

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Resposta metabólica da ostra *Crassostrea gigas* na  
presença do parasita *Amyloodinium ocellatum***

**Narjara Andrade de Souza**

Mestrado em Aquacultura e Pescas

Especialização em Aquacultura

ORIENTADOR:

Doutora Florbela Soares e Profa. Doutora Teresa Modesto

Faro, 2015

Título:

**Resposta metabólica da ostra *Crassostrea gigas* na presença do parasita  
*Amyloodinium ocellatum***

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam de listagem de referência incluída.

Assinatura \_\_\_\_\_

Copyright Narjara Andrade de Souza

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

Dedico este trabalho a pessoa que foi mais importante na minha vida:

À minha mãe **Maria José de Andrade** (*in memoriam*)

## **Agradecimentos**

À minha grande família, por fazerem parte da minha vida e que mesmo estando longe por me apoiarem sempre que precisei, em especial aos meus irmãos Nivalda, Nayara e Nivaldo Filho pelos contantes estímulos, amor e ajuda durante a realização deste trabalho. À memória da minha mãe, por me ensinar os valores da vida e por ser o maior exemplo que tenho hoje.

À Dra. Florbela Soares pelo aceite na orientação deste trabalho, pelas palavras de motivação, por toda paciência e ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

À Dra. Emília Cunha pelo suporte, ensinamentos e pela disponibilidade demonstrada durante o decorrer deste estudo. Minha eterna gratidão.

À Dra. Teresa Modesto pela orientação e disponibilidade sempre que precisei.

À Estação de Piscicultura de Olhão (EPPO), representada pelo Dr. Pedro Pousão-Ferreira e toda equipa, obrigada por todo apoio e ajuda.

Aos meus grandes amigos de turma Gil Martins, Márcio Moreira, Olesya Kutsyna e Tony Crowther pela amizade, companheirismo e pelas experiências vividas. Really happy to meet you guys.

A todos aqueles, que não citei, mas que me apoiaram nesta caminha e difícil fase da minha vida.

À Deus, por me acompanhar, dando-me saúde e paz.

O Meu muito obrigada!

## Resposta metabólica da ostra *Crassostrea gigas* na presença do parasita *Amyloodinium ocellatum*

### Resumo

O dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* é um ectoparasita que tem causado sérios problemas na aquacultura ao redor do mundo. Vários métodos têm sido testados para tentar eliminar o parasita mas nenhum se mostrou totalmente eficiente. Os bivalves são filtradores e tem a capacidade de reter e eliminar organismos do meio ambiente deixando estes de estar disponíveis para infectar a ictiofauna presente. Ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram expostas a *A. ocellatum* avaliada a sua resposta metabólica. Foi analisada a taxa de respiração e filtração das ostras a diferentes temperaturas e na presença do parasita e feita a análise histológica do trato digestivo e brânquias no tempo 0, 2, 4, 8, 24 e 48 h após exposição ao parasita. Os resultados mostraram que houve um aumento da taxa de respiração entre as temperaturas 17.7 e 27.9 °C de 0.20 para 0.30 mg l h g<sup>-1</sup> e a temperatura de 20 °C, o consumo de oxigénio na presença do parasita diminuiu em 40%, em 1 h. A taxa de filtração das ostras aumentou entre as temperaturas 16 e 20 °C para 2.60 ± 1.70 µg l h g<sup>-1</sup> e 3.72 ± 2.23 µg l h g<sup>-1</sup>, tendo-se mantida a 24 °C para 3.78 ± 1.47 enquanto decresceu na temperatura 28 °C para 1.42 ± 0.45 µg l h g<sup>-1</sup>. Em 48 h, as ostras filtraram todo o parasita da água a uma taxa de remoção de 0.08 cel. ml h g<sup>-1</sup>. Os resultados histológicos mostraram que as brânquias e o trato digestivo foram gravemente afectados pela presença do *A. ocellatum*. Este estudo demonstrou que a ostra *Crassostrea gigas* é afectada a nível fisiológico e histológico pela presença e/ou ingestão do parasita *A. ocellatum* e, com isto, este parasita continua sendo uma preocupação devido aos seus efeitos deletérios nos organismos e, assim, a contínua necessidade de investigação para tentar inibir ou controlar o seu desenvolvimento nos tanques de aquacultura.

Palavras-chave: *Amyloodinium ocellatum*; *Crassostrea gigas*; Histologia; Respirometria

## Metabolic response of the oyster *Crassostrea gigas* in the presence of the parasite *Amyloodinium ocellatum*

### Abstract

The dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* is an ectoparasite which has caused serious problems in aquaculture around the world. Various methods have been tried to eliminate the parasite but none has proved completely effective. Bivalves are biological filters and have the ability to retain and remove organisms from the environment avoiding these organisms to be available to infect the fish fauna. Oyster *Crassostrea gigas* were exposed to *A. ocellatum* to assess their metabolic response. We analyzed the oxygen consumption and filtering rates in the oysters at different temperatures, in the presence of the parasite we also proceeded to the histological examination of the digestive tract and gills at time 0, 2, 4, 8, 24 and 48 h of exposure to the parasite. The results showed that there was an increase in the rate of respiration in temperatures between 17.7 and 27.9 ° C from 0.20 to 0.30 mg l h g<sup>-1</sup> while in the temperature at 20 ° C, the oxygen consumption in the presence of the parasite decreased by 40%, in 1 h. Oyster filtration rate increased between temperatures 16 and 20 ° C from 2.60 ± 1.70 µg l h g<sup>-1</sup> to 3.72 ± 2.23 µg l h g<sup>-1</sup>, having been maintained at 24 ° C for 3.78 ± 1.47 µg l h g<sup>-1</sup> and decreased in temperature while 28 ° C for 1.42 ± 0.45 µg l h g<sup>-1</sup>. After 48 h, oysters filtered the whole parasite at the removal rate of 0.08 cel. ml h g<sup>-1</sup>. The histological results showed that the gills and the digestive tract have been severely affected by the presence of *A. ocellatum*. This study demonstrated that the oyster *Crassostrea gigas* is affected at physiological and histological level by the presence and / or ingestion of the parasite *A. ocellatum* and this parasite remains a concern due to their deleterious effects on organisms and thus continued need for research to try to inhibit or control their development in aquaculture tanks

Keywords: *Amyloodinium ocellatum*; *Crassostrea gigas*; Histology; Respirometry

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJECTIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1.Aclimação das ostras.....	8
3.2.Parâmetros morfométricos analisados.....	9
3.3.Cultivo do <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	9
3.4.Ensaio para avaliação das taxas de respiração e filtração de ostras <i>Crassostrea gigas</i> a diferentes temperaturas e na presença do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	9
3.5.Avaliação do efeito da presença de ostras na concentração dos dinósporos na água e das alterações nas brânquias e trato digestivo das ostras em presença do parasita.....	13
3.6.Análise estatística.....	15
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
4.1.Taxa de respiração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> a diferentes temperaturas e na presença do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	16
4.1.1.Características morfométricas da população amostrada.....	16
4.1.2.Taxa de respiração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> a diferentes temperaturas.....	16
4.1.3.Taxa de respiração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> na presença do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	17
4.2.Taxa de filtração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> a diferentes temperaturas e taxa de remoção de dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> da água.....	20
4.2.1.Características morfométricas da população amostrada.....	20
4.2.2.Taxa de filtração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> à diferentes temperaturas .....	21
4.2.3.Taxa de remoção de dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> da água pela ostra <i>Crassostrea gigas</i> .....	22

4.3.Histologia.....	23
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
5.1.Taxa de respiração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> a diferentes temperaturas e na presença do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	30
5.2.Taxa de filtração da ostra <i>Crassostrea gigas</i> em diferentes temperaturas e a taxa de remoção de dinósperos <i>Amyloodinium ocellatum</i> da água.....	32
5.3.Histologia.....	34
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A aquacultura tem crescido rapidamente nos últimos anos e tem sido responsável pelo aumento da oferta de pescado quando comparada com a captura do meio natural, a pesca (FAO, 2014). De acordo com a mesma fonte, a aquacultura contribuiu com um aumento de 16.7 milhões de toneladas no fornecimento global de peixes, crustáceos e moluscos entre os anos de 2007 a 2012, enquanto neste mesmo período, a pesca cresceu apenas 0.5 milhões de toneladas. Estes dados revelam o rápido desenvolvimento da aquacultura a nível mundial como uma actividade de produção alimentar, com potencial técnico-económico e social.

Com o rápido crescimento da aquacultura alguns problemas também têm ocorrido nesta actividade, principalmente os relacionados com patologias nos organismos aquáticos. As espécies produzidas em aquacultura são mais susceptíveis de serem infectadas devido às altas densidades de cultivo e por produzir maiores pressões postas aos peixes. Consequentemente, os riscos com as patologias são maiores. As principais classes de organismos patogénicos identificados em animais marinhos são as bactérias, os vírus, os fungos e os parasitas (Hawke, 2003).

A patologia constitui um factor limitante ao desenvolvimento do cultivo de algumas espécies e é responsável por grandes perdas na produção na aquacultura, sendo até difícil de avaliar economicamente o que essas perdas podem representar nesta actividade. Segundo Toranzo et al. (2005) o surgimento de uma doença nos peixes é o resultado da interacção entre organismos patogénicos, hospedeiro e o meio ambiente. Entre os ectoparasitas protozoários de peixes que vivem em águas quentes eurialinas ou marinhas, o mais importante é o dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931). Actualmente, este parasita tem causado sérios danos na aquacultura semi-intensiva em tanques de terra no sul da Europa onde a água tende a aquecer mais durante o Verão. Este parasita apresenta uma distribuição mundial infectando mais de 100 espécies diferentes em águas salgadas e salobras

Kuperman & Matey, 1999). Na Europa, já infectou várias espécies de peixes em locais como o Mediterrâneo (Alvarez-Pellitero et al., 1993), incluindo Eilat, Itália (Fioravanti et al., 2006) e ainda no mar Vermelho (Paperna, 1980). Em Portugal, foi primeiro diagnosticado em 1994 em douradas (*Sparus aurata*) cultivadas em aquacultura (Menezes, 1994) e mais tarde em população natural de robalos (*Dicentrarchus labrax*) na Lagoa de Óbidos e no estuário do Sado (Menezes, 2000). Desde o começo de 2000, tem sido detectado anualmente em aquaculturas portuguesas causando altas mortalidades em dourada, robalo, pregado (*Psetta maxima*) (Saraiva et al., 2011) e mais recentemente em corvina (*Argyrosomus regius*) (Soares et al., 2012). No Algarve, em particular, este dinoflagelado foi responsável por elevadas perdas de peixes em aquaculturas (Moita et al., 2005).

*Amyloodinium ocellatum* é um ectoparasita obrigatório, microscópico, unicelular, termofílico, eurialino que apresenta uma distribuição cosmopolita (Lom & Dyková, 1992). É o agente etiológico da amiloodiniose, também designada como “velvet disease”. Este organismo, tem um complicado ciclo de vida que apresenta três estágios de desenvolvimento. A fase parasitária ou trofante, que constitui o estado vegetativo de alimentação imóvel, apresenta forma esférica, ovóide ou elíptica, cuja dimensão chega a atingir 264 µm (média aprox. 100 µm) de comprimento, e 176 µm (média aprox. 61 µm) de largura. Apresenta uma coloração esbranquiçada ou dourada. Externamente possui uma cápsula pseudoquitinosa; no citoplasma é possível observar um núcleo esférico e grande, numa posição central, apresenta numerosos cromatóforos, grânulos de amido e vacúolos digestivos. Na zona polar existe uma estrutura de fixação composta por um pedúnculo curto com numerosos rizóides que permite penetrar e fixar-se ao hospedeiro e um estomatópodio, estrutura especializada na absorção de nutrientes; possui um flagelo curto na base da abertura da cápsula e um estigma como órgão sensitivo. Nesta fase não apresenta cloroplastos. No final do processo de absorção dos nutrientes os rizóides e o estomatópodio são absorvidos através da abertura da cápsula em aproximadamente 20 minutos, resultando no fecho total da cápsula. Assim inicia-se a etapa seguinte: tomonte, forma reprodutiva ou encapsulada. Durante esta fase ocorrem numerosas e sucessivas divisões celulares, único modo de

reprodução do parasita. Segundo Paperna (1984) o número de divisões antes da esporulação depende do tamanho e da idade do trofante. Finalizado o processo de divisão é alcançada a fase dispersiva ou de dinósporo, que constitui o estado activo do parasita e apresenta uma morfologia típica de dinoflagelado nadando em busca de um hospedeiro (Fig.1). Segundo Brown & Hovasse (1946), cada tomonte pode-se reproduzir em 256 dinósporos e cada um com capacidade para infectar um novo hospedeiro. Este parasita pode completar seu ciclo de vida em 3 a 6 dias à temperatura de 20 °C (Paperna, 1984).

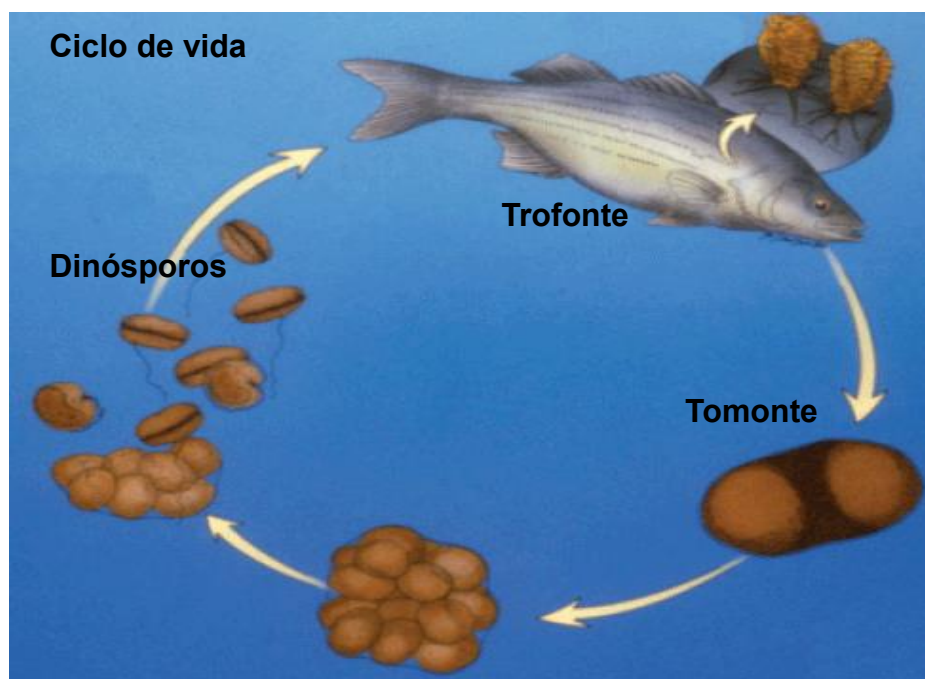


Fig.1. Ilustração das diferentes fases do ciclo de vida do parasita *Amyloodinium ocellatum* (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Na aquacultura, a mortalidade dos peixes pelo *A. ocellatum* pode atingir taxas muito elevadas e a dificuldade de tratamento fazem com que esta espécie constitua uma séria preocupação para os piscicultores, por ser um parasita com graves efeitos deletérios (Eiras, 1994; Levy & Noga, 2005), levando à destruição da totalidade de tanques de cultivo, em poucos dias. Os peixes infectados com o parasita apresentam um quadro clínico caracterizado pela alteração do comportamento, como: coçar-se no fundo ou em objectos que possam existir no tanque; constante abertura da boca devido a dificuldades respiratórias; falta de apetite; natação errática; ocorrência de manchas brancas na pele e nas barbatanas; e, no caso de infestações mais avançadas, olhos

opacos (Almeida, 2005; Júnior, 2009). As lesões histopatológicas ocorrem nas brânquias como hiperplasia das células do epitélio respiratório com fusão das lamelas, descoloração das células do epitélio respiratório, alterações degenerativas, inflamações, hiperplasia acompanhada de hemorragia, depleção das células mucosas e necrose. A morte do animal surge de perturbações graves respiratórias e de osmorregulação, agravadas geralmente por infecções bacterianas secundárias nas brânquias e na pele, ocasionadas pela infestação e desenvolvimento dos trofontes (Mehlhorn, 2008).

Diferentes métodos para eliminar e controlar o *A. ocellatum* nas aquaculturas têm sido testados (Levy & Noga, 2005). A manipulação dos parâmetros químicos e físicos é muito difícil de ser efectiva porque o parasita tolera altas faixas de temperatura e salinidade. O estado de vida livre (dinósporo) é susceptível a terapia (Lawler, 1980; Paperna, 1984) mas o estado de parasita (trofonte) e encapsulado (tomonte) são mais difíceis de tratar. Os únicos produtos comprovadamente eficazes contra este parasita são o cobre e a cloroquina difosfato (Almeida, 2005). O tratamento químico com cloroquina difosfato, um medicamento anti-malária, é eficaz em matar os dinósporos, não sendo tóxico para os peixes mas sendo para algas e invertebrados (Levy & Noga, 2005). O uso de sulfato de cobre também tem mostrado bastante eficácia no tratamento do *A. ocellatum*, porém o sulfato de cobre tem um efeito altamente adstringente no epitélio branquial e tóxico para o fígado (Ramos, 2011). Outros produtos têm sido testados, como o peróxido de hidrogénio que se revelou eficaz, no entanto obriga a tratamentos de dosagens a níveis entre 75 e 100 ppm, sendo prejudiciais aos peixes (Montgomery-Brock et al., 2000; Montgomery et al., 1998) e técnicas como a aplicação de antigénios na tentativa de imunizar o peixe contra os dinósporos ou ainda utilizando soro anti-*A. ocellatum* (Noga et al., 2002; Cobb et al., 1998; Smith et al., 1994). Técnicas de biorremediação como a utilização de náuplios de *Artemia salina*, predadoras de dinósporos, também foram testadas (Oestmann et al., 1995). Abreu et al. (2005) testou a utilização de radiação ultravioleta cujos resultados não demonstraram grande sucesso, assim como banhos de água doce para eliminar a fase de dinósporos, no entanto, dadas as características eurialinas da espécie a técnica não é eficaz. Segundo Noga et al. (2001) e Oestmann &

Lewis (1996b) a utilização de antibióticos poderá ser utilizada na prevenção e tratamento do parasita nas pisciculturas. Considerando os diferentes tratamentos possíveis, são factores a ter em conta a sua viabilidade para aplicação nas empresas e o impacto que os mesmos terão tanto a nível de bioacumulação de metais pesados e consequente degradação do meio assim como a possibilidade de criação de estirpes multirresistentes pela aplicação de antibióticos.

A utilização de filtros biológicos mostra-se como uma alternativa bastante promissora para reduzir o parasita do ambiente. Na natureza existem vários organismos com a capacidade de filtrar a água. As ostras são um exemplo disso, são organismos que se alimentam da matéria orgânica em suspensão e são também espécies exploradas na aquacultura. As ostras têm a capacidade de reter e eliminar organismos do meio ambiente deixando estes de estar disponíveis para infectar a ictiofauna presente. Um trabalho realizado por Severino (2008), com a utilização de ostras como filtro biológico na remoção dos dinósporos da água apresentou resultados bastante satisfatórios em que esta espécie promoveu a redução entre 94 e 98.6% do parasita do meio. No entanto, é necessário estudos para verificar possíveis alterações do efeito da presença do parasita na capacidade fisiológica e histológica das ostras, verificando assim o que poderia ocorrer num ambiente natural ou num tanque de aquacultura.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objectivo geral contribuir com informação que possa permitir utilizar as ostras da espécie *Crassostrea gigas* no controlo da proliferação do parasita *Amyloodinium ocellatum* nos tanques de cultura de peixes. Neste estudo pretendeu-se avaliar o potencial efeito da presença de *Crassostrea gigas* no controlo da abundância de dinósporos na água e determinar possíveis alterações fisiológicas e histológicas nestes bivalves provocados pela presença do parasita.

Assim, foram definidos os seguintes objectivos específicos: 1) Determinar o efeito da presença de ostras na concentração de dinósporos na água; 2) Avaliar o efeito da presença do parasita nas taxas de filtração e respiração das ostras a diferentes temperaturas; 3) Determinar alterações nas brânquias e trato digestivo das ostras na presença do parasita.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) (Fig.2), durante os anos de 2013 e 2014. A estação está localizada no sul de Portugal a uma latitude de 37° 03`N e longitude de 07° 40`W. Em 2013, a temperatura da água nesta estação teve um valor mínimo de 11.0 °C e máxima de 29.9 °C enquanto em 2014, a temperatura mínima foi de 10.7 °C e máxima de 26.7 °C (Registros da EPPO). As ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram recolhidas em tanque de cultivo da EPPO, em diferentes meses do ano, para a realização dos ensaios. Consequentemente, as ostras utilizadas tinham diferentes tamanhos e condições fisiológicas o que poderia afectar e/ou influenciar nos resultados. Dessa forma, houve a preocupação de dar a informação sobre as características morfométricas da população usadas nos diferentes ensaios.

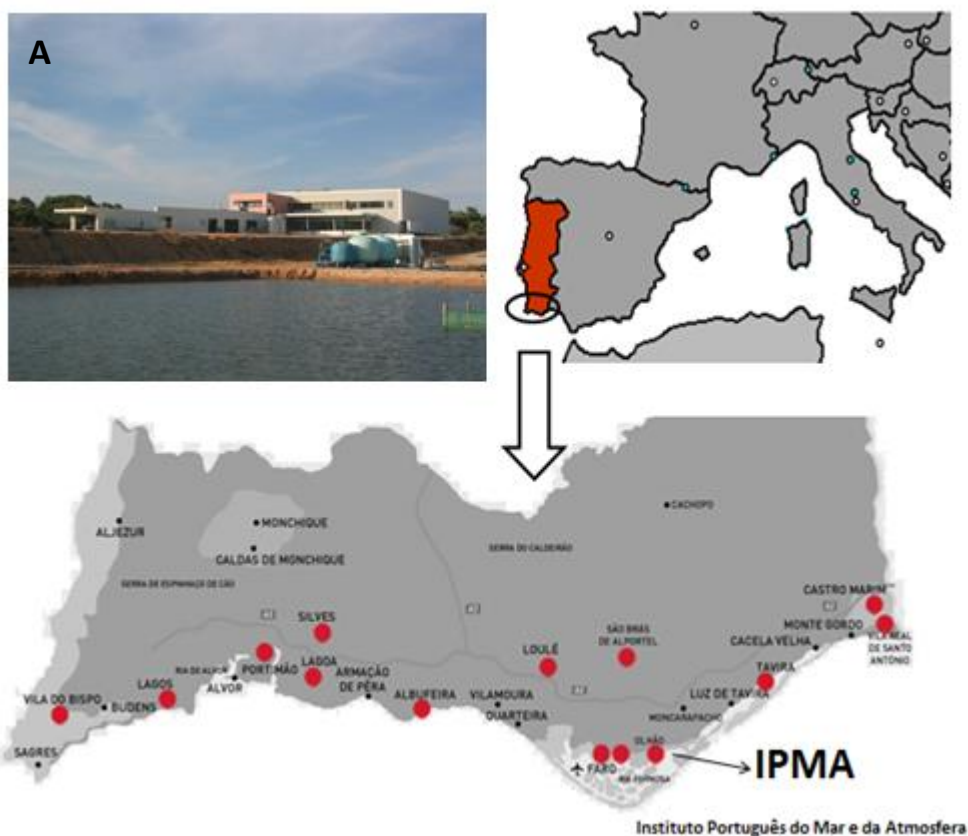


Fig. 2. Imagem da EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão e mapa da localização do IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera, em Olhão – PT.

### 3.1. Aclimação das ostras

Antes dos ensaios, as ostras foram limpas de organismos incrustantes, aclimatadas durante 5 dias, num tanque de 150 L, de água salgada com salinidade  $30\pm 1$ , em sistema fechado com água filtrada e mantida a temperatura controlada com a ajuda de uma resistência com termostato (Fig.3). O arejamento foi constante e diariamente as ostras foram alimentadas com 2 L de microalga *Isochrysis galbana* a uma concentração média de  $1 \times 10^4$  cel.  $\text{ml}^{-1}$ . A alimentação das ostras foi suspensa 24 h antes dos ensaios.



Fig.3. Tanque de 150 L utilizado na aclimação das ostras *Crassostrea gigas*

### 3.2. Parâmetros morfométricos analisados

As ostras foram medidas e pesadas antes do início dos ensaios de acordo com Galtsoff (1964). No final do ensaio, a carne das ostras foi removida da concha, seca a 80 °C numa estufa, por 48 h, e pesada.

Os parâmetros morfométricos analisados foram peso total (g), comprimento total (mm), peso seco (g) e o Índice de condição (IC). O índice de condição (IC) foi calculado de acordo com a equação (1):

$$IC = \text{Miolo seco} / (\text{Miolo húmido} \times 100) \quad (1)$$

### 3.3. Cultivo do *Amyloodinium ocellatum*

Para dar início ao desenvolvimento do ciclo do parasita *A. ocellatum* foram introduzidos 6 peixes (*Diplodus sargus*) num tanque de 500 L de água salgada contendo cistos do parasita (Fig.4). À medida que os peixes foram morrendo no tanque, devido as infestações pelo parasita, novos peixes eram adicionados ao tanque. O tanque tinha um sistema de recirculação fechado, um filtro biológico com uma taxa de renovação de 6 m<sup>3</sup>/h e arejamento constante. A temperatura do tanque foi mantida a 26 °C ± 1 °C com ajuda de uma resistência com dois termostatos, salinidade 30 e uma lâmpada fluorescente de intensidade luminosa 900 lux, 12:12 h L:D. Todos os dias amostras da água foram recolhidas com frascos castanhos e preservadas com uma solução de lugol (2 ml de lugol para cada 250 ml de água) para verificar a concentração do parasita e o estado de desenvolvimento do mesmo (Fig.4A). As amostras eram colocadas numa câmara de sedimentação Utermöhl (Hasle, 1978) e em seguida, observadas num microscópio de inversão ZEISS-Axiovert 135. Quando a água apresentou uma concentração acima de 800 cel. ml<sup>-1</sup> de dinósporos, foi utilizada para a realização dos ensaios.

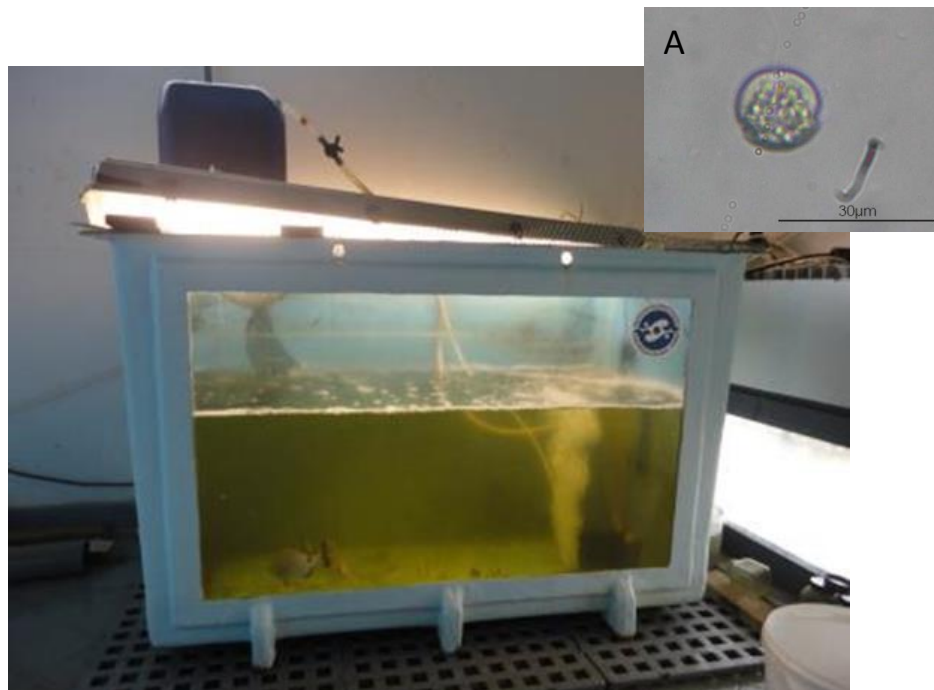


Fig. 4. Tanque de 500 L de água salgada, com sistema de água fechado e com cistos de *Amyloodinium ocellatum*. (A) Dinósporo de *Amyloodinium ocellatum* isolado.

### **3.4. Ensaio para avaliação das taxas de respiração e filtração de ostras *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas e na presença do parasita *Amyloodinium ocellatum***

Os ensaios foram realizados em diferentes meses do ano. Os ensaios da taxa de respiração ocorreram entre os meses de Abril e Junho de 2013 enquanto os ensaios para a taxa de filtração realizaram-se entre Setembro e Novembro do mesmo ano. Os ensaios com o parasita *A. ocellatum*, as taxas de respiração, remoção e histologia ocorrem entre Maio e Agosto de 2014.

As taxas de respiração e de filtração das ostras foram avaliadas através dos consumos de oxigénio dissolvido (OD) e valores de *Clorofila a* (*Cl\_a*) na água a diferentes temperaturas. Os ensaios foram efectuados nas temperaturas de 16, 20, 24 e 28 °C. Um ensaio consistiu na determinação dos consumos de oxigénio dissolvido e o segundo no consumo de *Clorofila a* na água num tempo conhecido (1.5 h para o ensaio da taxa de respiração e 30 min. para a taxa de filtração), para duas densidades diferentes de ostras e um controlo num total de 9 respirómetros (Fig.5), câmaras de acrílico estanques de 5,5 L cada (Fig.5A),

colocados num banho-maria nas mesmas condições de temperatura. Os valores médios para cada densidade resultam de triplicados em que 3 respirómetros tinham o dobro da densidade de outros 3 e os últimos 3 não possuíam ostras (controlo). A água utilizada nas experiências foi semelhante à dos tanques de terra na qual as ostras eram normalmente mantidas. Para ajustar a temperatura da água do banho-maria ao valor desejado foi utilizada uma resistência com termostato. As amostras da água foram recolhidas no início e no final da experiência, depois de um tempo determinado e antes que todo OD/*Cl<sub>a</sub>* fosse consumido. Para evitar os efeitos da produção de oxigênio pela actividade fotossintética das células fitoplanctônicas presentes na água dos respirómetros estes foram cobertos com uma lona preta. No caso da determinação das taxas de filtração foi utilizado arejamento constante para evitar a sedimentação do fitoplâncton. A concentração de oxigênio dissolvido foi determinada pelo método Winkler (Strickland & Parson, 1972) e da clorofila *a* (*Cl<sub>a</sub>*) foi determinado pelo método Lorenzen (1967). Os cálculos da taxa de respiração (2) e da taxa de filtração (3) foram baseados nas equações:

$$T_R \text{ (mg l h g}^{-1}\text{)} = \frac{(C_{t_1} - C_{t_0}) V}{t_1 - t_0} / P \quad (2)$$

Onde:

$C_{t_0}$  = Concentração de oxigênio inicial;

$C_{t_1}$  = Concentração de oxigênio final;

$t_0$  = Tempo inicial;

$t_1$  = Tempo final;

V = Volume;

P = Peso dos indivíduos.

$$T_F (\mu\text{g l h g}^{-1}) = \frac{V}{t} \left( \ln \frac{C_{B_0}}{C_{B_t}} - \ln \frac{C_{C_0}}{C_{C_t}} \right) \quad (3) \text{ Coughlan (1969)}$$

Onde:

$C_{B_0}$  = Concentração clorofila inicial;

$C_{B_t}$  = Concentração clorofila final;

$C_{C_0}$  = Concentração inicial (controlo);

$C_{C_t}$  = Concentração final (controlo)

$t_1$  = Tempo final;

V = Volume;

t = Tempo.

A taxa de respiração das ostras expostas à presença de *A. ocellatum* foi avaliada a uma temperatura de 20 °C tendo-se utilizado a metodologia descrita acima. Ostras que tinham sido previamente expostas a uma concentração de 1.485 dinósporos ml<sup>-1</sup>, tanque de 100 L durante 48 h foram colocadas em 3 respirómetros tendo-se usado outros 3 com o mesmo número de ostras livres do parasita e 1 respirómetro de controlo sem ostras. A água salgada utilizada no ensaio foi esterilizada com UV.



Fig. 5. Tanque com as câmaras utilizadas na realização dos ensaios. (A) Câmaras de acrílico de 5.5 L (Respirômetros).

### **3.5. Avaliação do efeito da presença de ostras na concentração dos dinósporos na água e das alterações nas brânquias e trato digestivo das ostras em presença do parasita**

Depois de aclimatizadas, 40 ostras foram distribuídas aleatoriamente num tanque de 150 L com água filtrada, salinidade 30‰ e temperatura a  $20 \pm 1$  °C. A temperatura foi mantida utilizando uma resistência com termostato e arejamento constante. As ostras foram colocadas em água com uma concentração inicial de  $839,2$  dinósporos  $\text{ml}^{-1}$  de *A. ocellatum*, durante 48 h. Para monitorizar a presença dos dinósporos foram recolhidas amostras da água nos tempos 0, 2, 4, 8, 24 e 48 h depois do início da experiência. As amostras (250 ml) foram recolhidas em triplicado, fixadas com uma solução de Lugol (2 ml de lugol para cada 250 ml de água) e preservadas no escuro até a sua contagem.

Os dinósporos foram contados em sub-amostras de 5 ml pela técnica de Utermöhl (Hasle, 1978). Essas sub-amostras, previamente homogeneizadas, foram retiradas com uma pipeta graduada e foram adicionados 5 ml à câmara de sedimentação (Fig.6A). Depois de 2 h, as contagens foram feitas utilizando um microscópio invertido Zeiss Axiovert 135 e utilizando amplificação de 320X. A contagem na câmara foi feita considerando um campo microscópio como a área rectangular definida pelos quatro vértices do retículo instalado na ocular e percorrendo o fundo da câmara em linha recta e em paralelo de forma alternada (Fig.6B). O cálculo para verificar a concentração de dinósporos correspondeu à seguinte equação:

$$\text{Nº de parasitas (ml}^{-1}\text{)} = ( N \times 2 ) / V$$

Onde: N = número de parasitas contados na câmara

V = 5 ml da amostra

Para análise histológica, foram recolhidas 5 ostras nos tempos 0, 2, 4, 8, 24 e 48 h, depois do início da experiência. Foram retiradas amostras das brânquias e do trato digestivo das ostras e fixadas com solução de Davidson (Shaw & Battle, 1957) ( 10% glicerina, 20% formol, 30% álcool absoluto, 40% de água esterilizada), por 24 h. Em seguida, as amostras foram retiradas e conservadas com álcool a 70% até serem submetidas às técnicas histológicas para posterior análise. As amostras passaram por soluções com álcool 99% e xilol (1:1) durante 1h, xilol a 100% 2X durante 1h, xilol e parafina (1/4:1) durante 3 h com vácuo e por fim parafina pura durante 3 h com vácuo.

Numa consola de parafina, fez-se a inclusão das amostras nos blocos, a partir dos quais procedeu-se aos cortes histológicos (com espessura de 5 µm), num micrótomo Leica RM 2155. Os cortes foram colocados em banho-maria a 20 °C e fixados em lâminas de vidro. A secagem foi efectuada numa estufa a 35 °C, durante 24 h.

Para realização do exame histológico, procedeu-se a coloração dos cortes com Hematoxilina-Eosina (H&E). Depois de prontas, imagens dos tecidos foram fotografadas com uma unidade de controlo DS-L3 da NIKON com uma câmara DS acoplada ao microscópio modelo NIKON ECLIPSE Ci.

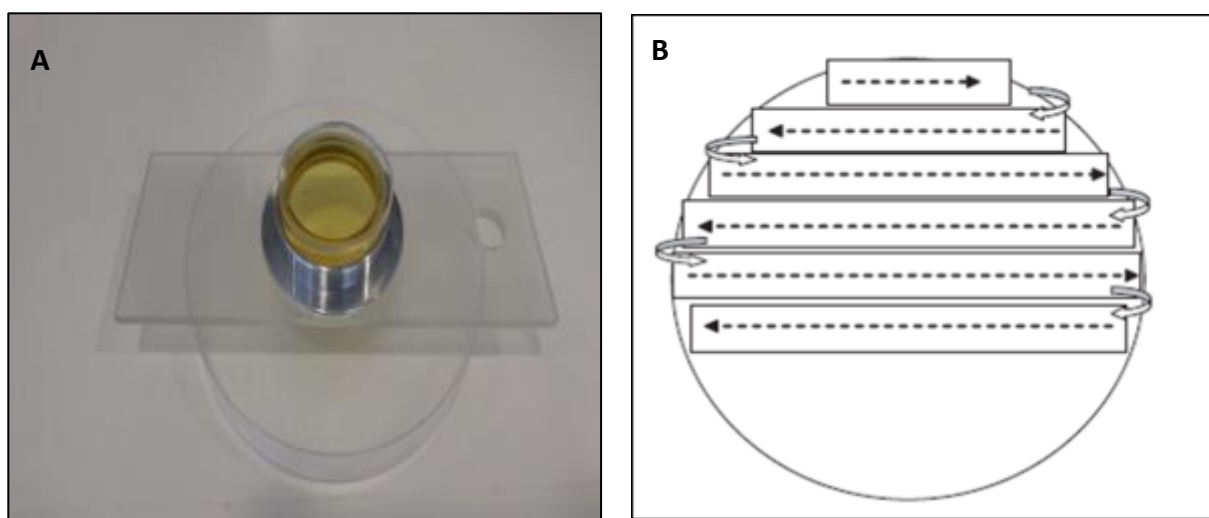


Fig. 6. Câmara de Utermöhl de 5 ml para contagem do *Amyllocladus ocellatum*. (A) Câmara com amostra em cima de uma placa petri; (B) Desenho esquemático do fundo da câmara com as linhas paralelas indicando a área de contagem.

### 3.6. Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as diferenças entre médias e o nível de significância foi de 0.05. Os dados estatísticos foram obtidos utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Taxa de respiração da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas e na presença do parasita *Amyloodinium ocellatum*

#### 4.1.1. Características morfométricas da população amostrada

Os dados das características morfométricas das ostras utilizadas nos ensaios a diferentes temperaturas estão apresentados na Tabela 1. As médias de peso total, peso seco, comprimento e Índice de condição (IC) apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) nos diferentes ensaios. As ostras utilizadas nos ensaios a 17.7, 21.1 °C e 21.6 °C apresentaram as maiores dimensões quando comparadas com as ostras nos ensaios às temperaturas de 25.1 °C e 27.9 °C. Em relação ao índice de condição, as ostras apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) nos ensaios a diferentes temperaturas. As ostras mantidas à temperatura de 17.7 °C e 21.6 °C apresentaram o maior índice, no mesmo acontecendo entre as temperaturas 21.1°C e 21.6 °C enquanto apresentaram diferenças nas ostras das temperaturas de 25.1 °C e 27.9 °C, ambas apresentaram diferenças entre si.

Tabela 1. Valores morfométricos médios dos indivíduos nas populações da ostra *Crassostrea gigas* usadas para determinação da taxa de consumo de oxigénio a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Peso (g)	Comprimento (mm)	Peso seco (g)	Índice de Condição	n
17.7	76.46± 5.89 <sup>a</sup>	75.49 ± 4.41 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.41 <sup>a</sup>	19.07 ± 3.22 <sup>a</sup>	12
21.1	68.99± 8.48 <sup>b</sup>	77.16 ± 4.45 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.89 <sup>b</sup>	17.01 ± 5.91 <sup>b</sup>	12
21.6	73.45± 8.98 <sup>a</sup>	73.66 ± 5.84 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.34 <sup>a</sup>	18.60 ± 4.30 <sup>ab</sup>	12
25.1	20.24± 1.07 <sup>c</sup>	54.48 ± 6.08 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>c</sup>	14.53 ± 5.78 <sup>c</sup>	24
27.9	20.61± 1.40 <sup>c</sup>	57.53 ± 5.19 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.20 <sup>c</sup>	12.91 ± 2.51 <sup>d</sup>	24

n= número de amostras. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

#### 4.1.2. Taxa de respiração da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas e na presença do parasita *Amyloodinium ocellatum*

Os dados mostraram que ocorreu um aumento do consumo de oxigénio pelas ostras à medida que foi aumentando a temperatura de água (Fig.7) e que existe uma relação exponencial positiva ( $R^2=0.52$ ) entre a taxa de consumo de oxigénio dissolvido por hora por grama pela *C. gigas* e o aumento da temperatura.

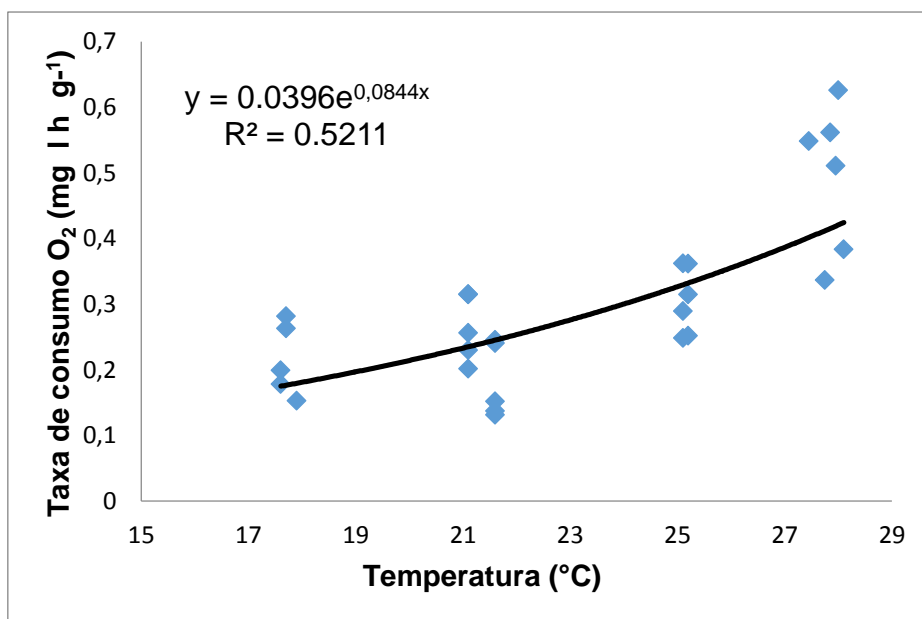


Fig.7. Representação gráfica da regressão exponencial e a equação da curva, entre o consumo de oxigénio dissolvido pelas ostras *Crassostrea gigas* às diferentes temperaturas.

Para cada temperatura, a taxa de consumo de oxigénio por peso seco de ostras foi melhor representada por regressões lineares e as rectas indicam o melhor ajuste dos pontos como mostra a Fig. 8. A equação ( $y = a + bx$ ), onde:  $y$  = consumo de oxigénio dissolvido (mg l h);  $x$  = peso seco das ostras em g;  $a$  = a intercepção representa o consumo de oxigénio do meio quando peso seco = 0 e  $b$  = o declive da recta representa a taxa intrínseca de respiração da população amostrada. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

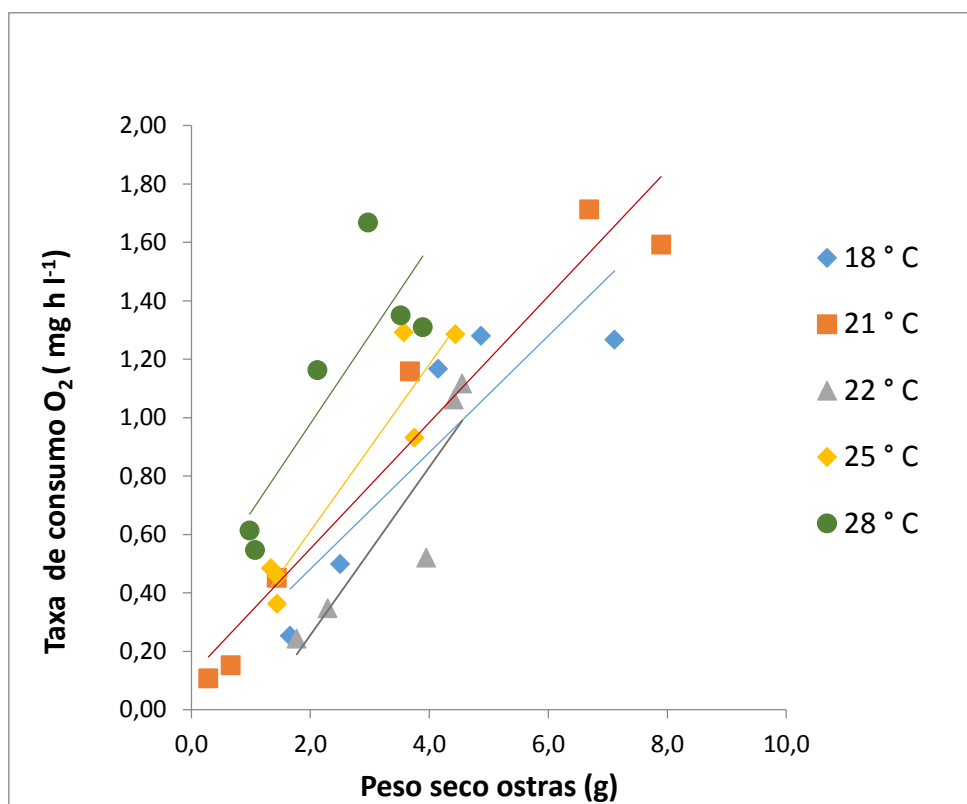


Fig.8. Relação entre os valores de consumo do oxigénio ( $\text{mg h}^{-1}$ ) e o peso seco das ostras (g) nas diferentes temperaturas. As rectas indicam o melhor ajuste dos pontos.

Verifica-se que existiu um aumento da taxa intrínseca de consumo de oxigénio pelas ostras com o aumento da temperatura. De acordo com os dados da Tabela 2, a menor taxa de consumo de oxigénio de  $0.20 \text{ mg l h g}^{-1}$  foi observado na temperatura de  $17.7 \text{ }^\circ\text{C}$  enquanto a maior taxa de consumo de  $0.30 \text{ mg l h g}^{-1}$  foi obtido na temperatura de  $27.9 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tabela 2. Parâmetros das equações de regressão linear ( $y = a + bx$ ) do consumo de oxigénio (y) pelo peso seco (x) da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas. n= número de amostras;  $r^2$ = coeficiente de determinação; b= declive (taxa intrínseca de consumo de oxigénio da população amostrada); a= intersecção (consumo de oxigénio do meio quando peso seco = 0).

Temperatura (°C)	n	b	a	$r^2$
17.7	5	0.20*	+0.08	0.883*
21.1	6	0.22**	+0.09	0.947**
21.6	5	0.29*	- 0.32	0.905*
25.1	6	0.29**	+0.04	0.944**
27.9	6	0.30*	+0.37	0.851*

\* (P<0.05); \*\* (P<0.01).

A taxa média de consumo de oxigénio da ostra à temperatura de 20 °C e na presença do parasita *A. ocellatum* foi  $0.21 \pm 0.04$  mg h l g<sup>-1</sup> enquanto na ausência do parasita a taxa aumentou para  $0.35 \pm 0.12$  mg h l g<sup>-1</sup>. De acordo com os dados estatísticos, não houve diferenças significativas (P=0.30) entre os dois tratamentos. No entanto, a média de consumo de oxigénio na presença do parasita é inferior quando comparado com ostras em condições normais (controlo).

## 4.2. Taxa de filtração da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas e taxa de remoção de dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* da água

### 4.2.1. Características morfométricas da população amostrada

Os dados das médias morfométricas das ostras estão apresentados na Tabela 3. De acordo com os tratamentos estatísticos, houve diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) nas médias de peso, peso seco, comprimento e Índice de condição (IC) para as diferentes temperaturas. As ostras sujeitas as temperaturas de 16 °C e 28 °C apresentaram as maiores médias de peso e comprimento quando comparado com as ostras sujeitas as temperaturas de 20 °C e 24 °C. No entanto, as temperaturas 16 °C e 20 °C apresentaram semelhantes médias de peso seco quando comparado com as ostras sujeitas as temperaturas 24 °C e 28 °C. Em relação ao IC, as temperaturas 20, 24 °C e 28 °C apresentaram médias semelhantes e maiores do que a temperatura 16 °C, que apresentou o menor índice de condição.

Tabela 3. Valores morfométricos médios dos indivíduos nas populações de *Crassostrea gigas* usadas para determinação das taxas de filtração a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Peso Médio (g)	Comprimento (mm)	Peso seco (g)	Índice de Condição	n
16	44.38± 5.92 <sup>a</sup>	75.47± 7.81 <sup>a</sup>	0.94± 0.18 <sup>a</sup>	10.84± 1.86 <sup>a</sup>	24
20	34.85± 5.23 <sup>b</sup>	68.78± 4.59 <sup>b</sup>	0.93± 0.20 <sup>a</sup>	15.40± 1.77 <sup>b</sup>	24
24	34.16± 5.31 <sup>b</sup>	64.5± 6.43 <sup>c</sup>	1.17± 0.28 <sup>b</sup>	16.48± 2.33 <sup>b</sup>	24
28	44.24± 6.42 <sup>a</sup>	69.64± 5.90 <sup>b</sup>	1.44± 0.33 <sup>b</sup>	16.74± 2.20 <sup>b</sup>	24

n= número de amostras. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.2. Taxa de filtração da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas

Os dados da Fig. 9, que correspondem à média das taxas de filtração obtidas nas diferentes temperaturas, mostram que houve um aumento destas entre 16 °C e 20 °C embora, dado o grande desvio padrão, não tenha sido estatisticamente significativo ( $P < 0.05$ ). Os valores foram semelhantes entre 20 °C e 24 °C diminuindo à temperatura de 28 °C. Nas temperaturas de 16, 20 °C e 24 °C as taxas de filtração foram de  $2.60 \pm 1.70$ ,  $3.72 \pm 2.23$   $\mu\text{g l h g}^{-1}$  e  $3.78 \pm 1.47$   $\mu\text{g l h g}^{-1}$ , respectivamente, enquanto na temperatura de 28 °C o valor foi de  $1.42 \pm 0.45$   $\mu\text{g l h g}^{-1}$ . Na temperatura a 28 °C, ao final do ensaio foi observado que as ostras entraram em processo de libertação de gâmetas.

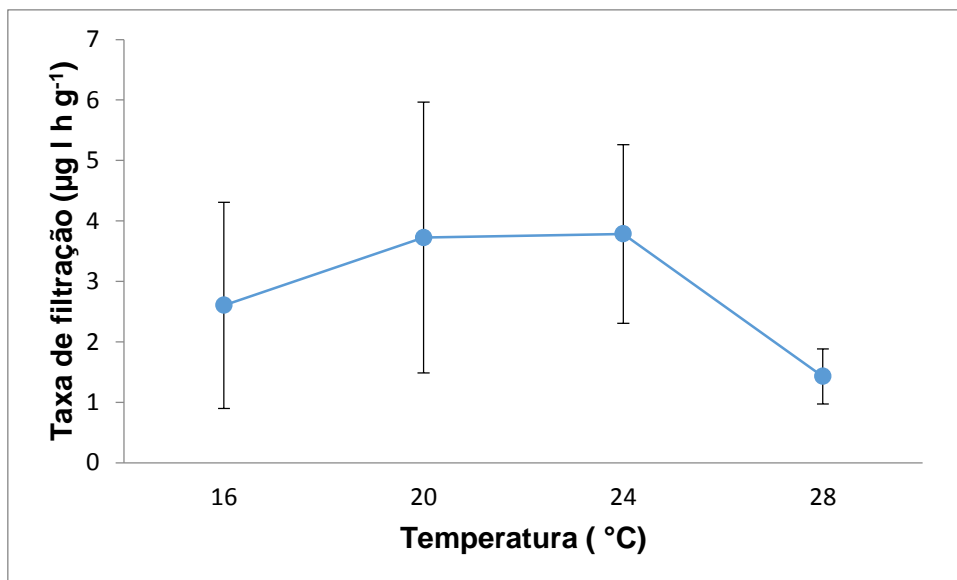


Fig. 9. Efeito da temperatura na taxa de filtração da ostra *Crassostrea gigas*. Barras em paralelo indicam o desvio padrão da média.

#### 4.2.3. Taxa de remoção de dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* da água pela ostra *Crassostrea gigas*

Na Fig. 10 representa-se a taxa de remoção de dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* pela ostra ao longo do tempo. As ostras apresentaram uma taxa de remoção média de 0.08 dinósporos ml h<sup>-1</sup>.

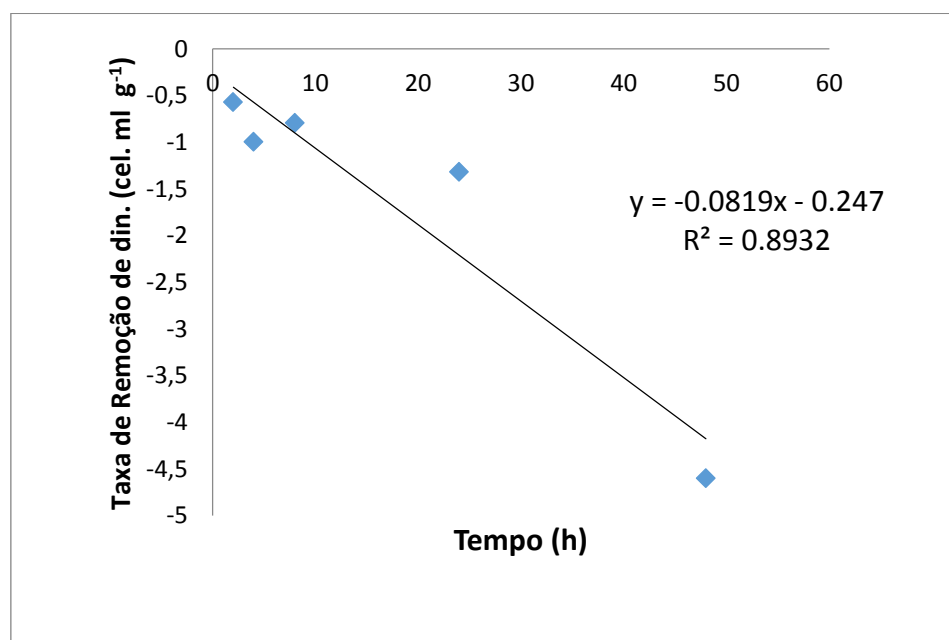


Fig. 10. Gráfico com a taxa de remoção de dinósporos na água (y) ao longo do tempo (x).

### 4.3. Histologia

Os tecidos analisados histologicamente foram as brânquias e o trato digestivo (estômago e intestino) de acordo com diferentes horas de exposição à presença do *A. ocellatum*. No presente estudo, não foi observado se o *A. ocellatum* teve alguma acção parasitária nas ostras, ou seja, os dados apresentados mostram as alterações morfológicas ocorridas nos tecidos referidos durante o tempo de exposição ao parasita.

#### a) Brânquias

Na Tabela 4, apresentam-se os resultados das alterações morfológicas mais significativas a nível branquial das ostras expostas a diferentes períodos de exposição ao parasita *A. ocellatum*.

Tabela 4. Alterações morfológicas das brânquias da *Crassostrea gigas* em exposição à presença do parasita *Amyloodinium ocellatum*, durante 48 h.

Lesão	Tempo (h)						
	0	2	4	8	12	24	48
Hiperplasia do epitélio branquial	0	0+	+	++	++	++	++
Hipertrofia do epitélio branquial	0	+	++	++	++	++	++
Erosão do epitélio	0	0	0+	++	++	++	++
Necrose	0	0	0	0	0	0+	+

Legenda: 0 ausente; 0+ pouco presente; + presente; ++ presente frequentemente

As alterações morfológicas observadas no tecido branquial das ostras expostas ao parasita, em diferentes períodos de tempo, mostraram severos danos que consistem em hiperplasia e hipertrofia do epitélio branquial e tecido conectivo, com inflamações e erosões severas com destruição das estruturas celulares, incluindo degeneração e destruição dos tecidos e necrose.

Nos tecidos das ostras no controlo, as brânquias apresentaram uma estrutura normal, com os filamentos branquiais bem diferenciados e com evidente espaçamento (Fig. 11A).

Após 2 h de exposição ao parasita, observou-se aumento na produção de muco. Às 4 h, ocorreu hipertrofia com alterações nas células mucosas nas extremidades dos filamentos (Figs. 11 B e C). As células mucosas exibiram início de inflamações acentuadas (Fig. 12).

Após 8 e 24 h de exposição ao parasita, observou-se hiperplasia acentuada nas extremidades dos filamentos branquiais e hipertrofia com inflamações severas (Figs. 11 D e E). As inflamações exibiram danos no tecido epitelial e conectivo, com início de degeneração celular, e foram mais acentuadas e mais evidentes nas brânquias com tempo de exposição depois das 24 h.

Ao final das 48 h, foram registradas alterações morfológicas danosas nas brânquias. As células do tecido epitelial e conectivo apresentaram completa destruição celular, destruição das estruturas celulares e início de necrose (Fig. 11 F).

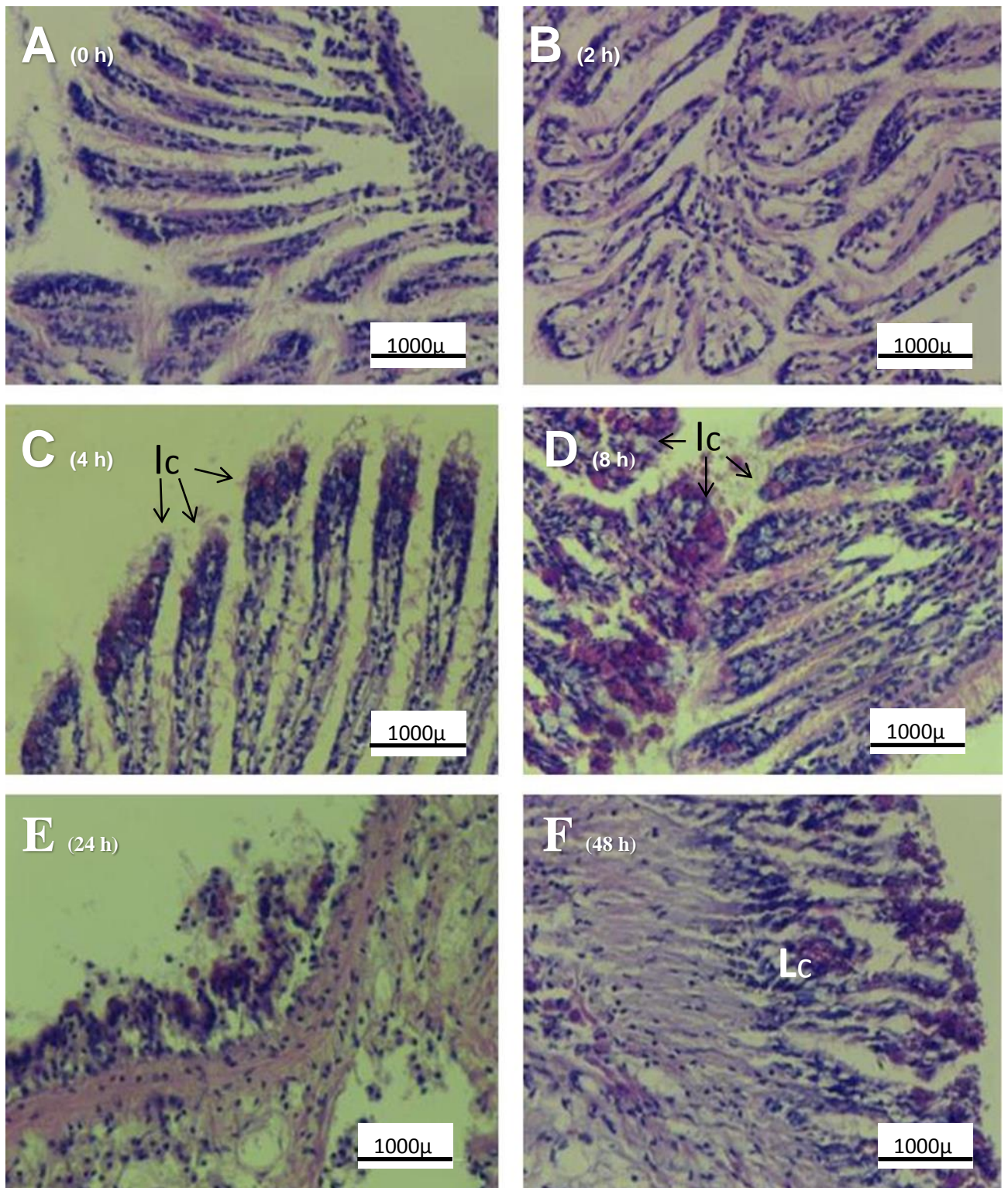


Fig. 11. Secções histológicas representativas das brânquias da ostra *Crassostrea gigas*. (A) Brânquia de uma ostra controle, estrutura normal; (B) 2 h - Estrutura branquial com aumento de muco; (C) 4 h - Brânquias com alterações nas células epiteliais e no tecido conectivo, hiperplasia (Ic) Inflamações nos filamentos branquiais; (D) 8 h - Hiperplasia, hipertrofia, lesões severas no tecido epitelial nas extremidades dos filamentos; (E) 24 h - Fusão dos filamentos branquiais ; (F) 48 h - Destruição total dos filamentos branquiais e início de necrose (Lc) Filamentos branquiais (H&E, 400x).

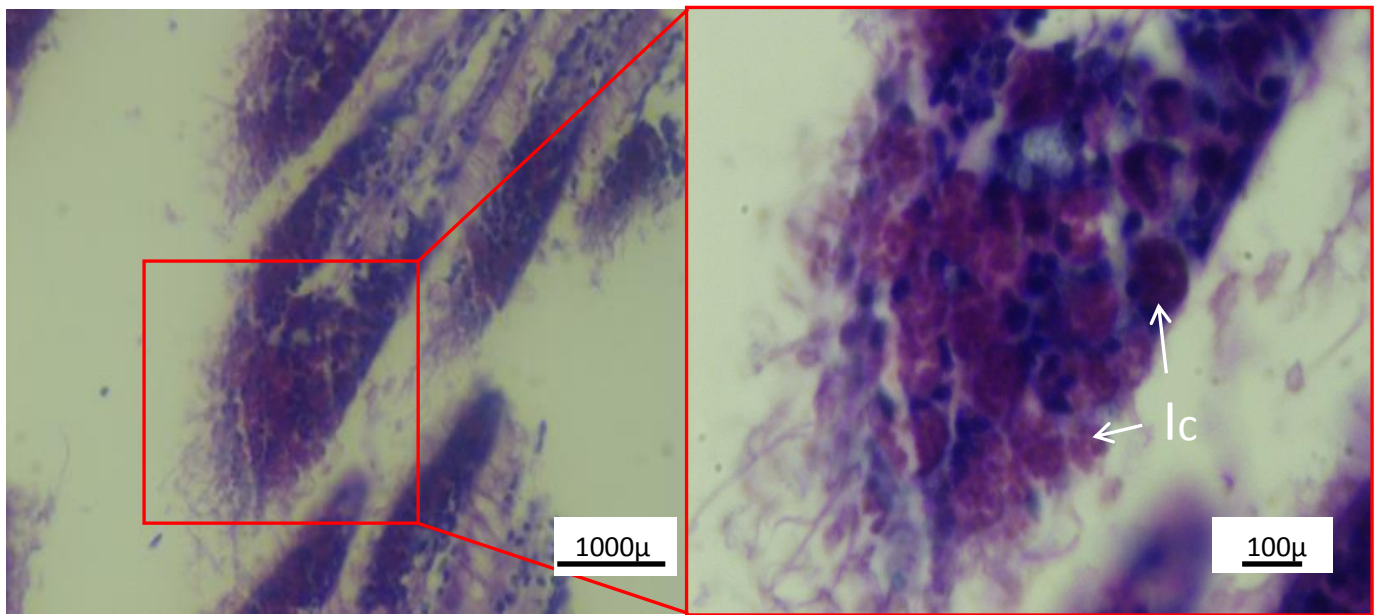


Fig. 12. Brânquia da ostra *Crassostrea gigas* com 4 h de exposição a *Amyloodinium ocellatum*. (lc) Severas inflamações nas células mucosas nas extremidades dos filamentos (H&E, 400x e 1000x).

## **b) Trato digestivo**

Com base nas observações feitas das alterações morfológicas do trato digestivo das ostras expostas à presença do parasita *A. ocellatum*, verificou-se que houve resposta inflamatória com hemócitos em diapedese no estômago e intestino, em seguida agravadas com severas lesões no tecido conectivo e epitelial. Essas lesões são agravadas com maiores tempos de exposição a presença do parasita, ou seja, depois das 24 h de exposição (Fig.13).

Nos tecidos da ostra controle, o intestino apresentou uma estrutura normal com o tecido epitelial e o tecido conjuntivo apresentando células bem diferenciadas (Fig. 13 A).

Após 2, 4 e 8 h de exposição, observou-se hipertrofia com pequenas alterações no tecido epitelial (Figs. 13 B, C e D).

Com 24 h de exposição, observa-se uma produção de muco pelas glândulas digestivas que é liberado para dentro do estômago e evidência de hemócitos em diapedese (Fig. 13 E).

Ao final das 48 h de exposição, verificou-se severas lesões no tecido epitelial e conectivo do intestino com fissuras nas paredes dos tecidos (Fig. 13 F). Evidência de células intactas do parasita no intestino (Fig. 14).

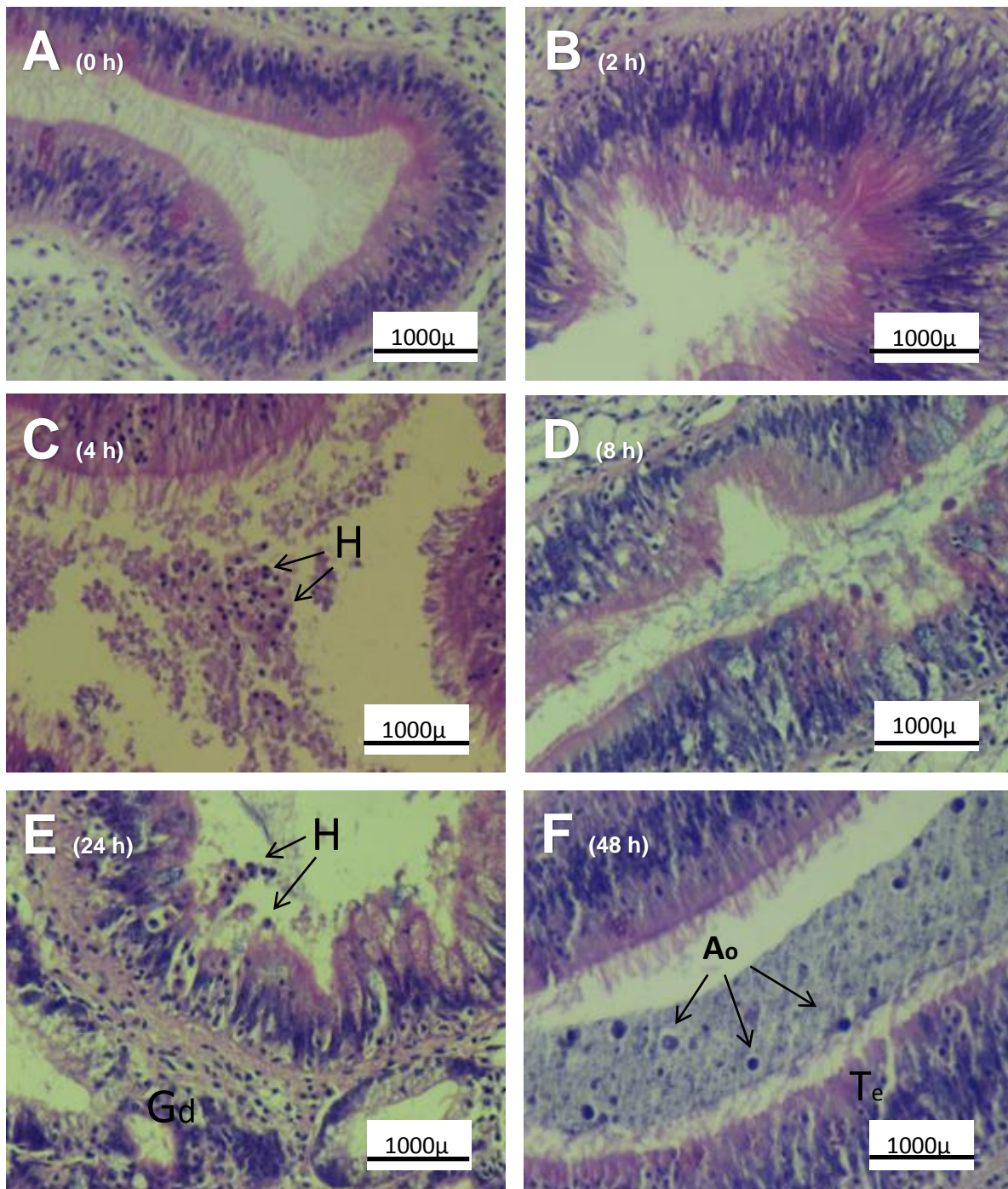


Fig. 13. Secções histológicas representativas do trato digestivo da ostra *Crassostrea gigas*. (A) Intestino de uma ostra controle, estrutura normal. (B) 2 h – Intestino com estrutura normal aparente . (C) 4 h – Hemócitos em diapedese para dentro do intestino (H) hemócitos. (D) 8 h – Células do tecido epitelial e conectivo com alterações celulares. (E) 24 h – Elevada produção de muco pelas glândulas digestivas e hemócitos em diapedese (Gd) Glândulas digestivas. (F) 48 h - Tecido epitelial e conectivo do intestino com fissuras bem acentuadas, evidencia de necrose (Ao) Células do *Amyloodinium ocellatum*, (Te) Tecido epitelial do intestino (H&E, 400x).

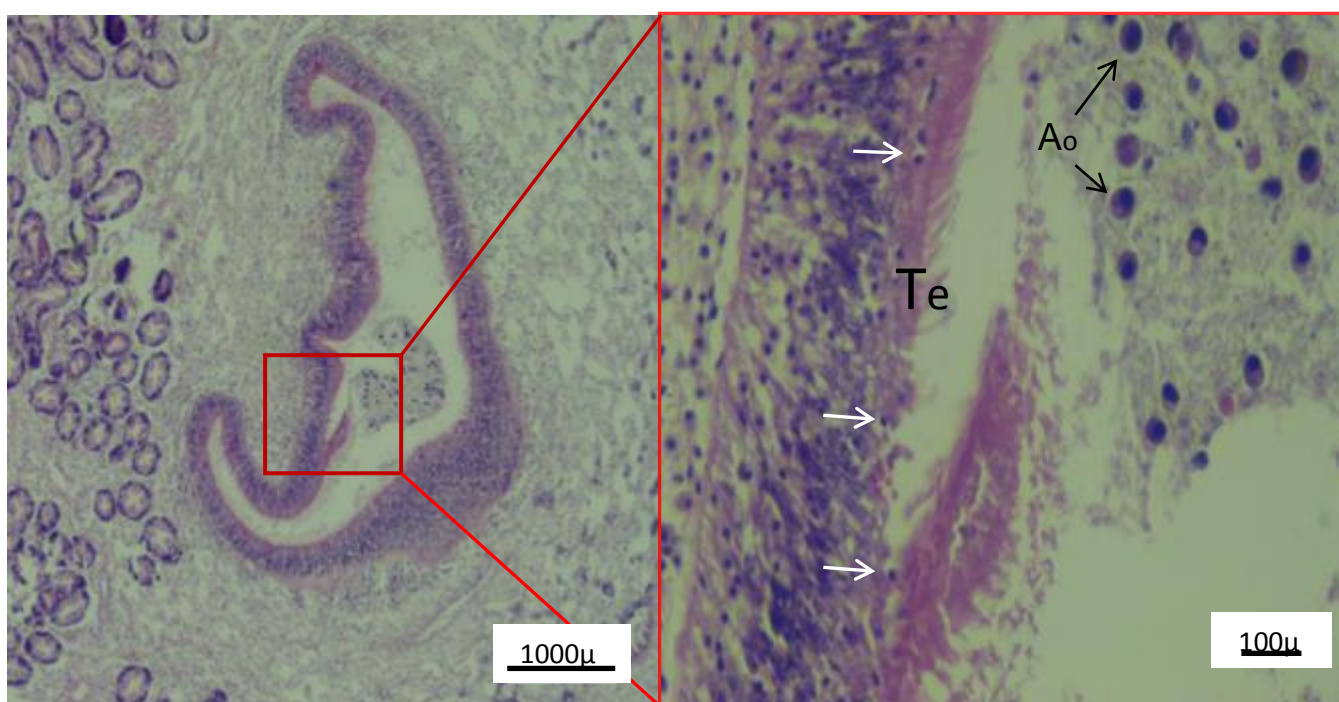


Fig. 14. Resposta inflamatória do intestino da *Crassostrea gigas* na presença do *Amyloodinium ocellatum*. Hemócitos em diapedese (Setas brancas), lesão no tecido epitelial (Te) e presença evidente do parasita no intestino (Ao). Imagem com 48 h depois do início do ensaio (H&E, 40 e 400x).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Taxa de respiração da ostra *Crassostrea gigas* a diferentes temperaturas e na presença do parasita *Amyloodinium ocellatum*

Em relação ao presente estudo, os ensaios da Taxa de respiração foram realizados em diferentes meses do ano e, conseqüentemente, as ostras utilizadas poderiam estar em diferentes condições fisiológicas podendo ter afectado e/ou influenciado na taxa de respiração.

Os moluscos bivalves são organismos poiquilotérmicos e a temperatura é um dos factores mais importantes nos processos fisiológicos (Galfsoff, 1964). No presente estudo (Fig. 7), houve, de um modo geral, um aumento da taxa de respiração das ostras com o aumento da temperatura. Apenas existiu igualdade das taxas de respiração a 21.6 °C e 25.1 °C que pode estar relacionada com os diferentes tamanhos dos indivíduos utilizados nos ensaios a essas temperaturas que apresentaram respectivamente pesos médios de 73.5 g e 20.2 g. Vários autores referem que as dimensões das ostras utilizadas nos ensaios podem contribuir para as variações da taxa de respiração (Widdows, 1976; Bougrier et al., 1995; Mao et al., 2006). Em outro estudo realizado por Mondal (2005), com a ostra *Pinctada funcata*, foi observado que a taxa de respiração dos indivíduos também aumentou com o aumento da temperatura, entre 23 °C a 31 °C, e que o tamanho dos indivíduos apresentou uma grande influência no aumento desta taxa.

No período de gametogénese, as gonadas apresentam uma maior quantidade de glicogénio acumulado e apresentam maior peso total (Galvão et al., 2000) sendo que o peso húmido aumenta. Tal facto reflete-se no Índice de Condição (IC) que corresponde à percentagem do peso húmido que decresce para o mesmo peso seco. No presente caso o IC, que é um indicador de variações sazonais de reservas de nutrientes nas ostras e está intimamente ligado a factores relacionados a gametogénese, variou directamente com o peso seco sugerindo que as ostras estavam em condições semelhantes de

maturação sexual. Tran et al. (2008) refere que *Crassostrea gigas* apresenta um aumento da taxa de respiração quando em período da gametogénese, ou seja, o consumo de oxigénio pela ostra é menor antes deste período.

No ensaio realizado para verificar a taxa de respiração da ostra na presença do parasita *A. ocellatum*, a uma temperatura de 20 °C, observou-se uma redução, embora não significativa (possivelmente dado o pequeno número de amostras), na taxa de respiração das ostras na presença do parasita, reduzindo em 40% a taxa de respiração das ostras após cerca de 1 h de exposição. Histologicamente foi possível verificar que ocorreram severas lesões nas brânquias, o que justifica a redução na eficiência da respiração. Estudos de outros autores mostraram os efeitos que este parasita tem causado nas brânquias de peixe que chegam a perder a sua função respiratória dada as severas lesões dos tecidos (Soares et al., 2011). Outras espécies de dinoflagelados com *Prorocentrum rhathymum* (Pearce et al., 2005) e *Alexandrium minutum* (Haberkorn et al., 2010; Tran et al., 2015) têm afectado as brânquias de *C. gigas* diminuindo a sua actividade respiratória, devido a libertação de toxinas no ambiente prejudicando as brânquias.

## **5.2. Taxa de filtração da ostra *Crassostrea gigas* em diferentes temperaturas e a taxa de remoção de dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* da água**

Existem vários factores endógenos e exógenos que influenciam o aumento da taxa de filtração das ostras, no entanto a temperatura é considerada o factor mais importante neste processo fisiológico dos organismos aquáticos (Aguado & García, 2002; Saucedo et al., 2004). Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a taxa de filtração da *C. gigas* aumentou entre as temperaturas 16 °C e 20 °C, tendo-se mantido constante entre os 20°C e os 24°C e diminuído aos 28 °C. Para esta temperatura, foi observado no final do ensaio, que as ostras entraram em fase de libertação dos gâmetas. Tal facto poderia ter ocasionado a diminuição na taxa de filtração a esta temperatura dado que vários autores observaram também que a taxa de filtração da *C. gigas* tinha sido afectada pelo processo da gametogénese, ou seja, que tinha ocorrido uma diminuição nos gastos energéticos utilizados pelas ostras na alimentação pois tinham sido transferidos para a reprodução (Bougrier et al.,1995). Segundo Lefebvre et al. (2000) nos estágios finais da gametogénese, ou seja, na fase de libertação dos gâmetas os gastos energéticos na alimentação são ainda mais reduzidos. No entanto as ostras que apresentaram uma maior proporção de peso húmido para peso seco (IC), e portanto que poderiam estar em processo de gametogénese, foram as utilizadas no ensaio à temperatura de 16 °C. É pois arriscado atribuir a diminuição das taxas de filtração observadas a esta temperatura apenas à baixa temperatura. O tamanho/ peso dos indivíduos parece ser também um factor importante que poderia ter influenciado na taxa de filtração deste bivalve. No presente estudo, as ostras com maiores dimensões, corresponderam aos ensaios de 16 °C e de 28 °C, apresentaram menores taxas de filtração. Num trabalho realizado por Ehrich & Harris (2015), com três tamanhos diferentes de *C. virginica*, mostraram que a taxa de filtração foi maior para as ostras que apresentaram o menor tamanho. Segundo Newell & Langdon (1996) também mostrou que quando o peso das ostras aumenta a taxa de filtração por unidade de peso diminui, seguindo uma função alométrica.

No presente ensaio de 48 horas de duração, 1 grama de ostra conseguiu remover em cada hora 0.08 dinósporos de *A. ocellatum* por ml. Como foi observado, a ostra em presença do *A. ocellatum* conseguiu remover todo esse organismo da água mesmo que este lhe venha a causar algum dano. Em outros trabalhos utilizado com outras espécies de dinoflagelados como *Alexandrium fundyense* (Persson & Smith, 2006) e *Alexandrium ostenfeldii* (Medhioub et al, 2012) também mostraram que as ostras removeram esses organismos mesmo em presença das toxinas libertadas por eles, possivelmente porque os mecanismos de filtração destas espécies não permitem fazer selectividade do alimento que se encontra em suspensão na água.

### 5.3. Histologia

#### a) Brânquias

As brânquias são o mais importante órgão de respiração e alimentação das ostras, sendo também o primeiro contacto do individuo com as células tóxicas e não tóxicas do fitoplâncton na água (Haberkorn et al., 2010). Diferentes estudos efectuados com bivalves expostos a algumas espécies de dinoflagelados mostraram que as brânquias são sensíveis às toxinas libertadas por esses organismos no ambiente aquático tornando-se o principal órgão alvo desses organismos agressores que se encontram no meio (Galimary et al., 2008; Medhioud et al., 2012).

Os resultados histológicos das brânquias da ostra observados neste estudo, mostraram que esse órgão foi gravemente afectado pela exposição à presença de *A. ocellatum*. Nas horas iniciais de exposição, foi observado um aumento na produção de muco pelas brânquias das ostras em relação ao grupo controlo. A produção de muco é uma reacção de defesa dos organismos em relação à exposição a um agente agressor, provavelmente por estar relacionado com a irritação física causada pela alta densidade do parasita, possível efeito toxico de dinoflagelados ou uma combinação destes factores (Rodger et al., 1994). Alguns trabalhos realizados anteriormente mostraram que algumas espécies de bivalves também aumentaram a produção de muco em presença de dinoflagelados tóxicos (Shumway & Cucci, 1987; Haberkorn et al., 2010).

No presente estudo, depois das 8 h de exposição a presença do parasita foram observadas grandes alterações morfológicas nas brânquias que se foram agravando ao longo do tempo de exposição (48 h). As alterações ocorridas como hiperplasia acentuada e hipertrofia epitelial, seguida de degeneração celular e início de necrose, foram evidentes. Essas alterações morfológicas ocorridas são muito prejudiciais para as brânquias e por consequência, interferem na actividade fisiológica das ostras. As

ocorrências destas alterações podem estar relacionadas com a excreção de substâncias tóxicas pelo parasita que reflectem as lesões apresentadas. No estudo de Lom & Lawler (1973) em peixes, mostrou que este parasita injecta fluidos líticos ou digestivos através do seu estomatópodio nas células parasitadas e que esses fluidos, são substâncias tóxicas excretadas e, com o aumento do tempo de exposição, levam a um aumento das células mucosas no tecido epitelial. Neste estudo não se verificou que este dinoflagelado tivesse alguma acção parasitária nas ostras. Segundo Hines & Spira (1974) é uma característica da maioria das infestações por ectoparasitas em peixes e que após um longo período de hiperplasia, ocorre a depleção das células mucosas, provavelmente pelo esgotamento do tecido gerador de células mucosas. Segundo Paperna (1980), essa depleção pode ser uma característica principal induzida pelo *A. ocellatum*.

No presente estudo, as alterações morfológicas apresentadas nas brânquias das ostras pela presença do *A. ocellatum* têm mostrado grandes efeitos deletérios. As alterações observadas foram feitas num período de 48 h de exposição e com uma concentração inicial de 839,2 dinósporos ml<sup>-1</sup> do parasita. Estudos realizados por Pearce et al. (2005) e Haberkorn et al. (2010) com bivalves em presença de dinoflagelados tóxicos, apresentaram alterações menos danosas nas brânquias dos bivalves, com um maior tempo de exposição e com maiores concentrações de dinoflagelados tóxicos quando comparados com a concentração inicial do *A. ocellatum* usado neste trabalho.

Em peixes, o *A. ocellatum* já tem causado sérios danos em algumas espécies e as lesões provocadas por este parasita nas brânquias já têm sido observadas em vários estudos (Pereira et al., 2011; Saraiva et al., 2011; Guerra-Santos et al., 2012). Foi observado que nas parasitoses intensas podem-se manifestar lesões, como hiperplasia das células do epitélio respiratório com fusão das lamelas seguidas de edema, levando a descoloração das células do epitélio respiratório, alterações degenerativas, inflamações, hiperplasia acompanhada de hemorragia, depleção das células mucosas e necrose (Paperna, 1980; Scott, 2000; Ramos & Oliveira, 2001; Pavanelli et al., 2008). Algumas características das lesões apresentadas

nas brânquias dos peixes pela presença do *A. ocellatum* também foram identificadas nas brânquias das ostras, como hiperplasia, aumento da produção das células mucosas assim como o aumento da produção de muco, hipertrofia, inflamações severas nos filamentos branquiais, alterações degenerativas das brânquias e início de necrose. Essas evidências mostram que em ambos os organismos os efeitos deletérios são semelhantes. No caso das ostras, as lesões comprometeram a capacidade respiratória, como foi observado no presente estudo reduzindo em 40% a taxa de respiração em 1 h, assim como a capacidade de filtração, uma vez que as brânquias são responsáveis por ambas as funções.

## **b) Trato digestivo**

Os resultados histológicos da ostra *C. gigas* expostas a presença do *A. ocellatum* mostraram severas lesões no tecido epitelial e conectivo do estômago e intestino. Foi observado também acentuada migração de hemócitos pelo tecido conectivo (diapedese) para dentro do estômago e intestino.

Em relação às inflamações no tecido epitelial e conectivo, estudos anteriores mostraram resultados semelhantes em algumas espécies de bivalves em exposição a presença de dinoflagelados tóxicos (Galimany et al., 2008a; Medhioub et al., 2012; Lassudrie et al, 2014). Como resposta a essas inflamações pelo sistema imunológico, foi observado massiva migração dos hemócitos para estas áreas afectadas e isto tem sido descrito como parte do mecanismo de defesa dos bivalves (Stauber, 1950). Estudos realizados por Smolowitz & Shumway (1997) e Galimany et al. (2008b), também descreveram semelhantes resultados como a infiltração e diapedese dos hemócitos, no estômago e intestino, em algumas espécies de bivalves expostos a dinoflagelados tóxicos. O resultado deste estudo e de anteriores suporta a hipótese que hemócitos migram para os órgãos do sistema digestivos para remover as células tóxicas ou para proteger os tecidos da toxicidade. Como hipótese de Galimany et al. (2008a), a migração de hemócitos por diapedese

através do epitélio do intestino pode ser considerada como uma via de desintoxicação apresentada pelos bivalves.

Ao fim das 48 h de exposição ao *A. ocellatum*, foram observadas fissuras no tecido epitelial e conectivo do estômago e do intestino das ostras. Essa observação sugere que o parasita tem um alto grau de toxicidade e que provoca sérios efeitos deletério nestes órgãos. Com isto, prejudica os processos de absorção dos tecidos e acelera assim a vulnerabilidade dos animais sob condições de *stress*. Neste tempo, foi identificado a presença de células intactas do parasita *A. ocellatum* no trato digestivo. Isso suporta a hipótese de disfunção dos órgãos no processo de digestão do parasita. Estudos apresentados por Medhioub et al. (2012) e Lassudrie et al. (2014), também observaram a presença de células intactas de dinoflagelados tóxicos no trato digestivo de *C. gigas* e *V. philippinarum*.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo confirmou as observações de estudos de outros autores e mostrou que o tamanho das ostras é um importante factor nos processos metabólicos influenciando as taxas de respiração e filtração.

Indivíduos menores apresentam maiores taxas de respiração e filtração quando comparados com indivíduos de maiores dimensões.

Os resultados do presente estudo mostraram que as taxas de respiração de *C. gigas* aumentam em função da temperatura, atingindo o valor máximo para a temperatura de 27.9 °C.

Igualmente, as taxas de filtração aumentam com a temperatura porém, a uma temperatura mais elevada (28 °C) sofrem um decréscimo que se pensa estar relacionado com a libertação de gâmetas.

Quando submetidas à presença de *A. ocellatum* (a 20 °C), as ostras apresentaram uma redução de 40% na taxa de respiração em cerca de 1 h, provavelmente devido às lesões provocadas pelo parasita nas brânquias.

Quando exposta a presença do parasita *A. ocellatum*, *C. gigas* removeu em 48 h todas as células do parasita da água a uma taxa de 0.08 cel. ml h<sup>-1</sup>.

No entanto, a análise histológica mostrou que a exposição ao parasita lesionou severamente as brânquias e o trato digestivo (estômago e intestino) de *C. gigas*, após 48 h de exposição.

No presente estudo, não foi verificado que o dinoflagelado *A. ocellatum* parasite as brânquias das ostras, tal como ocorre nos peixes.

Devido às lesões apresentadas após exposição ao parasita, não se sabe se os tecidos das ostras uma vez lesionados podem se recuperar (período de desintoxicação, ou seja, um período de recuperação dos tecidos), este aspecto deverá ser alvo de futuros estudos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P.C., Robaldo, R.B., Sampaio, L.A., Bianchini, A., Odebrecht, C., 2005. "Recurrent amyloodiniosis on Broodstock of the Brazilian Flounder *Paralichthys orbignyanus*: dinospore monitoring and prophylactic measures". *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 42-50.
- Aguado, G. F., García, G. B., 2002. "Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet." *Aquaculture International* 10, 361–377.
- Almeida, R. F. (2005) "Veludo Fatal no Azul": *Amyloodinium ocellatum*. Acedido em Out. 10, 2014, disponível em: <http://www.aquariofilia.net>
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A., Franco-Sierra, A., 1993. "Protozoan parasites of wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Mediterranean área". *Aquaculture and Fisheries Management* 24,101- 108.
- Bayne, B.L., Thompson, R.J., Widdows, J., 1976. Physiology: I. In: Bayne, B.L., (ed). *Marine mussels: their ecology and physiology*, pp. 121-206, Cambridge University Press, London.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, P. M., Bacher, C., Jonquières, G., 1995. "Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg)". *Aquaculture* 15:134-143.
- Brown, E.M., 1931. "Note on a new species of dinoflagellate from the gills and epidermis of marine fish". *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1:345-346.
- Brown, E.M., Hovasse, R., 1946. "*Amyloodinium ocellatum* (Brown,1931), a peridinin parasitic on marine fishes". A complementary study. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 116 (1), p.33-46.
- Brun, N.T., Ross, N.W., Bogen, A.D., 2000. "Changes in electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprine*." *Journal of Invertebrate Pathology*. 75, 163–170.
- Cobb, C.S., Levy, M.G., Noga. E., J., 1998. "Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response". *Diseases of Aquatic Organisms*, 34: 125-133.
- Coughlan, J., 1969. "The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions". *Marine Biology* 2, 356–358.

- Cranford, P.J., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2010. "Bivalve filter feeding: variability and limits of the aquaculture biofilter". In: S.E. Shumway (ed.), Shellfish Aquaculture and the Environment, John Wiley & Sons Publication, 81-124.
- Eiras, J.C., 1994. "Elementos de Ictioparasitologia". Porto/PT: Fundação Engenheiro Antônio de Almeida,. 139 p.
- FAO, 2014. "The State of World Fisheries and Aquaculture 2014". Rome, 1-223 pp. Disponível em: <http://www.fao.org/3/d1eaa9a1-5a71-4e42-86c0-f2111f07de16/i3720e.pdf>
- Fioravanti, M.L., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A., Marcer, F., Quaglio, F., 2006. "Parasitic diseases of marine fish: epidemiological and sanitary considerations". Parasitology 48,15–18.
- Fisher, W.S., 1992. "Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters." Journal Experimental Marine Biology and Ecology 162, 1–13.
- Francis-Floyd, R. & Floyd, M.R. 2011. "*Amyloodinium ocellatum*, an important parasite of cultured marine fish." Southern Regional aquaculture center, 4705.
- Galimany, E., Sunila, I., He´ garet, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008a. "Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery". Harmful Algae 7, 702–711.
- Galimany, E., Sunila, I., He´ garet, H., Ramón, .M., Wikfors, G.H., 2008b. "Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*". Harmful Algae 7, 630–638.
- Galimany, E., Place, A.R., Ramón, M., Jutson, M., Pipe, R.K., 2008c. "The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*". Harmful Algae 7, 91–98.
- Galtsoff P.S., 1964. "The American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)". United States Fishery Bulletin 64:1-480.
- Galvão, M.S.N., Pereira, O.M., Machado, I.C., Henriques, M.B., 2000. "Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliiana* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25° S; 48° W)." Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 147 -162.
- Gerdes, D., 1983. "The Pacific oyster *Crassostrea gigas*: II. Oxygen consumption of larvae and adults". Aquaculture 31, 221 – 231.

- Guerra-Santos, B., Albinati, R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P., Costa, D.S.P., Medeiros, S.D.C., Lira, A.D., 2012. "Parameters hematological and histopathologic alterations in cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodiniose". Brazilian Veterinary Research. 32(11):1184-1190, November, 2012.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goic, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. "Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*." Elsevier. Harmful Algae 9, 427–439.
- Hasle, G.R., 1978. "The inverted-microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanic Methodology". UNESCO, Paris, pp. 88–96.
- Hawke, J. P., 2003. "Diagnosis, treatment, and prevention of disease in mariculture". International Sustainable Marine Fish Culture, Florida, Harbor Branch Oceanographic Institution Fort Pierce.
- Hines, R. & Spira, D., 1974. "Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) III." Pathology. J. Fish Biol. 6:189-196.
- Júnior, R. B. P., 2009. "Formação e manejo de um plantel de reprodutores do Beijupirá (*Rachycentron canadum*) em Pernambuco". Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Lawler, A.R., 1980. "Studies on *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) in Mississippi sound: natural and experimental hosts". Gulf Research Reports 6(4): 403-413.
- Lassudrie, M., Soudant, P., Henry, N., Medhioub, W., da Silva, P.M., Donval, A., Bunel, M., Le Goïc, N., Lambert, C., de Montaudouin, X., Fabioux, C., Hégaret, H., 2014. "Physiological responses of Manila clams *Venerupis* (=Ruditapes) *philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure". Aquatic Toxicology 154, 27–38.
- Leverone, J.R., Shumway, S.E., Blake, N.J., 2007. "Comparative effects of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on clearance rates in juveniles of four bivalve molluscs from Florida, USA". Elsevier Toxicon 49: 634-645.
- Lom, J. & Lawler, A.R., 1973. "An ultrastructural study on the mode of attachment in dinoflagellates invading the gills of Cyprinodontidae". Journal of Protistology 9:293-309.
- Lom, J. & Dyková, I., 1992. "Protozoan parasites of fishes." Development Aquaculture Fish Science 26: 1-315.

- Lorenzen, C. J., 1967. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnology and Oceanography*, 12: 343-346.
- Levy, M.G. & Noga, E.J., 2005. "Controlling parasitic dinoflagellates of fish, with special emphasis on molecular genetics and immunity". *Acta Zoologica Sinica*, 51: 550-553.
- Kuperman, B.I. & Matey, V.E., 1999. "Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA". *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 65-73.
- Kooilman, S.A.L.M., 2000. "Dynamic energy and mass budgets in biological systems". 2nd Revision Edition Cambridge University Press.
- Mao, Y., Zhou, Y., Yang, H., Wang, R., 2005. "Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China". *Aquaculture* 253: 322-333.
- Medhioub, W., 2012. "Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*". *Aquaculture* 358- 359.
- Mehlhorn, H., 2008. "Encyclopedia of parasitology". Third edition. Springer. New York. 1573p.
- Menezes J., 1994. "Doenças em peixes cultivados no Estuário do Sado e seu controlo". Seminário sobre Recursos Haliêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado da Península de Setúbal (Setúbal, 26-27 Abril 1994) *Publicações Avulsas do IPIMAR* 1,175-186.
- Menezes J., 2000. "Manual sobre doenças de peixes ósseos". *Publicações avulsas do IPIMAR* 3, 214 pp.
- Møhlenberg, F., Riisgård, H.U., 1979. "Filtration rate, using a new indirect technique, in thirteen species of suspension- feeding bivalves". *Marine Biology* 54: 143-147.
- Moita, M.T., Palma, A.S., Vilarinho, M.G., 2005. "Blooms de fitoplâncton na costa Portuguesa". *IPIMAR*, 31: 1-4.
- Mondal, S.K., 2005. "Effect of temperature and body size on food utilization in the marine pearl oyster *Pinctada fucata* ( Bivalvia: Pteridae)". *Indian Journal of Marine Sciences*. Volume 35 (1), pp 43-49.
- Montgomery-Brock, D., Sylvester, J.Y., Tamaru, C.S., & Brock. J., 2000. "Hydrogen peroxide treatment for *Amyloodinium sp.* on mullet (*Mugil cephalus*) fry". *The Oceanic Institute and the University of Hawaii*, 11: 4-6.

- Montgomery-Brock, Brock, J., & Sato, V.I., 1998. "The Use of Hydrogen peroxide to treat for *Amyloodinium ocellatum* on moi (*Polidactylos sexfilis*)". AQUATIPS, 4-5.
- Newell, R.C., Johnson, L.G., Kofoed, L.H., 1977. "Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*". *Journal of Ecology* 30, 97– 110.
- Noga, E.J., Fan, Z., Silphaduang, U., 2002. "Host site of activity and cytological effects of histone-like proteins on the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*". *Diseases of Aquatic Organisms*, 52: 207-215.
- Noga, E.J., Fan, Z., Silphaduang, U., 2001. "Histone-like proteins from fish are lethal to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*". *Journal of Parasitology*, 123: 57-65.
- Oestmann, D.J.& Lewis, D.H., 1996b. "Effects of 3 N-methylalucaminelasalocid on *Amyloodinium ocellatum*". *Diseases of Aquatic Organisms*, 24: 179-184.
- Oestmann, D.J.& Lewis, D.H., 1995. "Clearance of *Amyloodinium ocellatum* dinospores by *Artemia salina*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7: 257-261.
- Paperna, I., 1980. "*Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology". *Journal of Fish Diseases* 3, 363-372.
- Paperna, I., 1984. "Reproduction cycle and tolerance to temperature and salinity of *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida)." *Annales Parasitologie Humaine Comparee*. 59: 7-30.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M., 2008. "Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento". 3ª Ed. Eduem, Maringá, PR. 311p.
- Pearce, I., Handlinger, J.H., Hallegraef, G.M., 2005. "Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Proocentrum rathymum*". *Elservier Harmful Algae* 4, 61-74.
- Pereira, J.C., Abrantes, I., Martins, I., Barata, J., Frias, P., Pereira, I., 2011. "Ecological and morphological features of *Amyloodinium ocellatum* occurrences in cultivated gilthead seabream *Sparus aurata* L.; A case study". *Elsevier. Aquaculture* 310, 289-297.
- Persson, A. and Smith, B., 2006. "Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)". *ScienceDirect. Harmful Algae* 5, 678–684.

- Powell, E.N., Hofmann, E.E., Klinck, J.M., Ray, S.M., 1992. "Modelling oyster populations. I. A commentary on filtration rate". Is faster always better *Journal Shellfish Research* 11(2): 367-398.
- Ramos, P., Oliveira, J.M., 2001. "Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.)." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96: 201-205.
- Ren, J.S., Ross A. H., Schiel, D.R., 2000. "Functional descriptions of feeding and energetics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand." *Marine Ecology Progress Series* 208:119–130.
- Riisgård, H.R., 1988. "Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast American bivalves". *Marine Ecology Progress Series* 45:217-223.
- Riisgård, H.R., 2001. "On measurement of filtration rates in bivalves- the stony road to reliable data: review and interpretation". *Marine Ecology Progress Series* 211:275-291.
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. "Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated with pathology in brown trout, *Salmon trutta* L., in Loch Leven, Scotland". *Journal Fish Diseases*. 17, 177–181.
- Saraiva, A., Jerónimo, D., Cruz, C., 2011. "*Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata: Dinoflagellata) in farmed turbot". *Aquaculture*.
- Scott, P., 2000. "Terapéutica em acuicultura". In: Brown L. (Ed.), *Acuicultura, para Veterinarios: producción y clínica de peces*". Acribia, Zaragoza, Espanha. P. 137-160.
- Severino, R.B.A., 2008. "Contributo para o conhecimento do ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* e seu controlo em piscicultura". Dissertação de mestrado. Universidade do Porto.
- Shaw, B.L. & Battle, H.I., 1957. "The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)". *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, 35: 325-347.
- Shumway, S.E. & Cucci, T.L., 1987. "The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs". *Aquatic Toxicology* 10, 9–27.t
- Shumway, S. E. and Koehn, R. K. (1982). "Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*." *Marine Ecology Progress Series* 9: 59-68.
- Smith, S.A., Levy, M.G., Noga. E.J., 1994. "Detection of anti-*Amyloodinium ocellatum* antibody from cultured hybrid striped bass *Morone saxatilis* times *M. chrysops* during an epizootic of amyloodiniosis". *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 79-81.

- Smolowitz, R., Shumway, S.E., 1997. "Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs". *Aquaculture International* 5, 291–300.
- Soares, F., Ferreira, H.Q., Moreira, M., Cunha, E., Ribeiro, L., Ferreira, P.,P., 2012. "First report the *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*)". *Bulletin European Association Fish Pathology* 32.
- Stauber, L.A., 1950. "The fate of India ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica* Gmelin". *The Biological Bulletin* 98, 227–241.
- Strickland, J.D., Parson, T.R., 1972. "A Practical Handbook of Seawater Analysis". 2nd ed. vol. 167. *Bulletin of the Fish Research Board of Canada*, Ottawa, Canada. 310 pp.
- Tran, D., Massabuau, J.C., Vercelli, C., 2008. "Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France)." *Aquaculture* 277 (2008) 58–65.
- Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J.C., Hegaret, H., Lambert, C., Goic, N.L., Soudant, P., 2015. "The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*." *Aquatic Toxicology* 158 (2015) 41–49.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, J. L., 2005. "A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems". *Aquaculture*, 246: 37-61.
- Widdows, J., 1976. "Physiological adaptation of *Mytilus edulis* to cyclic temperature." *Journal of Comparative Physiology* 105, 115 – 128.
- Winter, E.J., 1973. "The filtration of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration measured by a continuous automatic recording apparatus". *Marine Biology* 22, 317– 328.
- Zambrano, J.L.F., Dezón, D.E., González, C.R., Fermín, E.G., 2001. "Ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata: Oodinidae)". *Boletín Oceanográfico*, 83-89.