4 horas, começando às 23h00 e apresentando um pico à 01h00. Após este período, os peixes ressincronizaram o ritmo e voltaram a pôr à mesma hora descrita anteriormente, salientando a influência das condições do fotoperíodo na sincronização do *timing* da postura. Na Dourada (*Sparus aurata*) destacou-se um pico antes do anoitecer, e uma capacidade de ressincronização gradual após uma inversão de 12h no ciclo luz-escuridão (LD) (Meseguer *et al.*, 2008). No linguado (*Solea senegalensis*) foi visível um ritmo de postura nocturno, com a postura também a começar imediatamente depois do anoitecer (Oliveira *et al.*, 2009). Ambas as espécies mantiveram a sua ritmicidade durante alguns dias após a alteração dos fotoperíodos, sugerindo a existência de um relógio endógeno que controla o ritmo diário de postura também nestas duas espécies (Oliveira *et al.*, 2009 e Meseguer *et al.*, 2008), tal como observado no nosso estudo. Migaud *et al.* (2006) mostrou que as condições de fotoperíodo para além de influenciarem o tempo de postura e as taxas de desova têm também uma grande

influência na gametogénese, na fecundidade da fêmea, nas taxas de fertilização e na mortalidade dos reprodutores na perca Euro-Asiática (*Perca fluviatilis*).

O número total de bactérias presentes nos ovos das duas espécies estudadas neste trabalho rondou as 10^4 - 10^5 ufc g^{-1} para o sargo e 10^5 - 10^6 ufc g^{-1} para a safia, que está abaixo dos valores reportados por Kubilay *et al.* (2009) para os ovos não desinfectados e bastante acima quando comparado com os ovos desinfectados de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). No entanto, é de referir que os ovos das duas espécies estudadas não foram desinfectados, influenciando o número total de bactérias.

Segundo Barbosa (2006), no interior da Ria Formosa, a abundância e biomassa da comunidade de bacterioplâncton exibiram um ciclo sazonal unimodal, com valores máximos no Verão, e relacionaram-se positiva e significativamente com a temperatura. Neste estudo verificou-se que as unidades formadoras de colónias (ufc's) do número total de bactérias apresentaram uma relação negativa com a temperatura, com valores mais elevados nas colheitas em que se registaram temperaturas mais baixas. No entanto, as colheitas dos ovos de sargo foram feitas entre Janeiro e Junho e os de safia entre Dezembro e Fevereiro, e segundo Dionísio (1996), as bactérias saprófitas, no período entre 1991 e 1992, registaram picos entre Janeiro e Fevereiro, sendo que em Junho registou valores mais baixos de saprófitas em duas das estações estudadas. O que está de acordo com os nossos resultados, onde se registaram valores mais elevados de ufc's nos meses de Janeiro e Fevereiro, assim é provável que haja uma relação entre a abundância bacteriana da Ria Formosa, de onde provém a água dos tanques, com a abundância encontrada nos ovos.

O *Vibrio* foi um dos géneros mais abundantes nos ovos de sargo quando comparados com os ovos de safia, não tendo neste último ultrapassado os 10%. A percentagem de ufc's de *Vibrio* foi aumentando ao longo dos pontos de colheitas em ambas as espécies. Estes pontos foram feitos em diferentes alturas do ano. No sargo as recolhas foram feitas com dois e três meses de diferença tendo o primeiro sido feito no Inverno e os restantes na Primavera/Verão. Na safia a recolha dos ovos foi feita sempre no Inverno, ainda assim os dois meses de diferença do primeiro ponto para os restantes registou diferenças significativas na percentagem de *Vibrio*. A proliferação destas bactérias nos ovos de peixe num ecossistema natural é normal, uma vez que o género *Vibrio* é natural em habitats de ambientes aquáticos, principalmente em habitats marinhos e estuarinos (Caruso *et al.*, 1996) como é o caso da Ria Formosa.

Para além do género *Vibrio* foi também identificado o género *Aeromonas* em ambas as espécies. Nos ovos de safia identificaram-se bactérias do género *Flavobacterium* bem como *Micrococcus*. *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Vibrio* foram apontadas por diferentes autores na superfície de ovos de peixes, nos ovos de alabote do Pacífico (*Hippoglossus hippoglossus*) a microflora encontrada era dominada por membros do género *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas* e *Flavobacterium* (Hansen & Olafsen, 1989).

Os géneros *Vibrio* e *Aeromonas* estão presentes em águas tropicais e temperadas de todo o mundo e colonizam as águas costeiras do Mar Mediterrâneo de Espanha, Tunísia, Turquia e Itália (Snoussi *et al.*, 2006). Segundo Cahill (1990) as bactérias associadas à superfície dos peixes parecem reflectir a diversidade de bactérias da água envolvente. De futuro seria interessante fazer a identificação da microflora da superfície dos ovos de ambas as espécies relacionando com a microflora da água envolvente.

Nos ovos de *D. sargus* e *D. vulgaris* verificaram-se menores taxas de eclosão nos pontos de colheita em que houve maior número de ufc's totais e de *Vibrionaceae*, vindo a aumentar nos pontos de colheita com menor número de ufc's. Segundo Bergh (1999) a presença de bactérias na superfície do ovo ou no interior do ovo pode influenciar a sua viabilidade e qualidade, sendo que as bactérias apresentam diferentes estratégias de se desenvolver, podendo ser directamente patogénicas para o ovo, ou podendo aderir à superfície deste e infectar a larva recém-eclodida. No caso em estudo, a relação negativa entre a taxa de eclosão e o número de ufc's para os ovos de ambas as espécies, indica que provavelmente algumas das bactérias tenham afectado a qualidade da postura. Por outro lado, a qualidade da postura poderá também determinar a maior ou menor colonização bacteriana. A relação entre a microflora natural e oportunistas patogénicos não é clara. Nos géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Vibrio* estão incluídos patógenos e é comum isolá-las de peixes saudáveis normais, mas apenas algumas destas bactérias possuem o factor de virulência necessária para induzir uma doença (Cahill, 1990). As estirpes não patogénicas destas bactérias são fortes candidatos a probióticos, que são considerados como uma alternativa ao uso de antibióticos na aquacultura (Olafsen, 2001). Nos ovos de dourada foram apontados efeitos positivos das estirpes probióticas de *Aeromonas spp.*, tendo-se verificado um aumento significativo no crescimento de larvas de dourada (Avella *et al.*, 2010).

Conclusões

- ✓ A época de postura da safia estendeu-se de Dezembro a Fevereiro com a temperatura a variar entre 14,3° e 20° C, ao passo que no sargo ocorreu entre Janeiro e Junho tendo a temperatura variado entre 11° e 24,4° C. Em ambas as espécies observaram-se maiores posturas durante ou após variações da temperatura, -.
- ✓ Ambas as espécies apresentaram ritmos diários de postura muito marcados. Sendo que o pico da postura diária, tanto na safia como no sargo, ocorreu por volta das 21h00.
- ✓ As taxas de eclosão das posturas do sargo mostraram valores significativamente mais baixos nos ovos que foram libertados do tanque nas primeiras horas da noite quando comparados com os que foram libertados a horas mais avançadas da noite. Esta diferença pode dever-se a factores biológicos, relacionados com a fêmea, ou às condições de saída do tanque, nomeadamente o tempo de permanência no colectador.
- ✓ O sargo quando exposto a um fotoperíodo de luz constante (LL) manteve o ritmo de postura normal durante os cinco dias do ensaio, o que sugere a existência de um relógio endógeno a controlar este ritmo. Após a mudança do fotoperíodo de LL para LD ressincronizou a sua postura, o que demonstra a influência das condições do fotoperíodo na sincronização do timing da postura.
- ✓ O número total de bactérias presente nos ovos de safia rondou os 10^5 - 10^6 ufc.g⁻¹, e nos ovos de sargo os 10^4 - 10^5 ufc.g⁻¹.
- ✓ Neste estudo verificou-se uma relação negativa entre o total de bactérias e a temperatura da água. O que, provavelmente, poderá estar relacionado com a abundância bacteriana da Ria Formosa, de onde provem a água dos tanques, na altura da recolha dos ovos. Para o comprovar deveria ser feito um estudo neste sentido de modo a verificar se há ou não esta relação.
- ✓ Os géneros presentes nos ovos de sargo foram *Vibrio* e *Aeromonas*. Nos ovos de safia para além destes dois géneros foram também identificadas bactérias do género *Flavobacterium* e *Micrococcus*.

- ✓ As taxas de eclosão dos ovos de ambas as espécies apresentaram menores percentagens nos pontos de colheita com maior número de unidades formadoras de colónias totais e *Vibrionaceae*.

Bibliografia

Abellan E. & Garcia-Alcazar A., 1995. Pre-growout and growout experiences with white seabream (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758) and sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti, 1977). In: Proceedings of the CIHEAM Network on Tehnology of Aquaculture in the Mediterranean (M. Lasram ed.). University of Montpellier, Montpellier.

Avella, M.A., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P. C., Bracciatelli, Carnevali, O., 2010. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture* 305: 12–19.

Amano M., Iigo M., Ikuta K., Kitamura S., Yamada H., and Yamamori K., 2000. Roles of Melatonin in Gonadal Maturation of Underyearling Precocious Male Masu Salmon. *General and Comparative Endocrinology* 120: 190–197

Aschoff J., 1981. Thermal conductance in mammals and birds – its dependence on body size and circadian phase. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 69: 611-619

Barbosa A., 2006. Estrutura e dinâmica da teia alimentar microbiana na Ria Formosa. Tese de Doutorado do ramo de Ciências do Mar, especialização em Oceanografia pela Universidade do Algarve.

Bayarri M.J., García-Allegue R., López-Olmeda J.F., Madrid J.A. and F.J. Sánchez-Vázquez, 2004. Circadian melatonin release in vitro by European sea bass pineal. *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 87–89

Bergh Ø., 1999. Bacterial pathogens associated with early life stages of marine fish. In Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. Pp 221-228

Bolliet V., Ali M.A., Lapointe F.J., Falcón J., 1996. Rhythmic melatonin secretion in different teleost species: an in vitro study. *Journal Comp. Physiol.* 165:677-683

Bromage N., Porter M., Randall C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63–98

Brooks S., Tyler C.R. and Sumpter J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 387 - 416

Bye V. J.. The role of environmental factors in the timing of reproductive cycles. In: Potts G. W. (Eds.) e Wootton R. J. (1984). Academic Press Limited, London. Pp 187-205

Cahill M.M., 1990. Bacterial Flora of Fishes: A Review. *Microbial Ecology* 19: 21-41

Cahill G.M., 1996. Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Research* 708: 177-181

Caruso, G., Zaccone, R., Crisa, E., 1996. Distribution and numerical taxonomy of Vibrionaceae in waters of the straits of Messina. *Microbiologica* 19: 155-166.

Clark R.W., Henderson-Arzapalo A., Sullivan C.V., 2005. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* 249: 497– 513

Cymborowski B.. Introduction to circadian rhythms. In: Kulczykowska E. (Eds), Popek W., and Kapoor B.G. (2010). *Biological clock in fish*. New Hampshire USA: Science Publishers. PP 1-26

Davie A., de Quero C.M., Bromage N., Treasurer J., and Migaud H. 2007. Inhibition of sexual maturation in tank reared haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) through the use of constant light photoperiods. *Aquaculture* 270: 379–389

Dinis M.T., Ribeiro L., Soares F., Sarasquete C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176: 27–38

Dionísio L., 1996. Estudos Microbiológicos da Ria Formosa. Qualidade sanitária de águas e moluscos bivalves. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, especialização em Microbiologia pela Universidade do Algarve.

Falcón J., Besseau L., Sauzet S., and Boeuf G., 2007. Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Endocrinology and Metabolism* 18: 81-88

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
<http://www.fao.org/fishery/species/2370/en> 2010

Felip A., Zanuy S., Muriach B., Reverter J.M.C., and Carrillo M. 2008. Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275: 347–355

Gonçalves J.M.S., Bentes L., Coelho R., Correia C., Lino P.G., Monteiro C.C., Ribeiro J., Erzini K., 2003. Age and growth, maturity, mortality and yield-per-recruit for two banded bream (*Diplodus vulgaris* Geoffr.) from the south coast of Portugal. *Fisheries Research* 62: 349–359

Hamlett W.C., 2001. Reproduction in Fish. *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.

Hansen G.H., and Olafsen J.A., 1989. Bacterial Colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1435-1446

Henriques P.J., 1997. Estudo da eco-etologia de *Diplodus vulgaris* (pisces: Sparidae) – Padrões agonísticos e estruturação social. Dissertação de Mestrado em Etologia. Instituto superior de psicologia aplicada, Lisboa.

Kamacı H. O., Saka Ş., Fırat K., 2005. The Cleavage and Embryonic Phase of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) Eggs. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 22: 205-209

Kjørsvik E., Mangor-Jensen A., and Holmefjord I., 1990. Egg Quality in Fishes. Advances in Marine Biology 26: 71-113

Kjørsvik E., Hoehne-Reitan K., Reitan K.I., 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Aquaculture 227: 9 –20

Kubilay, A., Altun, S., Savaş, S. 2009. A study on aerobic bacterial flora during incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) eggs in hatchery. Journal of Fisheries Sciences 3(1): 5-9

Meseguer C., Ramos J., Bayarri M.J., Oliveira C., and Vázquez F.J.S. 2008. Light Synchronization of the Daily Spawning Rhythms of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L*) kept under different photoperiod and after shifting the LD Cycle. Chronobiology International 25(5): 666–679

Migaud H., Fontaine P., Kestemont P., Wang N., and Bellut J.B. 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 241: 561–574

Migaud H., Wang N., Gardeur J.N., and Fontaine P. 2006. Influence of photoperiod on reproductive performances in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 252: 385– 393

Morato T., Afonso P.,Lourinho P., Nash R.D.M. and Santos R.S., 2003. Reproductive biology and recruitment of the white sea bream in the Azores. *Journal of Fish Biology* 63: 59–72

Moretti, A., Fernandez-Criado, M. P., Cittolin, G., Guidastri, R. 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Volume 1 205p

Mouine N., Francour P., Ktari M.H. and Marzouk N.C., 2007. The reproductive biology of *Diplodus sargus sargus* in the Gulf of Tunis (central Mediterranean). *Scientia Marina* 71(3): 461-469

Olafsen J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223–247

Oliveira C., Dinis M. T., Soares F., Cabrita E., Pousão-Ferreira P., and Vázquez F.J.S. 2009. Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole *Solea senegalensis*. *Journal of Fish Biology* 74: 0–0

Oliveira C., Duncan N.J., Pousão-Ferreira P., Mañanós E., and Sánchez-Vázquez F.J., 2010. Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 306: 343–347

Petersen, C. & Hess, H., 1991. The adaptative significance of spawning synchronization in the Caribbean damselfish *Stegastes dorsopunicans* (Poey). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 151: 155-167

Rabanal H. R., 1988. History of Aquaculture. ASEAN/UNDP/FAO Regional Small-Scale Coastal Fisheries Development Project, Manila, Philippines

Rahman, M. S., Takemura, A. & Takano, K. (2000). Lunar synchronization of testicular development and plasma steroid hormone profiles in the golden rabbitfish. *Journal of Fish Biology* 57, 1065–1074. doi: 10.1111/j.1095–8649.2000.tb02212.x

Rahman, Md. S., Takemura, A. & Takano, K. (2002). Lunar synchronization of in vitro steroidogenesis in ovaries of the golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *General and Comparative Endocrinology* **125**, 1–8.

Rahman, M. S., Takemura, A., Nakamura, S. & Takano, K. (2003). Rhythmic changes in testicular activity with lunar cycle in the fork-tail rabbitfish. *Journal of Fish Biology* **62**, 495–499. doi: 10.1046/j.1095–8649.2003.00036.x

Rheinheimer G., 1992. *Aquatic Microbiology* 4th Edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. Pp 31-39

Ruoff P., and Rensing L., 2004. Temperature effects on circadian clocks. *Journal of Thermal Biology* **29**: 445–456

Saavedra M. and Pousão-Ferreira P., 2006. A preliminary study on the effect of lunar cycles on the spawning behaviour of the gilt-head sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **86**: 899-901

Sandström O., Abrahamsson I., Andersson J. and Vetemaa M., 1997. Temperature effects on spawning and egg development in Eurasian perch. *Journal of Fish Biology* **51**: 1015-1024

Shapiro D.Y.. Sex reversal and sociodemographic processes in coral reef fishes. In: Potts G. W. (Eds.) e Wootton R. J. (1984). Academic Press Limited, London. Pp 103-118

Snoussi M., Chaieb K., Mahmoud R., Bakhrouf A., 2006. Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some *Vibrionaceae* associated to a marine fish hatchery. *Annals of Microbiology*, **56** (4): 289-293

Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A. and Schlegel H.G., 1981. *The Prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin pp 2284.

Vera L.M., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J., 2006. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology & Behavior* 88: 167–172

Vera L.M., De Pedro N., Gómez-Milán E., Delgado M.J., Sánchez-Muros M.J., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J., 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & Behavior* 90: 518–524