

# Reprodução e cultura de ostra plana (*Ostrea edulis*) em Portugal

Marco António Alves Amaral

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

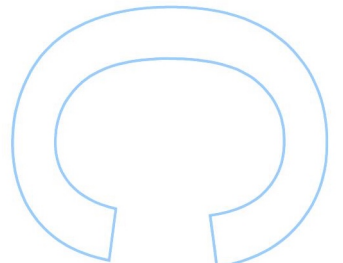
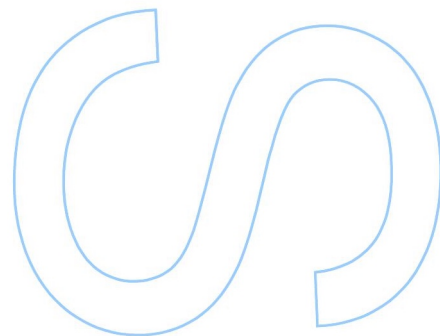
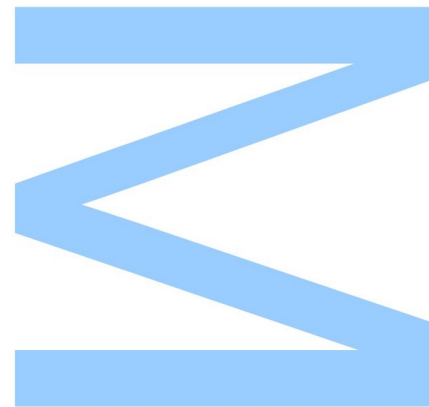
2018

## Orientador

Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Prof<sup>ª</sup> Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Investigadora de pós-doutoramento do Centro Interdisciplinar Marinha e Ambiental (CIIMAR)

## Coorientador

António Carreira de Jesus Correia, Gestor de Projetos e Diretor de Produção na empresa *Marvellous Wave*

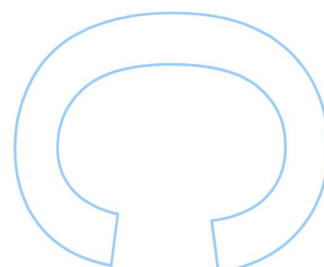
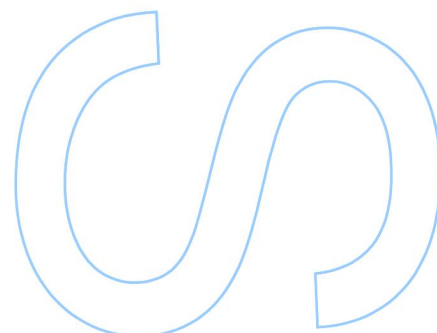
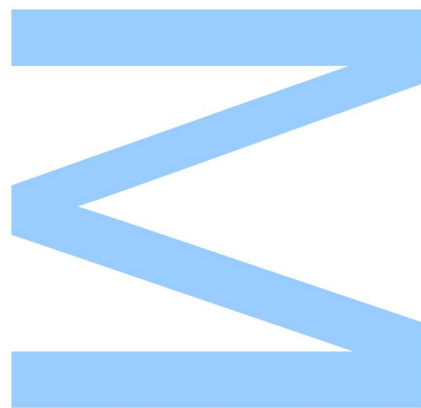




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



Dissertação submetida a Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, para a obtenção do grau de Mestre em Recursos Biológicos Aquáticos, da responsabilidade do Departamento de Biologia.

A presente tese desenvolvida em formato de estágio curricular em contexto empresarial teve a orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da FCUP e Investigadora de Pós-doutoramento do CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental); e do Dr. António Correia, Mestre em Aquacultura, responsável pela supervisão técnica e científica na empresa onde se desenvolveu o estágio - Marvellous Wave.

## **Agradecimentos**

Eu gostava de agradecer a todos os que, de várias formas, fizeram com que este estágio fosse possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer de fazer um agradecimento especial à Professora Doutora Sara Antunes, que me orientou neste estágio. Obrigado por toda a ajuda prestada durante este ano de estágio e também por todo o conhecimento que me passou ao longo de todo o meu percurso académico.

Quero também agradecer ao António Correia e ao Guilherme Rua da empresa Marvellous Wave pela oportunidade de realizar este estágio curricular nas suas instalações e por toda a ajuda que me prestaram durante o estágio. Não poderia também deixar de agradecer a todos os outros colaboradores da Marvellous Wave, à Dona Fátima, ao Senhor Lúcio e ao Senhor Zé. Obrigado por toda a partilha de conhecimento, por toda a ajuda que me prestaram, pela companhia e também por terem tornado esta experiência muito rica.

Queria também agradecer a todos os meus amigos, especialmente ao João Faria, ao Raúl Oliveira, ao Fábio Leite, à Fernanda Bernardo, Ricardo Sousa, à Mafalda Mourão, à Rita Fortuna, à Rita Santos, ao Pedro Rodrigues, à Sara Oliveira, à Susana Barros, e ao Pedro Cunha por terem estado sempre comigo ao longo destes sete anos. Obrigado a todos por todas as experiências vividas, obrigado por toda a ajuda e por terem sempre acreditado em mim, sem dúvida que tornaram esta caminhada muito mais fácil.

Obrigado a todos os meus familiares por todo o apoio e palavras de incentivo.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, Adelina Alves e Joaquim Amaral, obrigado por nunca terem desistido de mim mesmo nas situações mais difíceis e por todo o apoio que me deram. Obrigado por serem os melhores pais do mundo, sem vocês nada disto teria sido possível.

Por fim queria agradecer à minha namorada Regina Monteiro, por toda a paciência para me aturar nas alturas mais difíceis e por estares sempre ao meu lado. Obrigado pelas palavras de incentivo e por sempre acreditares em mim. O teu apoio foi sem dúvida imprescindível para a realização deste estágio.

## **Resumo**

Este estágio curricular em âmbito empresarial, foi realizado nas instalações da empresa Marvelous Wave. Este relatório é baseado na participação prática do acompanhamento na reprodução e produção da ostra plana em Portugal, efetuado ao longo dos 7,5 meses de estágio. O presente relatório compila informação acerca da reprodução, alimentação, métodos e técnicas de produção e fatores que podem influenciar a produção de ostra plana em aquacultura. O objetivo deste estágio passou por expandir os conhecimentos acerca da reprodução e produção desta espécie em produção extensiva.

Inicialmente, na Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira do IPMA, foram desempenhadas funções relativas à reprodução, manutenção dos sistemas de reprodução e alimentação das ostras e larvas de ostra plana. Simultaneamente foram também desempenhadas funções de manutenção dos sistemas de pré-engorda e triagem de juvenis de ostra na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPMA.

De modo a criar competências na terceira fase de produção, a engorda, parte do estágio foi realizado nas instalações da empresa em Setúbal, onde se efetua a engorda das ostras. Neste período houve ainda a oportunidade de efetuar a manutenção dos sistemas de produção, triagens e outras atividades relacionadas com a produção de ostra plana.

**Palavras-chave:** Ostra plana; Reprodução; Maternidade; Produção; Engorda; Pré-engorda; Larvas; Semente; Alimentação; Fatores abióticos e bióticos; Produção extensiva

## **Abstract**

The internship was carried out at the company Marvellous Wave. This report is based on the participation of the accompaniment in the reproduction and production of the flat oyster in Portugal, carried out during the 7,5 months of internship. This report compiles information about breeding, feeding, production methods and techniques, and factors that may influence the production of flat oyster in aquaculture. The objective of this internship was to expand the knowledge about the reproduction and production of this species in extensive production.

Initially, at the IPMA's Experimental Station of Molusciculture in Tavira, functions were performed regarding reproduction, maintenance of breeding and feeding systems of oysters and larvae of the flat oyster. At the same time, maintenance functions of the pre-fattening systems and triage systems of oyster juveniles were carried out at the IPMA Pilot Fisheries Station of Olhão.

In order to create competencies in the stage of production, the fattening, part of the internship was carried out at the company's installations in Setúbal. Where oysters are fattened. During this period there was also the opportunity to maintain the producing systems, triage and other activities related to the production of flat oysters.

**Keywords:** flat oyster; reproduction; maternity; production; fattening, pre-fattening; larvae; Spat; feeding; biotic and abiotic factors ; extensive production

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice</b> .....	<b>7</b>
<b>Índice de Figuras e Tabelas</b> .....	<b>9</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>10</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Caracterização da Ostra Plana</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. Taxonomia, descrição e morfologia da ostra plana (Ostrea edulis)</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. Distribuição e Habitat</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3. Biologia Reprodutiva e Ciclo de Vida</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4. Crescimento</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Alimentação</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Alimentação dos Reprodutores</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Alimentação de larvas e juvenis</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3. Cultura de microalgas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4. As espécies de microalgas utilizadas</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Influência de fatores Abióticos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1. Temperatura</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. Salinidade</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3. Profundidade</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. Acondicionamento de Reprodutores</b> .....	<b>29</b>
<b>4. Influência de Fatores bióticos</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1. Agentes Patogénicos</b> .....	<b>31</b>

4.1.1. <i>Bonamiose</i> .....	31
4.1.2. <i>Marteiliose</i> .....	32
4.1.3. <i>Outros patogénicos</i> .....	33
4.2. <i>Predadores</i> .....	33
4.3. <i>Competidores</i> .....	34
4.4. <i>Genética</i> .....	34
<b>5. Tipos de Sistemas e técnicas utilizados na produção da ostra plana ..</b>	<b>36</b>
5.1. <i>Reprodutores</i> .....	36
5.2. <i>Larvários</i> .....	38
5.3. <i>Micro-nursery</i> .....	40
5.4. <i>Pré-engorda</i> .....	41
5.5. <i>Engorda</i> .....	42
<b>6. Análise das competências adquiridas .....</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>44</b>

## Índice de Figuras e Tabelas

### Figuras

<b>Figura 1:</b> Anatomia de <i>Ostrea edulis</i> ; U – Umbo; GO – Gónada; EC – Câmara exalante; IC – Câmara exalante; AM – Musculo Adutor; G – Brânquias; M – Manto. (Adaptado de FAO 2004).....	15
<b>Figura 2:</b> Representação do ciclo de vida da ostra plana, <i>adaptado de</i> (FAO 2004).....	17
<b>Figura 3:</b> Curva de crescimento de tamanho à idade para ostra plana, ajustada com a equação de von Bertalanffy. Fonte: Tully & Clarke (2012). .....	18
<b>Figura 4:</b> Fotografia de larvas de ostra plana ao microscópio ótico e exemplo de linha de medição (linha a amarelo). As larvas são medidas sempre no seu plano transversal. Ampliação 150 x.....	19
<b>Figura 5:</b> Balões (2 L) e garrações (5 L) com as culturas-stock de microalgas na sala de cultivo de microalgas. ....	22
<b>Figura 6:</b> Mangas plásticas com as diferentes culturas-stock de microalgas na sala de cultivo de microalgas. ....	23
<b>Figura 7:</b> Ranking de dietas de algas de acordo com o crescimento obtido em juvenis de <i>Ostrea edulis</i> . <i>Adaptado de</i> Enright et al. (1986).....	26
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do sistema utilizados para manter reprodutores. ....	37
<b>Figura 9:</b> Sistema utilizado para efetuar a recolha das larvas, instalado na saída de água do tanque de reprodutores.....	38
<b>Figura 10:</b> Tanques utilizados para manter as larvas. ....	39
<b>Figura 11:</b> Tanques utilizados para manter as ostras recém fixadas e fixação das larvas.....	41
<b>Figura 12:</b> Tanques da estação piloto de piscicultura de Olhão. Fonte: (IPIMAR Estação Piloto de Piscicultura de Olhão 2011). ....	41
<b>Figura 13:</b> Tanques de engorda de ostras em Setúbal. É possível visualizar as placas que fazem com que os sacos com ostras não afundem. ....	42

### Tabelas

<b>Tabela I:</b> Taxonomia da ostra plana - <i>Ostrea edulis</i> , L, 1758. ....	14
<b>Tabela II:</b> Proporção de cada espécie utilizada nas misturas de algas para alimentar Larvas, Juvenis e Reprodutores. ....	24
<b>Tabela III:</b> Composição de ácidos gordos em percentagem do total de ácidos gordos, para as diferentes espécies de microalgas cultivadas no estágio. ....	25
<b>Tabela IV:</b> Composição de aminoácidos (para 10 <sup>6</sup> células)(Media ± DP, N=4) para diferentes espécies de microalgas. Adaptado de Enright et al. (1986). ....	26
<b>Tabela V:</b> Patologias de ostra plana, respetivos agentes patogénicos e síndromes a elas associadas. Adaptado de FAO (2004).....	31

## **Lista de Abreviaturas**

FAO – Food and Agriculture Organization

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

EEMT – Estação de Experimental de Moluscicultura de Tavira

EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EPA – Ácido eicosapentaenoico

DHA – Ácido docosahexaenoico

UV – Ultravioleta

## **Introdução**

Ao longo das últimas décadas, o esforço que tem recaído sobre os recursos pesqueiros é cada vez maior, dada a necessidade de consumo de pescado pelo homem, não só devido ao aumento da população mundial, mas também devido ao aumento do consumo de pescado per capita. Segundo o último relatório da FAO, acerca do estado das pescas e aquacultura mundiais (FAO 2016), o consumo mundial per capita de peixe tem vindo a aumentar nas últimas décadas, de 9,9 Kg em 1960 para 14,4 Kg em 1990, atingindo os 20,1 Kg de peixe consumidos por pessoa em 2014. Como o crescimento dos recursos pesqueiros está praticamente estagnado desde a década de 80 (FAO 2016), a aquacultura tem sido responsável pelo enorme crescimento de fornecimento de pescado para consumo humano. É estimado que neste momento a aquacultura fornece metade da totalidade do pescado consumido pelo homem (FAO 2016). Em 2013, o pescado representou 17% da proteína animal consumida pelo homem, e 6,7% de toda a proteína consumida. Este facto deve-se em parte a certas características que o pescado apresenta, como a presença de proteínas de alta qualidade, de aminoácidos essenciais, assim como por ser uma fonte de gorduras essenciais (ómega-3 de cadeia longa), vitaminas (D, A e B) e minerais (cálcio, iodo, zinco, ferro e selénio) (Kris-Etherton et al. 2002; Sidhu 2003; FAO 2016).

O mercado mundial de aquacultura tem crescido substancialmente, nomeadamente o de moluscos, que gerou uma receita de 19 mil milhões de dólares americanos, em 2014, tendo sido produzidas cerca de 16,1 milhões de toneladas destes organismos em aquacultura. Os países que mais contribuíram para que a produção mundial atingisse estes valores foram a China (12 milhões de toneladas), o Japão (377 000 toneladas), e a República da Coreia (347 000 toneladas). A Europa contribuiu apenas com 631 789 toneladas, em 2014, tendo como maiores produtores a Espanha (223 000 toneladas), França (155 000 toneladas) e a Itália (110 000 toneladas) (FAO 2016). Quanto aos principais consumidores de moluscos na Europa, a França é líder com 7,6 Kg/per capita/por ano, seguida a Espanha com 6,2 Kg/per capita/por ano e por fim a Bélgica com um consumo de 4,3 Kg/per capita/por ano, em que estes valores representam o consumo em média entre os anos 2001 e 2010. Portugal apesar de ser dos países que mais pescado consome per capita por ano, com uma média 55,8 Kg de pescado por pessoa entre 2001 e 2010, dos quais apenas 6% foram de moluscos, ou seja, cerca de 3,6 Kg/per capita/por ano (Narita & Rehdanz 2017).

As capturas de moluscos em Portugal no ano de 2016, atingiram 19 368 toneladas, sendo que 73 toneladas (equivalente a 51 000€) correspondem a capturas de ostras (INE 2018). Em Portugal, a produção em aquacultura de moluscos gerou uma

receita de 75,2 milhões de euros, tendo sido produzidas 11 259 toneladas. A produção de moluscos e crustáceos representou 56,4% do total produzido em aquacultura em Portugal, no ano de 2016, sendo o grupo que inclui espécies de ameijoas com uma produção de 3 716 toneladas o grupo mais relevante, seguida do mexilhão com 1 474 toneladas produzidas e por fim a ostra com uma produção de 1 014 toneladas. No entanto, a produção destas últimas apresentou uma queda de 2% em relação ao ano transato (2015) (INE 2018). A ostra japonesa foi a espécie de ostra mais produzida em aquacultura em Portugal em 2016, tendo sido produzidas 633 toneladas. De ostra portuguesa apenas foram produzidas 241 toneladas e 140 toneladas de outras espécies de ostras (INE 2018).

Desde a segunda metade do século passado, a abundância de stocks de ostra plana têm reduzido drasticamente devido à sobre-exploração. Os bancos naturais de ostras formam um biótopo, com muitas espécies associadas, a perda deste habitat resultou num grande declínio na riqueza de espécies no ambiente costeiro (Laing et al. 2006). O desenvolvimento das técnicas de incubação de ostra plana têm sido realizadas desde as décadas de 1960 e 1970 (Walne & Spencer 1974). Estudos têm demonstrado que a reprodução de ostras em cativeiro pode ser realizada com taxas de sobrevivência relativamente altas (Laing et al. 2006). Ultrapassando todos os obstáculos relacionados com a biologia da espécie, aspetos técnicos, legislação e observando atentamente todo o trabalho que já foi desenvolvido, a aquacultura poderá ser assim uma grande valência na recuperação de *stocks* naturais. A restauração de bancos naturais de ostras é um compromisso a longo prazo e, possivelmente o maior obstáculo será encontrar o financiamento multidisciplinar adequado para este desenvolvimento (Laing et al. 2006).

O estágio curricular, que teve uma duração de cerca de sete meses e meio, foi realizado nas instalações da empresa Marvellous Wave, sob a orientação e supervisão do António Correia. Esta empresa dedica-se à produção de ostra plana em todas as suas fases, começando pela reprodução para obtenção de juvenis em maternidade, pré-engorda e terminando na engorda até que as ostras atinjam tamanho comercial. O principal objetivo do estágio foi executar as diferentes tarefas necessárias à reprodução e cultura de *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758), vulgarmente conhecida como ostra plana ou ostra europeia. Durante o estágio, foram executadas tarefas específicas nas três fases de produção, descritas ao longo do presente relatório: i) primeiro na maternidade, localizada na Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira (EEMT) do Instituto Português do Mar Atmosfera (IPMA) (coordenadas: 37°07'17.5"N; 7°37'11.9"W); ii) em simultâneo com a pré-engorda, realizada na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPMA (coordenadas: 37°01'59.9"N; 7° 49'12.9"W); e iii) fase de engorda, localizada na

estação de Setúbal, na reserva natural do estuário do Sado, na península da Mitrena (coordenadas: 38°30'28.2"N; 8°48'41.0"W).

# 1. Caracterização da Ostra Plana

## 1.1. Taxonomia, descrição e morfologia da ostra plana (*Ostrea edulis*)

A ostra plana é uma espécie de molusco bivalve (tabela I) muito utilizada em aquacultura na Europa, podendo ocorrer em águas pouco profundas, sobre rochas, pedras e em viveiros quando em produção extensiva.

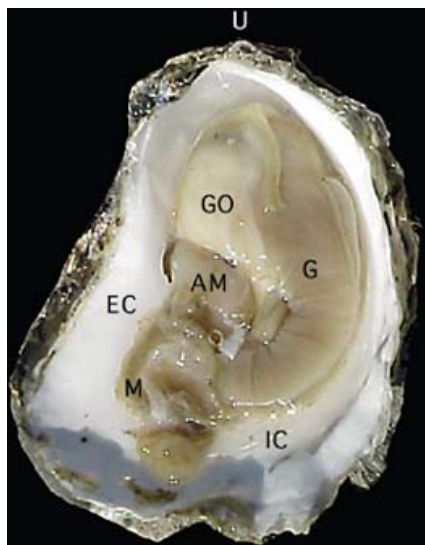
Tabela I: Taxonomia da ostra plana - *Ostrea edulis*, L, 1758.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Mollusca
<b>Classe</b>	Bivalvia
<b>Subclasse</b>	Pteriomorpha
<b>Ordem</b>	Ostreida
<b>Família</b>	Ostreidae
<b>Género</b>	<i>Ostrea</i>
<b>Espécie</b>	<i>Ostrea edulis</i>

A ostra plana possuiu uma concha, que pode ir até 20 cm de comprimento, de forma arredondada e muito variável, com um bico fisgado distinto e com foliação delicada (Fig. 1). As duas valvas não apresentam semelhanças entre si. A valva inferior é côncava, proeminente, ornamentada e frequentemente encontra-se fixada a rochas, pedras e outros substratos fixos. A valva superior é plana, também ornamentada, e a margem é frequentemente crenulada, a charneira é desprovida de dentes, possui ligamento interno e impressão única no músculo adutor e o perióstraco muito fino. Geralmente estes organismos apresentam uma cor cinzento-acastanhada (FAO 2004; Campbell & Nicholls 2008). As superfícies internas das duas valvas são lisas e geralmente peroladas, de cor branca ou cinza azuladas, e muitas vezes com manchas azuis, mais escuras. O principal constituinte da concha é carbonato de cálcio organizado em calcite com frações de aragonite, no entanto, contém também alguns minerais e matéria orgânica em pequenas quantidades. A concha pode conter câmaras laminares ocas (Galtsoff 1964; Medaković et al. 1997).

O corpo da ostra plana, parte mole do organismo, é constituído pelas gónadas, brânquias, músculo adutor e massa visceral (sistemas digestivo, circulatório, nervoso e excretor) (Fig. 1). As parte moles dos organismos são cobertas pelo manto, que é composto por duas bainhas finas de tecido, espessas nas bordas, que possuem pequenos tentáculos (Helm & Bourne 2004). Nos bivalves, as brânquias desempenham

um papel importante não só na respiração, mas também na alimentação, visto que são responsáveis pela captura e filtração do alimento. O facto das brânquias apresentarem uma grande área de superfície e uma grande quantidade de hemolinfa tornam-nas órgãos chave nas trocas gasosas (Gosling 2007). O manto, além de possuir funções sensoriais tem também a função de controlar o fluxo de água na cavidade do manto. Os materiais calcários e orgânicos para a formação da concha são depositados num espaço diminuto, que contém o fluido palial que separa o manto da concha (Gosling 2007).



**Figura 1:** Anatomia de *Ostrea edulis*; U – Umbo; GO – Gónada; EC – Câmara exalante; IC – Câmara exalante; AM – Musculo Adutor; G – Brânquias; M – Manto. (Adaptado de FAO 2004).

## **1.2. Distribuição e Habitat**

A distribuição de ostra plana ocorre por toda a costa ocidental da Europa, desde a Noruega até Marrocos, e em toda a bacia mediterrânica. Atualmente são também observadas populações selvagens na costa leste da América do Norte, depois de terem sido intencionalmente introduzidas nas décadas de 1940 e 1950 (Carriker & Gaffney 1996; FAO 2004). A ostra plana está na lista de espécies classificadas como ameaçadas e em declínio desde 2003 pela convenção da proteção do ambiente marinho. Populações naturais podem ainda ser encontradas no Ártico, na zona do grande mar do Norte, no mar Céltico, no golfo da Biscaya e na costa ibérica. No entanto, as populações mais ameaçadas são as que se encontram no grande mar do Norte (OSPAR Commission 2003).

Ostra plana tem como habitat preferencial a zona costeira no intertidal inferior e infralitoral, até cerca de 80 metros de profundidade e onde exista um substrato adequado, observando-se frequentemente fixa a rochas e pedras (Campbell & Nicholls

2008). Esta espécie tolera uma vasta amplitude de temperatura, desde  $-1,5^{\circ}\text{C}$  até a  $35^{\circ}\text{C}$  (Reise 1998; Piano et al. 2002). No entanto, preferem temperaturas mais amenas para se reproduzirem, podendo estas ser diferentes consoante o ambiente onde os organismos se encontram. Por exemplo,  $12^{\circ}\text{C}$  a  $13^{\circ}\text{C}$  são temperaturas suficientes para as ostras em Espanha desovarem, enquanto que na Noruega a temperatura ideal para que ocorra a desova tem de atingir os  $25^{\circ}\text{C}$  (FAO 2004). Em termos de outras condições abióticas, ostra plana sobrevive a salinidades que oscilam entre 18-40 PSU, no entanto a salinidade ótima para o desenvolvimento de *O. edulis* ocorre entre 24-34 PSU (Reise 1998; Laing 2005).

### **1.3. Biologia Reprodutiva e Ciclo de Vida**

A biologia reprodutiva de *O. edulis* é relativamente incomum sendo que é uma espécie larvípara, portanto liberta larvas, e protândrica em que amadurece primeiro como macho, mas depois ocorrem mudanças de sexo ritmadas e alternadas entre macho e fêmea (Orton 1927, 1933; Cole 1942). A gametogénese de ambos os sexos proveniente de apenas um folículo é um fenómeno relativamente comum nesta espécie de ostra, e é resultante da mudança de sexo (Galtsoff 1964; Pascual et al. 1989). Este facto faz com que averiguar a fase sexual reprodutiva das ostras planas não seja tarefa fácil, visto que podem, também estar em fases transacionais de sexo, sendo estas hermafroditas nesses momentos (Loosanoff 1962). Para avaliar a condição sexual das ostras num momento específico, podem ser consideradas até seis categorias: indiferenciadas, masculinas, femininas, predominantemente masculinas, predominantemente femininas e por fim ostras em que ambos os sexos estão representados de igual forma (Mann 1979; Ghazala & Muzammil 2002). Na ostra plana, quando a maturidade sexual é alcançada, os indivíduos podem desovar como machos e como fêmeas durante o mesmo período reprodutivo (Orton 1927; Orton 1933). Pela corrente exalante são libertados os espermatozoides maduros, e os ovócitos maduros são transportados da câmara exalante para a câmara inalante. Nesta fase serão aí mantidos, eventualmente fertilizados, e os embriões e larvas resultantes são incubados por 7 a 10 dias antes de serem libertados (Silva et al. 2009). Depois da incubação, as larvas já desenvolveram uma concha completamente formada, sistema digestivo, cílios nadadores e um órgão chamado de velum que utilizam para se alimentarem de fitoplâncton (Laing 2005). Numa ocorrência reprodutiva, são libertadas cerca de 500 mil a 1,8 milhões de larvas, designadas larvas velígeras, que se vão alimentar, nadando pela coluna de água, e acumular reservas nutritivas durante cerca de 10 a 12 dias. Após esse período de

tempo, as larvas passam a designar-se de pedivelígeras, e já é possível observar um pé que vai auxiliar na procura de substrato para se fixarem e depois sofrerem metamorfose (Cole 1941; FAO 2004; Helm & Bourne 2004). Após esta mudança morfológica, que dita o fim da fase pelágica larvar para o início da fase bentónica, são obtidos os juvenis de ostra, comumente designados de semente (Gosling 2007). Os juvenis nesta fase limitam-se a alimentar-se e crescer, até atingir o tamanho comercial na fase adulta, isto acontece quando as ostras têm cerca de 11 a 12 meses. Dependendo do local onde as ostras se encontram e das condições ambientais a que estão sujeitas, e quando atingem a maturação sexual as ostras podem reproduzir-se, fechando assim o ciclo de vida da ostra plana (Fig. 2) (FAO 2004; Laing 2005).

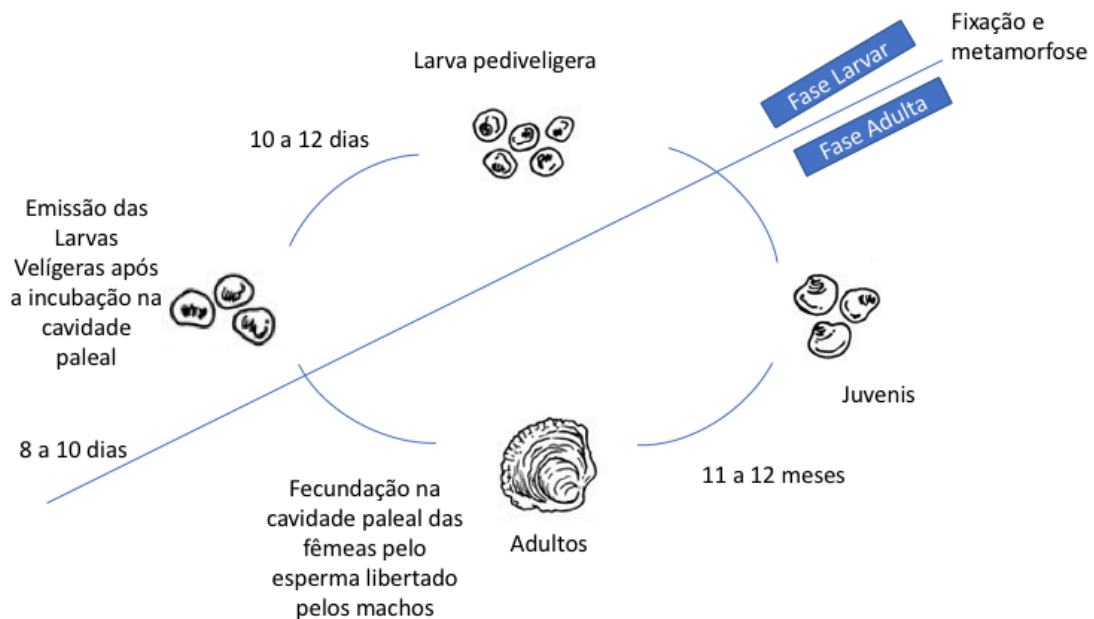


Figura 2: Representação do ciclo de vida da ostra plana, adaptado de (FAO 2004).

#### 1.4. Crescimento

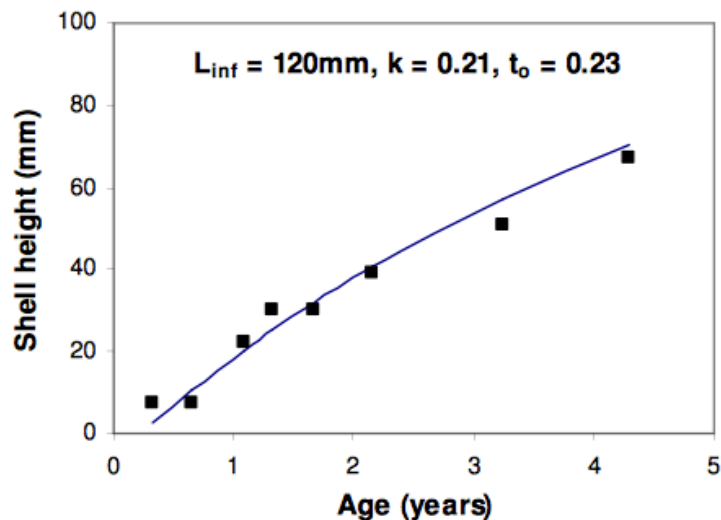
São inúmeros os fatores que influenciam o crescimento dos bivalves, sendo a disponibilidade de alimento considerado o mais importante, pois sem ele é impossível um bom crescimento (Seed & Suchanek 1992). No entanto, vários fatores podem ainda influenciar a disponibilidade de alimento, como a temperatura, área de exposição, profundidade e densidade populacional. Todas estas variáveis dificultam ainda mais quando se tenta quantificar com precisão a influência de um único fator ambiental no crescimento de bivalves (Gosling 2007).

Existem vários métodos para medir o crescimento em bivalves, sendo alguns mais utilizados para populações naturais como a distribuição da frequência de tamanhos, com a vantagem de medir o crescimento de populações em condições

naturais não perturbadas. O método dos anéis de crescimento anuais, apesar de ser bastante utilizado noutros bivalves como vieiras e ameijoas, não é muito indicado para ostras dado que os anéis são inexistentes ou muito difíceis de distinguir. Existem ainda outros métodos como, a realização de marcas nas conchas para fazer o registo e observação do crescimento, o crescimento alométrico e as curvas de crescimento. As curvas de crescimento (Fig. 3), muito utilizadas para acompanhar o crescimento em aquacultura permitem verificar as mudanças de tamanho médio ou de peso médio dos indivíduos em relação à idade (Gosling 2007). Existem várias equações para ajustar as curvas aos dados relativos ao crescimento, no entanto, segundo Gosling (2007), a melhor equação que descreve o crescimento de bivalves e peixes é a equação de crescimento de von Bertalanffy (1938):

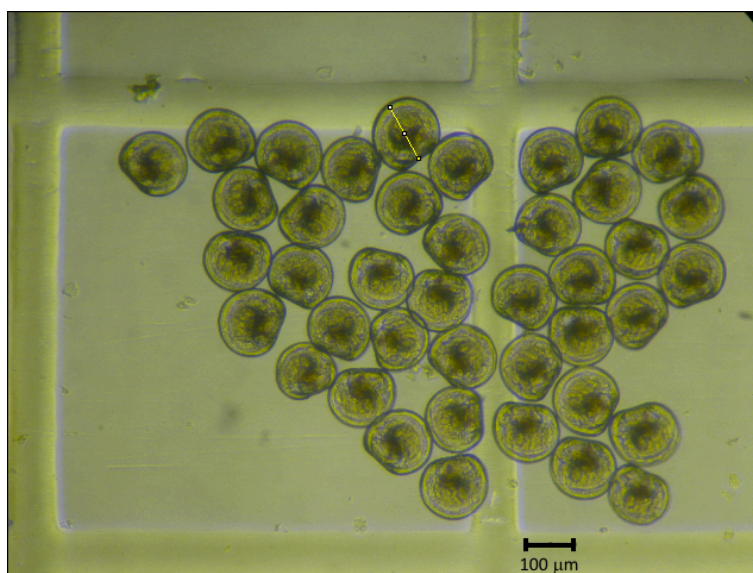
$$l_t = L_{\infty}(1 - \exp[-k(t - t_0)])$$

onde  $l$  é o comprimento na idade  $t$ ,  $L_{\infty}$  é o tamanho máximo atingido sob condições ambientais específicas e  $K$  é uma constante de crescimento baseada no tamanho máximo que o animal pode atingir  $L_{\infty}$ .



**Figura 3:** Curva de crescimento de tamanho à idade para ostra plana, ajustada com a equação de von Bertalanffy. Fonte: Tully & Clarke (2012).

Para acompanhar o crescimento na fase de pré-engorda e engorda, os indivíduos são periodicamente pesados numa balança e os dados do peso registados. Para efetuar medições das larvas, de forma a poder avaliar o crescimento nas diferentes fases larvares, é preciso primeiro tirar uma fotografia no microscópio ótico de uma amostra das larvas (Fig. 4). De seguida, e recorrendo a um software informático, podem ser efetuadas as medições das larvas.



**Figura 4:** Fotografia de larvas de ostra plana ao microscópio ótico e exemplo de linha de medição (linha a amarelo). As larvas são medidas sempre no seu plano transversal. Ampliação 150 x.

## 2. Alimentação

A grande maioria dos bivalves possuiu brânquias desenvolvidas devido a utilizarem as mesmas para a obtenção do seu alimento, no entanto esta função é secundária. A forma como estes animais se alimentam é designada de suspensão ou alimentação por filtração, utilizam as brânquias e os seus cílios para remover as partículas suspensas da água bombeada através da cavidade do manto (Gosling 2007). O volume de água que flui através das brânquias por unidade de tempo define a taxa de filtração e são vários os fatores que a afetam, a concentração de partículas, a temperatura e salinidade são alguns dos principais fatores (Gosling 2007).

### 2.1. Alimentação dos Reprodutores

As melhores formas, que estão descritas, para avaliar a qualidade de larvas recém libertadas é avaliar o seu crescimento e a sua viabilidade após serem libertadas (Helm et al. 1973). Por outro lado, o teor em lípidos que as larvas contêm no momento em que são libertadas pelos reprodutores é também indicador muito utilizado. Em experiência

laboratorial, Helm et al. (1991) verificou que larvas com alto teor lipídico no momento em que são libertadas pelos reprodutores crescem mais rapidamente e fornecem mais semente (mais juvenis), do que as que contêm menor teor lipídico na mesma fase inicial. Esse teor de ácidos gordos parece estar relacionado com o teor de ácidos gordos do fitoplâncton que é fornecido como alimento aos reprodutores (Helm et al. 1991). Por isto, a escolha das espécies de microalgas utilizadas como alimento em aquacultura é importante, uma vez que o seu valor nutricional, digestibilidade e tamanho influenciam o desempenho reprodutor dos consumidores primários.

O processo de reprodução e acondicionamento de reprodutores requer uma ajustada quantidade de ácidos gordos essenciais, e principalmente deve-se ter em conta as quantidades fornecidas de omega-3 ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (Caers et al. 2002; Pazos et al. 2003; Ricardo et al. 2011; Martínez-Pita et al. 2016). A manutenção e cultura de reprodutores deve ser realizado com uma dieta composta por espécies de microalgas flageladas e espécies de diatomáceas, uma vez que as diatomáceas têm elevado conteúdo de EPA e as microalgas flageladas possuem um elevado conteúdo de DHA (Brown et al. 1997).

Para a maioria dos reprodutores, das diferentes espécies de bivalves mantidas entre os 20-22°C, é bastante razoável uma alimentação de 6% do peso seco do seu corpo, excluindo a concha, em peso seco de alga por dia (Utting & Millican 1997). Em conclusão do seu estudo Maneiro et al. (2017) propôs um protocolo para cultura de reprodutores de ostra plana, no qual se faz uma alimentação de 6% com as espécies de microalgas *Isochrysis galbana*, e clone T-iso, *Tetraselmis suecica*, *Monochrysis lutheri*, *Skeletonema* spp., *Paeodactylum* e *Chaetoceros* spp..

## **2.2 Alimentação de larvas e juvenis**

O desenvolvimento das larvas, assim como a metamorfose, está bastante associado com o regime de alimentação (Robert et al. 2017). A importância de uma boa alimentação dos reprodutores para o sucesso das larvas é devido ao facto de que as larvas não dependem apenas de uma fonte exógena de alimento para sobreviver, mas também de reservas maternas (Labarta et al. 1999). Num estudo sobre a influência do regime alimentar no desenvolvimento das larvas de ostra plana, Robert et al. (2017) verificou que nos primeiros dois dias após a libertação das larvas, a concha destas aumentava, no entanto, a ingestão de alimento era relativamente baixa, independentemente das concentrações de fitoplâncton adicionadas. A partir do segundo dia a ingestão é altamente dependente da concentração de algas adicionada, e poderia ser descrita como um processo de três fases. Primeiro a ingestão das larvas aumenta significativamente entre os dias 3 e 5, até que diminuiu por volta dos dias 9-10, que

corresponde ao início da metamorfose. Na terceira fase dá-se um aumento súbito, no final da metamorfose, quando os juvenis começam a alimentar-se novamente (Robert et al. 2017). A metamorfose requer um elevado dispêndio de energia, por isso, durante o desenvolvimento das larvas estas necessitam de acumular reservas suficientes para poderem efetuar a metamorfose, com sucesso. Desta forma, a quantidade de alimento ingerido pelas larvas é um fator essencial para uma boa fixação (Holland & Spencer 1973). Helm (1977), numa experiência em que testou misturar espécies de microalgas para alimentar larvas de ostra plana, chegou à conclusão que a mistura de diferentes espécies de microalgas proporciona uma dieta mais equilibrada para as larvas. Isto provavelmente acontece porque importantes deficiências nutricionais que existam com o fornecimento de uma única espécie deverão ser colmatadas por outras espécies de algas numa mistura equilibrada (Helm 1977).

Quando se compara o valor nutricional de várias espécies de microalgas, deve-se ter em conta muitos aspetos não nutricionais que afetam o valor do alimento na dieta, como é caso do tamanho das células, digestibilidade e toxicidade (Webb & Chu 1983). Assim como nas larvas, a quantidade e equilíbrio de ácidos gordos é também um componente chave na dieta dos juvenis (semente) de ostra (Langdon & Waldock 1981). Enright et al. (1986), num estudo em que avaliaram as dietas de fitoplâncton para juvenis de *O. edulis*, verificaram que o melhor crescimento dos juvenis era obtido quando estes eram alimentados com uma mistura de microalgas. Faziam parte da mistura diferentes espécies de microalgas: *Phaeodactylum tricomutum*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros simplex*, *Isochrysis galbana* clone T-iso, e *Chaetoceros gracilis*. É extremamente importante fornecer uma dieta de microalgas correta à semente de ostra plana. No entanto, os indivíduos de ostra plana vão crescer mais rapidamente, com maior eficiência, atingindo uma qualidade muito superior e vão ter melhor desempenho quando são transferidos para um sistema de engorda. Além de todos estes aspetos, como o alimento é utilizado pelas ostras de uma forma muito mais eficiente, o custo de produção de microalgas é mantido o mais baixo possível (Laing & Millican 1986).

### **2.3. Cultura de microalgas**

Durante o desenvolvimento do presente estágio, o cultivo de microalgas foi realizado para alimentar reprodutores, larvas, larvas durante a fixação e juvenis recém fixados. As espécies de microalgas foram mantidas em culturas-stock. As microalgas foram cultivadas em balões de 2 litros, depois foi feito um *scale-up* para garrações de 5 litros, e por fim, com os garrações de 5 litros foram inoculadas mangas plásticas de cerca de 80 litros.

A sala onde eram cultivadas as microalgas, localizada nas instalações da Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira do IPMA, estava sob condições controladas de temperatura entre os 18 e 20°C, e com luz contínua. Todas as culturas foram mantidas com arejamento contínuo com ar filtrado, efetuado recorrendo a uma bomba de ar durante 24 horas por dia.

Os balões de 2 litros, com água salgada autoclavada foram inoculados, em condições de assepsia, com 1 mL/L de meio de cultura comercial. De seguida, e sempre em condições de assepsia, foi adicionado o inóculo da microalga para se efetuar cada cultura-stock. Este inóculo era previamente observado ao microscópio ótico, com o intuito de verificar que a cultura de onde provinha o inóculo não estava contaminada por outras espécies de algas nem por micro-flagelados e/ou ciliados. Os balões de 2 litros eram mantidos na sala de cultivo microalgas (Fig. 5).



**Figura 5:** Balões (2 L) e garrações (5 L) com as culturas-stock de microalgas na sala de cultivo de microalgas.

A partir das culturas-stock nos balões de 2 litros, foram realizados *scale-up* das culturas para garrações de 5 litros. Estes, eram previamente lavados com hipoclorito de sódio numa concentração de 1mL/L, onde depois era colocada água salgada esterilizada por um filtro UV e filtrada com um filtro de cartucho. Antes de ser adicionado o inóculo era adicionado 1 mL/L de meio de cultura. Os inóculos provenientes dos balões de 2 litros eram previamente observados ao microscópio ótico para verificar a sua qualidade, nomeadamente ausência de contaminações. Depois de inoculados os garrações eram mantidos na sala de cultivo de microalgas sob condições controladas de temperatura e luz (Fig. 5).

O procedimento que se seguia para transferir culturas de algas entre os diferentes recipientes, balão-balão, balão-garração, era o seguinte:

1. Limpar as superfícies do balcão com etanol a 70%.
2. Colocar os recipientes que iriam ser necessários em cima do balcão de trabalho, isto é, os recipientes dos quais vão ser transferidas as microalgas (antigos), e os

recipientes com a água esterilizados para os quais as microalgas vão ser transferidas.

3. Acender o bico de Bunsen, de modo a criar as condições de assepsia.
4. Remover as tampas de um recipiente de transferência e de um novo recipiente. Aproximar ambos os recipientes à chama.
5. Inclinhar a abertura do recipiente de transferência em direção á abertura do novo frasco e despejar o inóculo no novo recipiente. Evitar tocar as aberturas dos dois recipientes.
6. Colocar as tampas nos recipientes, e com um marcador à prova de água, rotular o novo frasco com a espécie de alga inoculada e a data da inoculação.
7. Repetir o procedimento para todos os recipientes no balcão de trabalho. Quando concluído, desligar o bico de Bunsen.
8. Remover todos os frascos, colocar estes na sala de cultivo de microalgas e colocar os tubos para o arejamento dos mesmos.
9. Limpar todas as superfícies do balcão de trabalho com etanol a 70%.

Os grandes volumes de algas foram produzidos em mangas plásticas de 80 litros que, antes de serem inoculadas eram enchidas com água salgada esterilizada por um filtro UV e onde foi adicionado 1mL/L de hipoclorito de sódio. De seguida, nas mangas foi introduzido 1 mL/L de tiosulfato para neutralizar algum cloro que não tenha, entretanto, evaporado. Após este procedimento foi adicionado 1 mL/L de meio de cultura comercial e depois as mangas foram inoculadas com as microalgas provenientes do cultivo nos garrafões de 5 litros. Antes de se proceder à inoculação, eram retiradas amostras dos garrafões de 5 L para verificar, ao microscópio ótico, a qualidade da cultura e ausência de contaminações. As culturas nas mangas plásticas, para produção de grandes volumes de algas, foram mantidas na sala de cultivo de microalgas (Fig. 6).



**Figura 6:** Mangas plásticas com as diferentes culturas-stock de microalgas na sala de cultivo de microalgas.

Dado a grande necessidade de microalga para alimentar os cultivos de ostra plana, estas eram cultivadas em grandes mangas de 400 litros. Assim, nestes casos as microalgas foram também cultivadas no exterior. Perante a impossibilidade de controlar a temperatura e o fotoperíodo no exterior, nestas mangas de cultura apenas eram colocadas pedras difusoras para arejamento. Para iniciar o cultivo nestes recipientes, era utilizada água salgada esterilizada por um filtro UV e filtrada por um filtro de corda. Posteriormente, era adicionado hipoclorito de sódio numa concentração de 1mL/L à água que permanecia assim cerca de 24 horas. Findo este período foi introduzido tiosulfato na mesma concentração que o hipoclorito para o neutralizar. Após esse procedimento, foram adicionados na água os nutrientes necessários para o cultivo, nitratos e fosfatos na concentração de 0,5 mL/L e também uma mistura comercial de micronutrientes na concentração de 0,5 mL/L. Nos casos em que as microalgas a produzir eram diatomáceas, foi ainda adicionado sílica dissolvida numa concentração de 1 mL/L em cada cultura-stock.

#### 2.4. As espécies de microalgas utilizadas

Nas estações piloto onde o presente estágio foi desenvolvido, as espécies de microalgas utilizadas para a alimentação dos reprodutores, larvas, larvas em fixação e juvenis foram: *Isochrysis galbana* (incluindo clone T-iso), *Pavlova lutheri*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis suecica* e as diatomáceas *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros calcitrans*. O alimento foi fornecido à cultura de ostra plana misturando-se previamente as diferentes espécies de microalgas, isto porque diferentes espécies de microalgas têm diferentes composições nutricionais. Como por exemplo, diferentes quantidades de ácidos gordos (tabela III), muito importantes para o bom crescimento das ostras. Assim, a mistura utilizada não foi a mesma para reprodutores, larvas e juvenis sendo que estes foram alimentados com misturas diferentes, adequadas às suas necessidades nutricionais (tabela II).

**Tabela II:** Proporção de cada espécie utilizada nas misturas de algas para alimentar Larvas, Juvenis e Reprodutores.

Espécie	Larvas	Juvenis	Reprodutores
<i>I. galbana</i>	++	++	++
Clone T-iso	++	++	++
<i>P. lutheri</i>	+	+	+
<i>R. salina</i>	+++	++	+++
<i>T. suecica</i>	+	++	+
<i>C. calcitrans</i>	++	+++	++
<i>S. costatum</i>	++	+++	++

**Tabela III:** Composição de ácidos gordos em percentagem do total de ácidos gordos, para as diferentes espécies de microalgas cultivadas no estágio.

Espécie	Saturados	Monoinsaturados	Polinsaturados	Fonte
<i>I. galbana</i>	51,2	11,2	19,4	(Bertsson et al. 1997)
	29,48	20,45	48,37	(Ricardo et al. 2011)
<i>I. galbana</i> T-iso	36,04	30,90	28,22	(Martínez-Pita et al. 2016)
<i>P. lutheri</i>	-	19,86	49,41	(Gonzalez Araya et al. 2012)
<i>R. salina</i>	-	8,35	68,74	(Gonzalez Araya et al. 2012)
<i>T. suecica</i>	65,2	11,2	19,4	(Bertsson et al. 1997)
	33,29	34,19	32,14	(Ricardo et al. 2011)
<i>C. calcitrans</i>	49,5	27,0	21,4	(Bertsson et al. 1997)
<i>S. costatum</i>	9,9	13,0	77,1	(Berge et al. 1995)

Das espécies de algas analisadas por Enright et al. (1986), considerando apenas as utilizadas pela empresa onde foi realizado o presente estágio (MW) podemos verificar que certas espécies de algas favorecem mais o crescimento do que outras. Enright et al. (1986) considera *Chaetoceros* spp. uma das melhores espécies para alimentar juvenis de *Ostrea edulis* (Fig.7), seguida da *Skeletonema costatum*, baseando-se no crescimento obtido quando os juvenis eram alimentados apenas com estas espécies. Segundo a autora, *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis galbana* variedade T-iso são também espécies de interesse para servirem de alimento para as culturas de ostra plana. A primeira espécie devido à quantidade de proteína que contém e a segunda devido à quantidade de arginina e leucina, que no seu estudo foi a espécie com maior quantidade destes aminoácidos dentro das espécies estudadas (tabela IV). *Tetraselmis suecica* e *Pavlova lutheri* são consideradas, no estudo de Enright et al. (1986) limitadas ou medíocres como alimento. *Tetraselmis* spp. apesar de ter altos níveis de hidratos de carbono (Romberger & Epifanio 1981), apresenta deficiência em alguns ácidos gordos essenciais (Langdon & Waldock 1981), e *P. lutheri* possui baixos níveis de ácido glutâmico quando comparado com outras espécies (Cowey & Corner 1966; Chau et al. 1967).

Algal diets ranked according to the growth response obtained with *Ostrea edulis* juveniles: source of algae given in footnotes.

	Algal cell diameter, volume ( $\mu\text{m}$ ; $\mu\text{m}^3$ ) <sup>a</sup>	Relative oyster growth response <sup>b</sup> , experiment no.		
		1	2	3
Mixed algae (Schütt, Bbsm, T-iso, Mono and Pet Pd)		1.9		
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt <sup>e</sup>	7	1.8		1.5
<i>Chaetoceros calcitrans</i> Takano <sup>e</sup> (Calcit)	3		1.5	1.3
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve (Skel) <sup>d</sup>	3-22; 203-350			1.2
<i>Chaetoceros simplex</i> Ostenfeld (Bbsm) <sup>e</sup>	9	1.2		1.1
<i>Rhodomonas</i> sp. (Rhodo) <sup>d</sup>	4-13; 46			1.1
<i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle & Heimdal (3H) <sup>e</sup>	4; 6-36		1.1	
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> Green clone (T-iso) <sup>b</sup> (Tahiti strain)	3-4; 46-74	1.0	1.0	1.0
<i>Tetraselmis maculata</i> Butcher <sup>e</sup>	10		0.8	
<i>Tetraselmis</i> sp. (Platy 1) <sup>f</sup>	11; 335-515		0.8	
<i>Pavlova lutheri</i> (Droop) Green (Mono) <sup>e</sup>	5-6; 32-58	0.6		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin (Pet Pd) <sup>e</sup>	12-32; 60	0.6		
<i>Pseudoisochrysis</i> sp. (Va 12) <sup>e</sup>	6		0.5	
<i>Chlorococcum</i> sp. (Chloro) <sup>e</sup>	7		0.5	
<i>Dunaliella tertiolecta</i> Butcher (Dun) <sup>e</sup>	9-11; 300		0.3	
<i>Skeletonema menziesii</i> Guillard, Carpenter & Reimann (Men) <sup>f</sup>	3-7			0.3
Green flagellate (Va 52) <sup>e</sup>	1-2		0.3	

Figura 7: Ranking de dietas de algas de acordo com o crescimento obtido em juvenis de *Ostrea edulis*. Adaptado de Enright et al. (1986).Tabela IV: Composição de aminoácidos (para 10<sup>6</sup> células)(Media  $\pm$  DP, N=4) para diferentes espécies de microalgas. Adaptado de Enright et al. (1986).

	<i>I. galbana</i> T-is	<i>C. calcitrans</i>	<i>S. costatum</i>	<i>Rhodomonas</i> sp.
Ácido aspártico	0,78 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,02	3,55 $\pm$ 0,32
Treonina	0,41 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	1,96 $\pm$ 0,15
Serina	0,38 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	2,02 $\pm$ 0,68
Ácido Glutâmico	1,06 $\pm$ 0,11	0,33 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,02	4,60 $\pm$ 0,47
Glicina	0,37 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	2,00 $\pm$ 0,25
Alanina	0,57 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,02	3,06 $\pm$ 0,56
Valina	0,46 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,01	2,29 $\pm$ 0,17
Metionina	0,15 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,10
Isoleucina	0,34 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,09	1,53 $\pm$ 0,14
Leucina	0,68 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	2,62 $\pm$ 0,33
Tirosina	0,28 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,13
Fenilalanina	0,38 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,15
Histidina	0,16 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,08
Lisina	0,47 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	2,39 $\pm$ 0,27
Arginina	0,55 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,01	2,41 $\pm$ 0,23
Proteína Parcial	7,04 $\pm$ 0,68	2,20 $\pm$ 0,07	6,75 $\pm$ 0,22	13,01 $\pm$ 2,03

### 3. Influência de fatores Abióticos

São vários os fatores abióticos com influência, não só na sobrevivência, mas também no crescimento de ostra plana. Os apontados como os fatores com mais influência no desempenho de ostra plana observam-se a temperatura, a salinidade, o hidrodinamismo e velocidade da corrente, o carbono orgânico particulado, o substrato, a profundidade, a exposição solar e a turbidez (Wilson 1987; Robert et al. 1988; Reise 1998; Laing 2005). No entanto, a influência destes fatores sobre o desempenho de ostra plana não é igual, tendo alguns um maior impacto sobre o desenvolvimento de ostra plana do que outros.

#### 3.1. Temperatura

Como já foi referido anteriormente, ostra plana possui um grande intervalo de temperaturas na qual consegue sobreviver, desde  $-1,5^{\circ}\text{C}$  até  $35^{\circ}\text{C}$  (Reise 1998; Piano et al. 2002). No entanto, a temperatura aparenta ser dos fatores abióticos que mais influência tem no crescimento e sobrevivência da *O. edulis*. Logo nas fases larvares iniciais, a temperatura é uma variável essencial para garantir o bom desenvolvimento destes organismos. Robert (1988), no estudo onde testou a influência da temperatura e salinidade em larvas de ostra plana, verificou que as larvas apresentaram melhor crescimento na temperatura mais alta testada, a  $30^{\circ}\text{C}$ . Além disso, concluiu também que as larvas cresceram de forma normal em diferentes salinidades, dentro dos limites testados, e que o crescimento apenas dependeu da temperatura. No entanto, estas temperaturas, perto dos  $30^{\circ}\text{C}$ , são relativamente difíceis de atingir, principalmente nas alturas mais frias do ano (em Portugal no inverno). Contudo, podem ser utilizadas resistências para aumentar a temperatura dos cultivos larvários. Porém, dado a necessidade de trocas de água para limpeza e os grandes volumes de água utilizados, as resistências tornam-se pouco eficazes. Além disso, o gasto energético é considerável, aumentando substancialmente os gastos de produção.

Num estudo sobre os efeitos da aclimação e exposição à temperatura na filtração, consumo de oxigénio e crescimento, Buxton et al. (1981) concluíram que a eficiência de assimilação não é afetada pela aclimatização. Contudo, a razão de volume de água por quantidade de oxigénio consumido atingiu o nível máximo em temperaturas entre os  $15^{\circ}\text{C}$  e os  $20^{\circ}\text{C}$ , embora a filtração e o consumo de oxigénio sejam modificáveis. Dado esses ajustes na filtração e no consumo de oxigénio, após aclimatização térmica, a eficiência de filtração, custo de filtração, alimento assimilado e espaço para crescimento, alcançaram valores ótimos após aclimação a temperaturas maiores com temperaturas entre os  $15^{\circ}\text{C}$  e os  $20^{\circ}\text{C}$ . Os autores concluíram ainda que,

em condições de aquacultura, existem vantagens em manter as culturas de ostra plana entre os 15°C e os 20°C. No entanto, aumentos de temperatura até aos 25°C, como os que acontecem naturalmente na natureza durante o verão, são benéficos e podem aumentar o crescimento (Buxton et al. 1981).

No estágio realizado, tanto na pré-engorda, como na engorda, as culturas de ostra foram mantidas em grandes tanques de terra com água do mar, introduzida durante a preia-mar, não sendo possível controlar a temperatura. Desta forma, a temperatura esteve dependente das flutuações sazonais e até mesmo diárias. Relativamente às temperaturas em que os larvários foram mantidos, a fixação e os juvenis durante o estágio permitiram obter crescimentos bons.

### **3.2. Salinidade**

Relativamente às condições de salinidade, ostra plana é bastante tolerante a diferentes valores de salinidade. De acordo com alguns autores, ostra plana consegue sobreviver em águas com salinidades entre 18-40 PSU e tem como salinidades ótimas valores entre 24-34 PSU (Reise 1998; Laing 2005).

Apesar de não ser dos fatores com maior influência na sobrevivência e crescimento de ostra plana e das suas larvas (Robert et al. 1988), a partir de salinidades superiores a 20 PSU o crescimento das larvas, ostras, e também a reprodução das mesmas é significativamente afetado (Loosanoff & Davis 1952; Davis & Ansell 1962). Locais com salinidades de 20 PSU ou inferiores tornam a cultura de *O. edulis* muito difícil uma vez que estes moluscos não se conseguem reproduzir em salinidades tão baixas (Davis & Ansell 1962). Reprodutores mantidos em águas com estes valores de salinidade não produziram larvas vivas, além disso, larvas mantidas nesta salinidade mesmo fazendo a metamorfose, apresentaram um crescimento muito lento (Davis & Ansell 1962). Robert et al. (1988) no seu estudo apontam que a salinidade ótima de crescimento para *O. edulis* é de 25 a 30 PSU.

Na manutenção das culturas do presente estágio, a salinidade foi fator que não foi possível manipular, em todas as fases de produção, desde os larvários, *micro-nursery*, *nursery* e engorda. No entanto, a salinidade nas culturas de ostra plana foi relativamente constante. Na maternidade, a água provinha de um furo localizado perto da Ria Formosa, desta forma a água onde eram mantidos os reprodutores, larvários e *micro-nursery* não estavam sujeitas a grandes flutuações. Relativamente à fase da pré engorda, que era realizada em tanques de terra com água proveniente da Ria Formosa, estava sujeita a alterações naturais e a possibilidade de aumento da salinidade devido à evaporação era neutralizada pela mudança constante de água. Na fase de engorda, em Setúbal, existia a possibilidade de variações sazonais, visto que a água dos tanques

onde foi realizada a engorda era renovada com água do Rio Sado durante as preia-mar, e a salinidade do estuário do rio pode variar consoante o caudal do rio, e a pluviosidade.

### **3.3. Profundidade**

Esta espécie de ostra (*O. edulis*) pode ser encontrada até aos 80 metros de profundidade (Campbell & Nicholls 2008). No entanto, vários estudos sugerem que o cultivo, ou engorda, desta espécie, pode ser realizado com sucesso a profundidades mais pequenas. Carlucci et al. (2010), não verificou diferenças entre manter a ostra plana em profundidades de 4 e 8 metros. Por outro lado, Snježana et al. (2007) num estudo para verificar o impacto da profundidade de cultivo no crescimento e sobrevivência de ostra plana, concluiu que as ostras mantidas numa profundidade entre 3 e 5 metros tiveram melhor crescimento que ostras mantidas a 12 metros de profundidade. No entanto, ostras mantidas a grandes profundidades são diretamente influenciadas pelas condições do fundo, como o aumento de detritos e redução de luz, tendo menor acesso a organismos fitoplanctónicos (Sarà & Mazzola 1997).

O sistema de cultivo utilizado na empresa onde foi realizado o presente estágio, é implementado à profundidade de 30 a 50 cm, em tanques que não excedem os 2 metros de profundidade. Este facto faz com que a profundidade de cultivo, aparentemente não ser um fator muito relevante. A esta profundidade parece não existir gradientes de salinidade, temperatura e até mesmo de quantidade de fitoplâncton ao longo da coluna de água dos tanques.

### **3.4. Acondicionamento de Reprodutores**

O acondicionamento de reprodutores em bivalves é essencial para o sucesso na reprodução. A colocação dos reprodutores em maternidades é importante logo na fase inicial da maturação das gónadas (Chávez-Villalba et al. 2002; Chávez-Villalba et al. 2002; Martínez & Pérez 2003; Matias et al. 2008).

Numa maternidade, se quisermos ter uma produção contínua de larvas ao longo de todo o ano, e dado que a época de reprodução ocorre apenas no início da primavera e no final do verão, é necessário acondicionar os reprodutores às condições e mudanças ambientais que ocorrem na natureza de forma a estimular a reprodução dos mesmos. Segundo, Maneiro et al. (2016), o acondicionamento de reprodutores no inverno poderá ser realizado aumentando a temperatura da água cerca de 2°C por semana durante dois meses, produzindo-se deste modo uma quantidade razoável de larvas viáveis. Além disso, terá de se alterar o fotoperíodo até às 16 horas/dia, aumentando 4 horas/semana. O mesmo autor, num outro trabalho, propõe um protocolo para acondicionamento de

reprodutores no Outono (Maneiro et al. 2017), em que aumenta a temperatura em 1°C por semana e o fotoperíodo 2 horas por semana.

Na manutenção das culturas de ostra plana na maternidade instalada nas instalações da EEMT do IPMA foi adotado o protocolo de acondicionamento de reprodutores proposto durante o inverno, de forma a tentar induzir o processo de obtenção de larvas nesta altura do ano (ainda durante a realização do estágio). Com a implementação deste protocolo foram obtidas larvas, e uma das maiores posturas foi obtida já no final do inverno. Estes resultados vieram demonstrar a viabilidade e o sucesso na implementação deste protocolo na cultura de ostra plana em cultivo intensivo.

## 4. Influência de Fatores bióticos

### 4.1. Agentes Patogénicos

São várias as doenças causadas por agentes patogénicos (tabela V) que atingem a espécie *Ostrea edulis*, alguns dos quais causando grandes mortalidades, não só em populações naturais, mas também em aquacultura. Na maior parte dos casos não se podem utilizar tratamentos, uma vez que a ostra plana é cultivada maioritariamente em espaços abertos. Por outro lado, a produção de vacinas não é uma solução uma vez que os moluscos não possuem linfócitos nem anticorpos. Como consequência, o controlo de doenças em bivalves está dependente de uma boa gestão dos stocks e de restrições de transferências. Quando possível, o desenvolvimento de animais resistentes também pode ajudar a diminuir o impacto e proliferação dos agentes patogénicos e respetivas doenças (Morga et al. 2012).

**Tabela V:** Patologias de ostra plana, respetivos agentes patogénicos e síndromes a elas associadas. *Adaptado de* FAO (2004).

Doença	Patogénico	Tipo	Síndrome
Bonamiose	<i>Bonamia ostreae</i>	Protozoário	A maioria das ostras infetadas não apresenta sintomas macroscópicos óbvios; infeções por vezes acompanhadas por descoloração amarela e extensas lesões no manto e nas brânquias; torna-se sistémica e geralmente letal quando as ostras têm 2-3 anos de idade.
Marteliose	<i>Marteilia refringens</i>	Protozoário	Descoloração dos epitélios das glândulas digestivas; paragem do crescimento; degradação da condição do tecido; diminuição das reservas de glicogénio; pode causar mortalidades recorrentes.
Doença da ilha de Denman	<i>Microcytos mackini</i>	Protozoário	Pústulas de cor verde/amarelo ou lesões semelhantes a abscessos, resultantes de infiltração e necrose de hemócitos, ocorrem dentro da parede do corpo, na superfície dos palpos labiais ou musculo adutor; frequentemente induz uma cicatriz castanha, adjacente à superfície do manto; recorrentemente o parasita pode causar taxas de mortalidade anormais em ostras mais velhas.
Doença da concha	<i>Ostracoblabe implexa</i>	Fungo	Impacto limitado, malformações de cor negra nas conchas podem impedir o desenvolvimento e causar mortalidade.
Infeção do tipo Herpes	Herpes (OHSV-1)	Vírus	Nenhum impacto direto ao nível da população foi observado.

#### 4.1.1. Bonamiose

*Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1979) é um parasita protozoário, e foi identificado pela primeira vez em França, nos finais da década de 1970. Desde então, foi observado por toda a Europa, pela costa da América do Norte, no oceano Pacífico e no oceano Atlântico (Lynch et al. 2008). Este parasita tem contribuído para o decréscimo de ostra plana em vários locais por toda a Europa, sendo que a Bonamiose é uma das doenças que mais mortalidade causa nesta espécie de ostra (Culloty et al. 2004) (tabela IV).

*B. ostreae* é um protozoário, pertence à ordem haplosporidia e ao filo cercozoa (Cavalier-Smith & Chao 2003). Este parasita é frequentemente observado dentro dos hemócitos (Pichot et al. 1979; Comps et al. 1980), contudo, observações extracelulares também têm sido observadas como nas glândulas digestivas e nas brânquias (Montes et al. 1994). Foi observado, em ostras infetadas, uma coloração amarelada e/ou úlceras perfuradas extensas nos tecidos das brânquias, manto e glândulas digestivas, porém, ostras infetadas também podem ter um aspeto normal (Balouet et al. 1983) (tabela V). O protozoário multiplica-se dentro dos hemócitos do hospedeiro, causando uma grande inflamação o que leva à morte deste (Bucke & Feist 1985) (tabela V).

Esta doença pode afetar juvenis, onde ostras com 1-3 meses são suscetíveis de ser infetadas pelo parasita, e podem desenvolver elevadas prevalências e intensidades de infeção por um período de 6 meses (Lynch et al. 2005). A mortalidade de juvenis de ostra plana com 6 meses de idade foi já associada a bonamiose (Lallias et al. 2008), no entanto, alguns autores apontam que indivíduos com mais de 2 anos de idade sejam mais suscetíveis à doença (Balouet et al. 1983; Grizel 1985; Robert et al. 1991; Culloty & Mulcahy 1996). Estudos demonstram que esta doença pode ser transmitida diretamente entre ostras numa mesma população sugerindo que não é necessário um hospedeiro intermediário para completar o seu ciclo de vida (Elston 1986; Hervio et al. 1995). Arzul et al. (2011), verificou que larvas de ostra plana também podem ser infetadas por *B. ostreae*. O facto de as larvas permanecerem dentro das ostras, por um período de incubação de 8 a 10 dias, antes de serem libertadas para a coluna de água (Marteil 1960), pode favorecer a transmissão de agentes patogénicos entre os progenitores e as larvas (Arzul et al. 2011). Para diagnosticar esta doença, podem ser utilizados diferentes métodos como PCR, histologia, hibridação *in situ* e sequenciação (Lynch, et al. 2008).

Em Portugal, *B. ostrea* ainda não foi detetada em nenhuma aquicultura. No entanto, já foi detetada uma outra espécie do género *Bonamia* também responsável por bonamiose, *Bonamia exitiosa*, esta espécie foi detetada na ria Formosa e também em *O. edulis* do estuário do Sado mas em semente importada (Batista et al. 2016).

#### **4.1.2. Marteiliose**

*Marteilia* sp. (Grizel et al. 1974) é um parasita protozoário pertencente ao filo Paramyxia, responsável por causar infeções em invertebrados marinhos (Berthe et al. 2004). É um dos principais agentes patogénicos de ostra plana, sendo responsável por elevadas taxas de mortalidade, e grandes perdas económicas na indústria de ostra Europeia desde o início da década de 70 (Alderman 1979; Grizel 1985; Figueras & Montes 1988).

Este parasita pode ser encontrado nas glândulas digestivas de ostras e nos ovários de copépodes (Audemard et al. 2002). A presença deste parasita reduz o índice de condição dos hospedeiros e a sua reposição de energia (tabela V). Na fase terminal da doença as ostras deixam de ter a capacidade de fechar a concha levando-as à morte (His et al. 1976; Figueras et al. 1991). A marceliose afeta as culturas de ostra durante a época quente do ano, na Europa, de Maio a Agosto (Grizel 1985; Audemard et al. 2001). López-Sanmartín et al. (2015), verificou pela primeira vez em Portugal em 2013, a presença deste parasita em *O. edulis* na Ria Formosa.

#### **4.1.3. Outros patogénicos**

Para além dos já referidos protozoários parasitas, responsáveis pela maioria da mortalidade causada por agentes patogénicos em ostreiculturas, há ainda o protozoário *Microcytos mackini* (Farley et al. 1988) responsável por causar a doença da ilha de Denman (Tabela V). O fungo *Ostracoblabe implexa* causa a doença na concha e ainda o vírus tipo herpes, foram também já reportados em juvenis de ostra plana (FAO 2004; Arzul et al. 2011).

#### **4.2. Predadores**

Os principais predadores de ostras são gastrópodes, como o caso de *Ocenebra erinacea* (Linnaeus, 1758) e *Urosalpinx cinerea* (Say, 1822), provenientes dos Estados Unidos da América e introduzidos na Europa desde a década de 1960 (Hancock 1960; Leppäkoski et al. 2013). *Ocenebra* é um predador de ostras menos preocupante que *Urosalpinx*, porque aparenta preferir alimentar-se de mexilhões em vez de ostras (Gosling 2007). São ainda apontados como predadores de ostras o ostraceiro (Tuckwell & Nol 1997a; Tuckwell & Nol 1997b), a estrela do mar, alguns peixes (Kennedy et al. 1996) e organismos da classe Turbellaria (Provenzano 1959). Walne (1961) no seu estudo onde observou causas de mortalidade de ostra plana, verificou que a presença do caranguejo *Carcinus* sp., sendo este possivelmente um grande predador, não causou taxas de mortalidade significativas em ostra plana. Mascaro & Seed (2000) estudou o comportamento predatório do *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) em várias espécies de bivalves incluindo ostra plana, verificando que este predador geralmente não demonstra preferência por nenhum tamanho em particular de ostra.

Esta espécie de caranguejo (*C. maenas*) ocorre no estuário do Sado e era frequente, durante o estágio, observar este caranguejo nos tanques onde se produziam as ostras na fase de engorda, na estação de Setúbal. No entanto, talvez devido ao método utilizado para manter os sacos com as ostras em suspensão na coluna de água,

que poderá dificultar o acesso dos caranguejos às ostras, não foi observada mortalidade por predação por *C. maenas*.

#### **4.3. Competidores**

São considerados competidores de ostra plana, todos os organismos que competem com estas por espaço e/ou alimento, como é o caso das macroalgas, esponjas, briozoários, anêmonas, poliquetas, moluscos, artrópodes e até mesmo as próprias ostras (Gosling 2007). São quatro os principais modos de competição: o consumo de larvas de ostras, antes da fixação, por filtradores; impedimento na fixação por falta de espaço sob o substrato para a fixação; emissão de um químico nocivo para impedir a fixação; crescimento em demasia da concha ou envenenamento da semente, resultando na morte desta (Kennedy et al. 1996). Dos quatro modos de competição descritos anteriormente, a restrição no espaço de substrato disponível para a fixação e o crescimento excessivo da concha são os mais comuns em processos de competição de ostra plana. Porém, mesmo quando os competidores não levam à mortalidade de ostra plana, estes causam uma redução na sobrevivência e crescimento da espécie (Zajac et al. 1989). Na Europa, o competidor de ostra mais importante é *Crepidula* spp., a lapa exótica acidentalmente introduzida por ostricultores a partir dos Estados Unidos da América em meados de 1800 (Gosling 2007).

Durante a realização do presente estágio, foi possível observar que a presença de competidores como poliquetas, moluscos e artrópodes poderão ter algum, mas não relevante, impacto na produção de ostra plana. Principalmente a partir do início da primavera, verificou-se um excessivo crescimento de macroalgas junto às margens dos tanques de engorda. Estas, podem não competir diretamente com as ostras mas podem competir por nutrientes com as microalgas, desta forma, poderão ter impacto na produtividade de microalgas dos tanques e por sua vez diminuir o alimento disponível para as ostras. A maior parte dos problemas observados pelas diferentes formas de competição, em cima citados, relacionados com a fixação, não existem na empresa onde foi realizado este estágio, dado a semente (juvenis) ser obtida através da reprodução em maternidade e não no meio natural.

#### **4.4. Genética**

A reprodução é realizada com os objetivos definidos não só pela indústria, mas também pelo consumidor, e estes devem ser definidos no início do programa de reprodução. Determinadas características, bastante apreciadas pelos consumidores devem ser tidas em conta e por isso, os programas de reprodução devem ser definidos de forma a obter

ostras com essas características (Gosling 2007). Para a indústria da aquicultura, características como o tamanho, a sobrevivência, rendimento de carne no mercado, eficiência alimentar e uniformidade do tamanho são das principais características que os produtores devem garantir (LyMBERY 2001). Para isso, é necessário definir um esquema de reprodução, como seleção familiar ou até mesmo hibridação para realizar a seleção genética. Outra técnica bastante mais simples, a qual foi usada durante a realização deste estágio na maternidade da empresa, é a seleção individual. Esta, é uma forma muito simples de seleção artificial que, em muitos casos, produz uma resposta mais rápida. Consiste na seleção, manual e *in situ*, dos melhores indivíduos da população para a reprodução e os demais são descartados. Este processo é repetido em cada geração até que a alteração fenotípica desejada seja obtida (Gosling 2007).

Muitas vezes, recorrer a técnicas um pouco mais avançadas para obter a melhor seleção de ostras, traz algumas vantagens, como o caso da manipulação da ploidia. A não separação, ou uma separação irregular de cromossomas trigêmeos resulta na incapacidade dos cromossomas homólogos se emparelharem durante a meiose, fazendo com que desta forma, os adultos triploides sejam estéreis. Do ponto de vista comercial, é desejável que os animais sejam estéreis por várias razões. A energia metabólica que seria gasta para o desenvolvimento das gónadas, que não ocorre, passa a poder estar disponível para o crescimento somático, resultando em animais maiores, logo maior quantidade de carne. No entanto, após a reprodução, por vezes, reflete-se uma deterioração da qualidade e do sabor da carne. Mais ainda, em algumas espécies de ostra, a maturidade sexual é frequentemente acompanhada por mortalidade, nomeadamente na altura do verão (Gosling 2007).

Para que se obtenha animais triploides em bivalves, são usados métodos químicos em vez de métodos físicos, uma vez que é possível alcançar uma percentagem de triploidia maior. O método mais comumente usado, é o metabólito fúngico citocalasina B, porém existe uma alternativa mais barata, menos tóxica e igualmente eficaz, a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). Estes produtos, inibem a formação dos corpos polares, mas não afetam o movimento dos cromossomas. Todos os métodos utilizados para induzir a triploidia, mas em particular os métodos químicos, são acompanhados por uma elevada mortalidade precoce das larvas. Gerard et al. (1994) para *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) relataram uma mortalidade de 64% com o tratamento com citocalasina B, enquanto que com o tratamento utilizando 6-DMAP a mortalidade foi apenas de 36%. Para tratar zigotos de *O. edulis* com citocalasina B, utiliza-se 1mg/L durante 20 minutos, 30 a 50 minutos após a fertilização. Este método realizado com sucesso pode ter uma taxa de larvas triploides de cerca de 70% (Gendreau & Grizel 1990).

## **5. Tipos de Sistemas e técnicas utilizados na produção da ostra plana**

O tipo de produção de ostras utilizado varia não só com as condições de cada produtor, mas também com as características da espécie de ostra que se quer produzir. Nesta secção do presente relatório de estágio, serão abordados os tipos de sistemas utilizados para produção de ostras na empresa onde o estágio foi desenvolvido (Marvellous Wave).

### **5.1. Reprodutores**

Regra geral, os sistemas para manter reprodutores não variam muito entre si. Frequentemente, os reprodutores são mantidos em pequenos tanques (Fig. 8), com 120 a 150 litros, com água corrente, não filtrada, com uma renovação de água de cerca de 25 mL por minuto por reprodutor (Helm & Neil 2004). Uma vez que os tanques estão em renovação constante de água, o alimento tem também de ser constantemente adicionado, caso contrário os tanques ficariam rapidamente sem alimento. A mistura de microalgas (alimento) é colocada em baldes que estão localizados por cima dos tanques, e por gravidade o conteúdo dos baldes é vertido para os tanques através de uma pequena mangueira, e com o auxílio de um regulador de fluxo efetua-se o fornecimento contínuo e controlado do alimento. São também colocados arejadores tanto nos tanques dos reprodutores como nos baldes do alimento. Como está esquematizado na Figura 8, os reprodutores são colocados diretamente sobre uma grelha, de forma a manter os reprodutores alguns centímetros acima do fundo. Isto permite que haja uma separação entre os organismos e as fezes e outros detritos que ficarão retidos no fundo do tanque (Helm & Neil 2004). Este esquema, utilizado na empresa onde o estágio foi realizado, é adequado para espécies que não necessitam de substrato, no entanto, também pode ser utilizado para espécies que necessitam de substrato, sendo o substrato colocado por cima da grelha de suporte, e de seguida os bivalves são colocados sobre o substrato.



**Figura 8:** Representação esquemática do sistema utilizados para manter reprodutores.

Para se proceder à recolha das larvas foram utilizados crivos posicionados depois do tubo de saída de água do tanque dos reprodutores. O crivo deve ter uma malha cujo o tamanho seja inferior ao tamanho das larvas, para que estas fiquem nele retidas, a malha adequada e utilizada neste procedimento foi de 100  $\mu\text{m}$ . O crivo deverá estar colocado num recipiente para que as larvas estejam sempre imersas. Resumidamente, a água com as larvas sai pelo tubo de saída do tanque, cai no recipiente onde está o crivo, as larvas vão ficar nele retidas, e a água sai por um furo numa zona mais elevada para manter o nível da água neste recipiente (Fig. 9). Nalgumas situações, pode ainda ser colocado um crivo um pouco menor, mas com uma malha superior, de forma que a água passe primeiro por este crivo antes de chegar ao crivo onde vão ficar retidas as larvas. O objetivo deste crivo é reter alguma sujidade como fezes e outros resíduos. Este crivo deverá ter uma malha suficientemente larga para que não retenha qualquer larva, 150  $\mu\text{m}$  será a malha adequada para este crivo.



**Figura 9:** Sistema utilizado para efetuar a recolha das larvas, instalado na saída de água do tanque de reprodutores.

Após a recolha das larvas, estas são lavadas com água salgada, previamente esterilizada por um filtro UV e filtrada por um filtro de corda. De seguida, as larvas foram colocadas num recipiente de 5 litros com água salgada esterilizada, e foi retirada uma amostra de 100  $\mu\text{L}$  para uma câmara de contagem de modo a garantir a qualidade da amostra. Ao microscópio ótico, são contadas as larvas vivas, mortas e as que apresentam deficiências morfológicas, presentes na câmara de contagem. De modo a fazer uma posterior análise das larvas foi feito um registo fotográfico das mesmas para mais tarde serem medidas. Este procedimento permite estimar o número de larvas presentes na postura e também verificar a qualidade da postura. De seguida, e após verificação da qualidade da amostra de larvas recolhidas, o recipiente de 5 litros com a amostra é vertido para um larvário.

## **5.2. Larvários**

As larvas são mantidas, após a libertação e até a fixação, durante cerca de 12 dias, em grandes tanques vulgarmente chamados de larvários (Fig. 10). Estes tanques, com um volume de cerca de 500 litros, têm um fundo cónico com uma abertura para facilitar o seu esvaziamento. Antes de as larvas serem colocadas nos tanques, estes são devidamente higienizados com cloro, de seguida a água salgada esterilizada por um filtro UV e filtrada por um filtro de corda é adicionada. No fundo dos tanques são colocados tubos arejadores para arejar a água e também para evitar a deposição das larvas no fundo do tanque. O volume de água é ajustado à quantidade de larvas que são colocadas a crescer no tanque, isto permite ter uma densidade de larvas mais controlada e rentabilizar as microalgas (alimento). A densidade larvar depende do tamanho das larvas sendo que larvas maiores eram mantidas em densidade menores e vice-versa. Depois destes procedimentos as larvas são colocadas nos tanques e é

adicionado alimento (a mistura de microalgas), de forma a que os taques fiquem com uma concentração de clorofila de cerca de 60 a 80  $\mu\text{g}$  por litro (medida com um fluorímetro de clorofila portátil).

Os larvários são limpos a cada dois dias, para tal, são colocados dois crivos, um sob o outro, e a água do tanque é vazada fazendo-a passar pelos crivos, de forma a que as larvas fiquem retidas nos crivos. O crivo inferior é de uma malha mais fina, normalmente de 100  $\mu\text{m}$ , e o crivo superior é de uma malha maior (150  $\mu\text{m}$ ). As larvas com crescimento mais rápido vão ficar retidas no crivo superior, enquanto que aquelas que não crescerem ou são de menores dimensões ficaram retidas apenas no segundo crivo (menor). Em cada mudança dos tanques, o crivo com malha superior será o adequado ao tamanho das larvas que se vão continuar a cultivar. Assim, sempre que se muda o tanque o crivo superior é de malha superior aquele que crivou as larvas na última mudança, isto devido ao crescimento contínuo das larvas. Normalmente, as larvas que passaram pelo crivo superior e ficaram retidas no crivo inferior, dependendo da sua quantidade, serão descartadas.

O procedimento de análise e visualização das amostras é sempre efetuado nas larvas que ficam retidas no crivo superior. Assim, estas depois de recolhidas do filtro são enxaguadas com água salgada esterilizada e filtrada e são colocadas de novo num recipiente com 5 litros, de onde é retirada uma amostra de 100  $\mu\text{L}$  para uma câmara de contagem. Esta amostra é observada ao microscópico, é analisada a qualidade das larvas, o comportamento natatório das mesmas, assim, como a sua morfologia. De seguida as larvas são contadas e fotografadas para posterior medição. Após este procedimento, o recipiente de 5 litros que contém as larvas é vertido num outro tanque com água, previamente limpo. O larvário onde as larvas estavam anteriormente é lavado com cloro e preparado com água de forma a ficar pronto para receber uma nova cultura de larvas.



**Figura 10:** Tanques utilizados para manter as larvas.

### 5.3. *Micro-nursery*

Nas instalações onde se realizou o estágio, a *micro-nursery* era composta por tanques retangulares, de cerca de 1000 litros (Fig. 11). Nestes eram colocadas as larvas para se fixarem, e a semente era mantida durante cerca de um mês após a fixação, até que os juvenis tivessem tamanho suficiente para poderem ir para os tanques de pré-engorda. Quando as larvas têm cerca de 12 dias de idade, e apresentam sinais de que se vão começar a fixar, como a presença do olho e a procura de local para se fixar com o “pé”, são colocadas em crivos, com malha de cerca de 150  $\mu\text{m}$  (Fig. 11). Previamente, nos crivos, é colocada uma moagem de conchas de ostras envelhecidas que vai servir de substrato ao qual as larvas se irão fixar. Por cima de cada crivo estão dois aspersores a deitar água bombeada a partir do próprio tanque, de forma a efetuar recirculação de água com alimento em sistema de *downwelling*. Em algumas culturas também podem ser usados sistemas de *upwelling* para este tipo de *nursery* (Helm & Bourne 2004). Os crivos não estão assentes no fundo do tanque, mas sim numa estrutura de tubos em pvc de forma a ficarem a cerca de 30 cm do fundo do tanque (Fig. 11). O tanque é cheio de forma a que o nível da água fique cerca 4 a 5 cm acima do fundo dos crivos, e são também colocados tubos para arejamento dos tanques. A limpeza destes tanques é semelhante aos anteriores, mudança total de água e lavagem com cloro a cada dois dias, nos dias em que não se efetua limpeza é feita uma mudança parcial de cerca de 50% do volume de água. Além disso, os crivos são lavados com água limpa, todos os dias, para remover fezes e microalgas que fiquem depositadas na malha do crivo. Para controlar o sucesso na fixação dos juvenis, são retiradas amostras dos crivos, e posteriormente analisadas à lupa. Nesta observação, analisa-se o comportamento e morfologia das larvas e verifica-se a quantidade de larvas que já se fixaram.

De modo a garantir a qualidade e viabilidade da cultura, é necessário remover as conchas de ostras que morreram e ostras cujo o crescimento esteja abaixo do esperado. Este procedimento de seleção é realizado várias vezes ao longo de todo o tempo em que as ostras estão na *micro-nursery*. Com o crescimento dos juvenis é possível separá-los da moagem de concha de ostras envelhecidas e também de pequenas conchas de ostras que, entretanto, possam ter morrido. Para isso, as ostras e a moagem são passadas por um crivo de malha apertada o suficiente para reter as ostras (300  $\mu\text{m}$ ), mas larga o suficiente para que a moagem possa passar através dele. As ostras transitam para a fase de pré-engorda, quando têm tamanho suficiente para ficarem retidas num crivo de malha superior de 2 mm.



Figura 11: Tanques utilizados para manter as ostras recém fixadas e fixação das larvas.

#### 5.4. Pré-engorda

A fase de pré-engorda é realizada num grande tanque de terra (Fig. 12). Nestes tanques é construída uma jangada feita de tubos de pvc que suporta os crivos onde estão as ostras fixas. A recirculação de água é efetuada através de um sistema de *upwelling* com a ajuda de uma bomba de ar. A limpeza deste sistema, principalmente dos crivos deve ser regular e frequente, porque rapidamente se acumulam fezes, assim como algas e até outros organismos. Estes podem entupir a rede que suporta as ostras e impedir a recirculação de água, caso isto aconteça as ostras correm o risco de morrer devido a falta de alimento e de oxigenação. A triagem das ostras também deve ser frequente nesta fase uma vez que as ostras crescem a um ritmo elevado, e a densidade pode rapidamente ficar desajustada em relação ao tamanho dos juvenis em cada um dos crivos.



Figura 12: Tanques da estação piloto de piscicultura de Olhão. Fonte: (IPIMAR Estação Piloto de Piscicultura de Olhão 2011).

### **5.5. Engorda**

A fase de engorda é realizada em grandes tanques de terra, tal como na fase de pré-engorda, tipicamente usados em cultura de peixes (Fig. 13). Nestes tanques, as ostras são mantidas em sacos de rede próprios (de malha variável consoante o tamanho das ostras), com 50 cm por 100 cm de tamanho. Os sacos estão presos a cordas que atravessam os tanques de forma a que as ostras fiquem a uma profundidade de cerca de 30 cm. Por cima de cada saco, está uma placa flutuadora, cuja função é impedir que este conjunto se afunde com o peso. Cada corda pode ter um número variável de sacos, consoante a largura do tanque, e cada tanque pode ter um número variável de cordas. Existem sacos com vários tamanhos de malha, uns com malha mais apertada para ostras mais pequenas, e sacos com malhas bastante largas para ostras maiores. A densidade de ostras em cada saco também deve ser adequada ao tamanho das ostras. Sendo que ostras mais pequenas podem estar em densidades mais elevadas. Com o crescimento das ostras, estas são retiradas dos tanques, para limpeza dos sacos e triagem das ostras, e é nesta altura que as ostras são pesadas e é ajustada a densidade dos sacos. As ostras são triadas numa máquina de triagem desenvolvida pela empresa, onde as ostras são triadas pelo seu tamanho e limpas, ficando prontas para serem introduzidas em novos sacos previamente limpos e depois voltarem aos tanques de cultivo.



**Figura 13:** Tanques de engorda de ostras em Setúbal. É possível visualizar as placas que fazem com que os sacos com ostras não afundem.

## **6. Análise das competências adquiridas**

Com a realização deste estágio em contexto empresarial, foi possível expandir conhecimentos na produção em aquacultura da ostra plana em Portugal, nas diferentes fases de desenvolvimento (reprodução, *nursery*, passando pela pré engorda e engorda). A aprendizagem acerca dos princípios de gestão diária de produção de uma aquacultura de bivalves e a aplicação de soluções para eventuais problemas que surgem no quotidiano foram também competências importantes adquiridas ao longo da realização do estágio. A produção de microalgas para alimento e a realização de amostragens das culturas de ostra plana, resultaram na familiarização com diversos procedimentos laboratoriais para além de uma visão geral dos elementos essenciais no planeamento de ensaios biológicos na produção de ostra plana em aquacultura.

## Bibliografia

- Alderman, D.J., 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fish. Rev.*, 41(1/2), pp.67–69.
- Arzul, I. et al., 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology*, 179(1), pp.69–76.
- Audemard, C. et al., 2001. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 257(1), pp.87–108.
- Audemard, C. et al., 2002. Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 124(3), pp.315–323.
- Balouet, G., Poder, M. & Cahour, A., 1983. Haemocytic parasitosis: Morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 34(1), pp.1–14.
- Batista, F.M. et al., 2016. Detection of *Bonamia exitiosa* in the European flat oyster *Ostrea edulis* in southern Portugal. *Journal of Fish Diseases*, 39(5), pp.607–611.
- Berge, J.-P. et al., 1995. Reassessment of lipid composition of the diatom, *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry*, 39(5), pp.1017–1021.
- Berntsson, K.M. et al., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 154(2), pp.139–153.
- Von Bertalanffy, L., 1938. A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws. II). *Human Biology*, 10(2), pp.181–213.
- Berthe, F.C.J. et al., 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17(4), pp.433–448.
- Brown, M.R. et al., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1), pp.315–331.
- Bucke, D. & Feist, S., 1985. Bonamiasis in the flat oyster, *Ostrea edulis*, with comments on histological techniques. *Fish and shellfish pathology*. Academic Press, London, UK, pp.387–392.
- Buxton, C.D., Newell, R.C. & Field, J.G., 1981. Response surface analysis of the combined effects of exposure and acclimation temperatures on filtration, oxygen consumption and scope for growth in the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 6, pp.73–82.
- Caers, M. et al., 2002. Impact of the supplementation of a docosaehaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 140(6), pp.1157–1166.
- Campbell, A. & Nicholls, J., 2008. *Guia de Campo da Fauna e Flora do Litoral de Portugal e Europa 3º*. Fapas, ed.,
- Carlucci, R. et al., 2010. Experimental data on growth, mortality and reproduction of *Ostrea edulis* (L., 1758) in a semi-enclosed basin of the Mediterranean Sea. *Aquaculture*, 306(1), pp.167–176.

- Carriker, M.R. & Gaffney, P.M., 1996. A Catalogue of Selected Species of Living Oysters (Ostracea) of the World. In *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book, pp. 1–18.
- Cavalier-Smith, T. & Chao, E.E.-Y., 2003. Phylogeny and Classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*, 154(3), pp.341–358.
- Chau, Y.K., Chuecas, L. & Riley, J.P., 1967. The Component Combined Amino Acids of Some Marine Phytoplankton Species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47(3), pp.543–554.
- Chávez-Villalba, J., Barret, J., et al., 2002. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture*, 210(1), pp.171–186.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., et al., 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214(1), pp.115–130.
- Cole, H.A., 1942. Primary Sex-Phases in *Ostrea Edulis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s2-83(331), p.317 LP-356.
- Cole, H.A., 1941. The fecundity of *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 25(2), pp.243–260.
- Comps, M., Tige, G. & Grizel, H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huitre plate.
- Cowey, C.B. & Corner, E.D.S., 1966. The amino-acid composition of certain unicellular algae, and of the faecal pellets produced by *Clanus finmarchicus* when feeding on them. *Some Contemporary Studies in Marine Science*, pp.225–231.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A. & Mulcahy, M.F., 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture*, 237(1), pp.41–58.
- Culloty, S.C. & Mulcahy, M.F., 1996. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, 144(1), pp.53–63.
- Davis, H.C. & Ansell, A.D., 1962. Survival and growth of larvae of the European oyster, *O. edulis*, at lowered salinities. *The Biological Bulletin*, 122(1), pp.33–39.
- Elston, R.A., 1986. Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis Aquat Org*, 2, pp.49–54.
- Enright, C.T. et al., 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96(1), pp.1–13.
- FAO, 2004. Cultured Aquatic Species Information. FAO. Available at: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea\\_edulis/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en) [Accessed June 12, 2018].
- FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture*.
- Figueras, A.J. & Montes, J., 1988. A ber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *American Fisheries Society Special Publication*, 18, pp.38–46.
- Figueras Huerta, A., Jardón, C.M. & Caldas, J.R., 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *U. S. Fish Wildl. Serv.*

- Fish. Bull.*, 64, pp.1–480.
- Gendreau, S. & Grizel, H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 90(3), pp.229–238.
- Gerard, A. et al., 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture Research*, 25(7), pp.709–719.
- Ghazala, S. & Muzammil, A., 2002. Gametogenic patterns of the larviparous oyster *Ostrea nomades* from Karachi, Pakistan (northern Arabian Sea). *Aquaculture Research*, 33(13), pp.1049–1058.
- Gonzalez Araya, R. et al., 2012. Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture*, 364–365, pp.272–280.
- Gosling, E., 2007. *Reproduction, Settlement and Recruitment*, Wiley-Blackwell.
- Grizel, H., 1985. *Etude des récentes épizooties de l'huître plate Ostrea edulis Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne*, Citeseer.
- Grizel, H. et al., 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche*, (240), pp.7–30.
- Hancock, D.A., 1960. 2. The ecology of the molluscan enemies of the edible mollusc. *Journal of Molluscan Studies*, 34(3), pp.123–143.
- Helm, M. & Bourne, N., 2004. *Hatchery culture of bivalves*, FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER.
- Helm, M., Holland & Stephenson, 1973. The Effect of Supplementary Algal Feeding of a Hatchery Breeding Stock of *Ostrea edulis* L. on Larval Vigour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(3), pp.673–684.
- Helm, M.M. et al., 1991. Fatty Acid Composition of Early Non-Feeding Larvae of the European Flat Oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71(3), pp.691–705.
- Hervio, D. et al., 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture*, 132(3), pp.183–194.
- His, E., Tige, G. & Rabouin, M.-A., 1976. Observations relatives à la maladie des huîtres plates dans le bassin d'Arcachon, vitesse d'infestation et réactions pathologiques.
- Holland, D.L. & Spencer, B.E., 1973. Biochemical Changes in Fed and Starved Oysters, *Ostrea edulis* L. During Larval Development, Metamorphosis and Early Spat Growth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(2), pp.287–298.
- Ian Laing, P.W. and F.A., 2005. A feasibility study of native oyster (*Ostrea edulis*) stock regeneration in the United Kingdom.
- INE, I.P., 2018. *Estatísticas da Pesca*, Available at: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=320384843&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=320384843&PUBLICACOESmodo=2).
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. & Eble, A.F., 1996. *The eastern oyster: Crassostrea virginica*, University of Maryland Sea Grant College.

- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(21), pp.2747–2757.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J. & Pérez-Camacho, A., 1999. Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia*, 405(0), pp.125–131.
- Laing, I. & Millican, P.F., 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54(4), pp.245–262.
- Laing, I., Walker, P. & Areal, F., 2006. Return of the native – is European oyster (*Ostrea edulis*) stock restoration in the UK feasible? *Aquatic Living Resources*, 19(3), pp.283–287.
- Lallias, D. et al., 2008. *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources*, 21(4), pp.423–439.
- Langdon, C.J. & Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* Spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61(2), pp.431–448.
- Leppäkoski, E., Gollasch, S. & Olenin, S., 2013. *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management*, Springer Science & Business Media.
- Linnaeus, 1758., 1758. *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. *World Register of Marine Species*. Available at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140658> [Accessed June 12, 2018].
- Loosanoff, V.L., 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *O. edulis*, in waters of Maine. *The Biological Bulletin*, 122(1), pp.86–94.
- Loosanoff, V.L. & Davis, H.C., 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. *The Biological Bulletin*, 103(1), pp.80–96.
- López-Sanmartín, M. et al., 2015. Detection of *Marteilia refringens* infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* and the dwarf oyster *Ostrea stentina* in southern Portugal and Spain. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130(Supplement C), pp.52–55.
- Lymbery, A.J., 2001. Genetic improvement in the Australian aquaculture industry. *Aquaculture Research*, 31(1), pp.145–149.
- Lynch, S.A. et al., 2005. The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), pp.1019–1025.
- Lynch, S.A., Mulcahy, M.F. & Culloty, S.C., 2008. Efficiency of diagnostic techniques for the parasite, *Bonamia ostreae*, in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 281(1), pp.17–21.
- Maneiro, V. et al., 2016. Combined Effects of Temperature and Photoperiod on the Conditioning of the Flat Oyster (*Ostrea edulis* [Linnaeus, 1758]) in Winter. *Journal of Shellfish Research*, 35(1), pp.137–141.
- Maneiro, V. et al., 2017. Effects of temperature and photoperiod on the conditioning of the flat oyster (*Ostrea edulis* L.) in autumn. *Aquaculture Research*, 48(8), pp.4554–4562.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of*

- the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(1), pp.95–110.
- Marteil, L., 1960. Écologie des huîtres du Morbihan *Ostrea edulis* Linné et *Gryphaea angulata* Lamarck. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 24(3), pp.326–346.
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C. & García, F.J., 2016. Influence of microalga lipid composition on the sexual maturation of *Mytilus galloprovincialis*: a hatchery study. *Aquaculture Nutrition*, 22(1), pp.202–216.
- Martínez, G. & Pérez, H., 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 228(1), pp.153–167.
- Mascaro, M. & Seed, R., 2000. Foraging behavior of *Carcinus maenas* (L.): comparisons of size-selective predation on four species of bivalve prey. *Journal of Shellfish Research*, 19(1), pp.283–292.
- Matias, D. et al., 2008. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International*, 17(3), p.257.
- Medaković, D. et al., 1997. X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 129(4), pp.615–623.
- Michael, H., 1977. Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 57(4), pp.1019–1029.
- Montes, J., Anadón, R. & Azevedo, C., 1994. A Possible Life Cycle for *Bonamia ostreae* on the Basis of Electron Microscopy Studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(1), pp.1–6.
- Morga, B. et al., 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), pp.958–968.
- Narita, D. & Rehdanz, K., 2017. Economic impact of ocean acidification on shellfish production in Europe. *Journal of Environmental Planning and Management*, 60(3), pp.500–518.
- Orton, J.H., 1927. Observation and Experiments on Sex-Change in the European Oyster (*O. edulis*): Part I. The Change from Female to Male. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 14(4), pp.967–1045.
- Orton, J.H., 1933. Observations and Experiments on Sex-Change in the European Oyster (*O. edulis*). Part III. On the Fate of Unspawned Ova. Part IV. On the Change from Male to Female. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 19(1), pp.1–53.
- OSPAR Commission, 2003. OSPAR Commission for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic. Available at: <https://www.ospar.org/documents?v=6974>.
- Pascual, M.S. et al., 1989. Female-male interaction in the breeding system of the puelche oyster *Ostrea puelchana* d'Orbigny. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 132(3), pp.209–219.
- Pazos, A.J. et al., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134(2), pp.367–380.

- Piano, A. et al., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress & Chaperones*, 7(3), pp.250–257.
- Pichot, Y. et al., 1979. [Researches on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., new parasite of flat oyster *Ostrea edulis* L.[France]].[French]. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*.
- Provenzano, A.J., 1959. Effects of the flatworm *Stylochus ellipticus* (Girard) on oyster spat in two salt water ponds in Massachusetts. In *Proc Natl Shellfish Assoc.* pp. 83–88.
- Reise, K., 1998. Pacific oysters invade mussel beds in the European Wadden Sea. *Senckenbergiana maritima*, 28(4), pp.167–175.
- Ricardo, G. et al., 2011. A physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquaculture Research*, 42(5), pp.710–726.
- Robert, R. et al., 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resources*, 4(4), pp.265–274.
- Robert, R., His, E. & Dinet, A., 1988. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 97(1), pp.95–100.
- Robert, R., Vignier, J. & Petton, B., 2017. Influence of feeding regime and temperature on development and settlement of oyster *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) larvae. *Aquaculture Research*, 48(9), pp.4756–4773.
- Romberger, H.P. & Epifanio, C.E., 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture*, 25(1), pp.77–87.
- Sarà, G. & Mazzola, A., 1997. Effects of trophic and environmental conditions on the growth of *Crassostrea gigas* in culture. *Aquaculture*, 153(1–2), pp.81–91.
- Seed, R. & Suchanek, T.H., 1992. Population and community ecology of Mytilus.
- Sidhu, K.S., 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(3), pp.336–344.
- Silva, P.M., Fuentes, J. & Villalba, A., 2009. Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture*, 287(3), pp.253–265.
- Snježana, Z. et al., 2007. Impact of varying cultivation depths on growth rate and survival of the European flat oyster *Ostrea Edulis*, L. *Aquaculture Research*, 38(12), pp.1305–1310.
- Tuckwell, J. & Nol, E., 1997a. Foraging behaviour of American oystercatchers in response to declining prey densities. *Canadian Journal of Zoology*, 75(2), pp.170–181.
- Tuckwell, J. & Nol, E., 1997b. Intra- and inter-specific interactions of foraging American oystercatchers on an oyster bed. *Canadian Journal of Zoology*, 75(2), pp.182–187.
- Utting, S.D. & Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155(1), pp.45–54.
- Walne, P.R., 1961. Observations on the Mortality of *Ostrea Edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 41(1), pp.113–122.

- Walne, P.R. & Spencer, B.E., 1974. Experiments on the growth and food conversion efficiency of the spat of *Ostrea edulis* L in a recirculation system. *ICES Journal of Marine Science*, 35(3), pp.303–318.
- Webb, K.L. & Chu, L.E., 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In *2nd Int. Conference on Aquaculture Nutrition*. pp. 272–291.
- Wilson, J.H., 1987. Environmental parameters controlling growth of *Ostrea edulis* L. and *Pecten maximus* L. in suspended culture. *Aquaculture*, 64(2), pp.119–131.
- Zajac, R.N., Whitlatch, R.B. & Osman, R.W., 1989. Effects of inter-specific density and food supply on survivorship and growth of newly settled benthos. *Marine ecology progress series*. *Oldendorf*, 56(1), pp.127–132.