



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Maturação, larvicultura e depuração do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia; Veneridae) em laboratório.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Claudio Manoel Rodrigues de Melo

FRANCISCO JOSÉ LAGREZE SQUELLA

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lagreze , Francisco

Maturação, larvicultura e depuração do berbigão
Anomalocardia brasiliana (Gmelin, 1791) (Bivalvia;
Veneridae) em laboratório / Francisco Lagreze ;
orientador, Claudio Manoel Rodrigues de Melo -
Florianópolis, SC, 2014.

112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Molusco de areia. 3.
Condicionamento. 4. Salinidade. 5. Dieta. I. Rodrigues de
Melo, Claudio Manoel. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.
Título.

**Maturação, larvicultura e depuração do berbigão *Anomalocardia
brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia; Veneridae) em laboratório**

Por

FRANCISCO JOSÉ LAGREZE SQUELLA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo – *Orientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dr. Gilberto Caetano Manzoni

Dr. Hércio Luis de Almeida Marques

Dr. Jaime Fernando Ferreira

Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque

*Dedico este trabalho à minha Mãe
guerreira, Carmen Julia.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer de forma muito especial e sincera a minha amada esposa pelo apoio, ajuda e conselhos em toda a execução deste projeto de doutorado, sem ela tudo teria sido mais difícil.

Quero agradecer a minha Filha Serena pela paciência em ter que aguentar conversas acadêmicas sobre berbigão bem como inúmeros finais de semana esperando eu sair do computador para poder curtir em família.

Agradeço a minha mãe que sempre me apoiou e encorajou para o aperfeiçoamento profissional.

Agradeço a rede *Anomalocardia brasiliana* que foi formada desde o início do projeto Gente da Maré que permitiu ampliar os conhecimentos de uma espécie que habita uma costa tão extensa com características sociais e ambientais diversas. Neste projeto agradeço a todos os envolvidos, especialmente a equipe do “World Fisheries Trust”.

Agradeço ao Professor Dr. Jaime Ferreira que foi quem me encorajou a fazer o doutorado. Obrigado.

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Claudio Melo pelo tempo e paciência para desenvolver e terminar esta tese.

Agradeço à Professora Aimê Raquel pelas conversas e orientações sobre a execução deste trabalho, com destaque a parte reprodutiva e a obtenção de informações sobre os sambaquis. Bem como, à equipe do LAMEX/NEPAQ pelo apoio na realização dos procedimentos histológicos.

Agradeço a toda equipe LMM que colaborou nas discussões na hora do café ou pelos corredores do laboratório. Agradeço a Jaqueline pelas algas, a Bê pelo café e pão quentinho, a Duda, Zezé, Tatu, Chico, Claudio Blacher pelo apoio na compra de equipamentos e a Alexandre pelas instalações elétricas para meus experimentos.

Agradeço a todos os alunos que ajudaram com os experimentos, Rafael Costa, Breno, Rafael Bittencourt, Graziela, Jeniffer e outros que posso estar esquecendo nesse momento.

Agradeço à Capes pela bolsa de doutorado e ao departamento de Aquicultura pelo apoio financeiro para apresentar os trabalhos em congressos. Agradeço ao Carlito pela paciência para manter a documentação em dia.

Agradeço aos membros da banca de avaliação do projeto, de qualificação e de defesa do doutorado pelas correções e contribuições realizadas.

Agradeço a meu amigo e chefe por um ano Brian Kingzett que acreditou no meu potencial para coordenar e construir os laboratórios de pesquisa em bivalves em Deep Bay Marine Field Station, no período de 2012 em que tranquei o curso devido a uma viagem ao Canadá por um ano.

Agradeço a Roberta Ramos e toda sua equipe do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos que facilitou o trabalho de depuração.

Agradeço ao Marcão pela ajuda na coleta de animais e na realização de alguns dos experimentos desenvolvidos nesta Tese.

O Mar

*“Necessito do mar porque me ensina:
não sei se aprendo música ou consciência:
não sei se é onda ou onde ou ser profundo
somente rouca voz ou deslumbrante
suposição de peixes e navios.
O fato é que até quando estou dormindo
de algum modo magnético circulo
na universidade do marulho.”*

Pablo Nerud

RESUMO

Com o objetivo de contribuir com a tecnologia de produção de sementes de *Anomalocardia brasiliana* o presente estudo avaliou na reprodução, o efeito da temperatura e da salinidade no desenvolvimento gonádico de animais adultos em laboratório. Além disso, na produção de formas jovens, avaliou o efeito da densidade e do tempo de cultivo de larvas e dietas uni e bialgais na larvicultura. Avaliou também o efeito da salinidade na bioacumulação e no tempo de depuração de *Escherichia coli* no molusco de areia *A. brasiliana*. Nos resultados, a temperatura utilizada no tratamento T16-25/S35, controlou a ocorrência de desovas, proporcionou a maturação dos animais e a sincronia reprodutiva dos machos e das fêmeas. Observou-se também que a salinidade não afetou o estágio sexual, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Na larvicultura, as densidades 10 e 15 larvas.mL⁻¹ proporcionaram maior porcentagem de sobrevivência das larvas. Após o quinto dia, as larvas podem ser transferidas para o assentamento e cultivadas com densidade de 25 larvas.cm⁻². Larvas de *A. brasiliana* apresentaram bom crescimento quando alimentadas com a microalga *Nannochloropsis oculata*, tanto com dieta unialgal quanto bialgal. Nas dietas mistas, recomenda-se as microalgas *Chaetoceros muelleri* com *N. oculata* ou *Pavlova lutheri*. A maior bioacumulação e maior redução, após 48 horas, de *E. coli* na carne do *A. brasiliana* foi observada na salinidade de 25.

Palavras chave: 1.Moluscos de areia; 2.condicionamento; 3.salinidade; 4.temperatura; 5.dieta.

ABSTRACT

To contribute with the knowledge on hatchery technology of *Anomalocardia brasiliiana* production, the present study evaluated in reproduction, the effect of temperature and salinity on gonadal development of adult animals in the laboratory. In the production of juveniles, this study evaluated the effect of density and time of cultivation of larvae and diets uni and bialgais at the hatchery. And assessed the effect of salinity on the bioaccumulation and depuration time of *Escherichia coli* in clams. In the results, the temperature used in the treatment T16-25/S35, controlled the occurrence of spawning, afforded the animals maturation and reproductive synchrony of males and females. It was also observed that the salinity did not affect the sexual stage in both males and females. In larvae, densities 10 and 15 larvas.mL⁻¹ presented higher percentage of larval survival. After the fifth day, the larvae can be transferred to the settlement and cultured with a density of 25 larvas.cm⁻². Larvae of *A. brasiliiana* showed good growth when fed with microalgae *Nannochloropsis oculata*, both as unialgal and bialgal diet. In mixed diets, microalgae *Chaetoceros muelleri* with *N. oculata* or *Pavlova lutheri* is recommended. The greater bioaccumulation and greater reduction after 48 hours of *E. coli* in the *A. brasiliiana* flesh was observed in salinity 25.

Keywords: 1.clam; 2.conditioning; 3.salinity; 4.temperature; 5. diet.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1. Temperatura diária registrada durante os 55 dias de experimento..... 55
- Figura 2 a 9. Fotografias microscópicas dos estágios sexuais dos machos (figuras 2 a 5) e das fêmeas (figuras 6 a 9) do berbigão *Anomalocardia brasiliana*..... 56
- Figura 10 e 11. Fotografia microscópica de condição e parasita registrado na avaliação histológica de espécimes do berbigão *Anomalocardia brasiliana*..... 57
- Figura 12. Estágio sexual (%) das fêmeas e dos machos de *A. brasiliana* condicionados em laboratório e coletadas no meio ambiente durante o período experimental. 58

CAPÍTULO III

- Figura 1. Sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* com 7 dias de larvicultura para as 4 densidades testadas: 10, 15, 30 e 50 larvas.mL⁻¹..... 70
- Figura 2. Média e desvio padrão da sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* na fase de assentamento com 5 e 7 dias de larvicultura em duas densidades, 25 e 50 larvas.mL⁻¹..... 71
- Figura 3. Sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais e de duas algas..... 73
- Figura 4. Comprimento de concha das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais e de duas algas. 73

CAPÍTULO IV

- Figura 1. Numero mais provável de *Escherichia coli* na carne do molusco de areia *Anomalocardia brasiliana* durante o processo de depuração. 98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Descrição microscópica dos estágios sexuais dos machos e das fêmeas do berbigão *Anomalocardia brasiliana*. 53

CAPÍTULO III

Tabela 1. Microalgas utilizadas nos experimentos. 69

Tabela 2. Diferença entre o tamanho inicial e final das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* após 7 dias de larvicultura utilizando dietas unialgais e bialgais. 74

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Médias de temperatura e pH nos tanques de depuração durante o período experimental. 98

Tabela 2. Resultados da análise da redução de *Escherichia coli* na carne do berbigão *Anomalocardia brasiliana* entre os diferentes tempos de depuração para cada salinidade testada 99

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. APRESENTAÇÃO GERAL

Introdução geral.....	21
Características biológicas, taxonomia, distribuição e habitat.....	23
Alimentação de moluscos bivalves	24
Reprodução	27
Larvicultura e assentamento	28
Temperatura	29
Salinidade	30
Depuração.....	31
Objetivos	32
Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos.....	32

CAPÍTULO II. EFEITO DA TEMPERATURA E DA SALINIDADE NO CICLO REPRODUTIVO DE *Anomalocardia brasiliana* EM LABORATÓRIO

Resumo.....	35
Introdução.....	36
Material e métodos	37
Resultados	39
Discussão.....	43
Agradecimentos	46
Referências	47

CAPÍTULO III. LARVICULTURA DO MOLUSCO DE AREIA *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Resumo.....	62
Abstract	63
Introdução.....	64
Material e métodos	65
Resultados	70
Discussão.....	74
Conclusões	77

Agradecimentos	78
Referências.....	78
CAPÍTULO IV. BIOACUMULAÇÃO e DEPURAÇÃO DE Escherichia coli NO MOLUSCO DE AREIA Anomalocardia brasiliana (Gmelin, 1791) EM DIFERENTES SALINIDADES	
Resumo	85
Introdução	86
Material e métodos.....	87
Resultados	90
Discussão	92
Agradecimentos	94
Referências.....	95
CAPÍTULO V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	
Conclusões gerais.....	100
Sugestões.....	100
Referências bibliográficas da Introdução Geral	102

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Problemática e justificativa

A aquicultura no mundo continua crescendo mais rapidamente do que qualquer outro setor da produção de alimentos de origem animal nos últimos anos. De acordo com Pulvenis (2012), a produção mundial da aquicultura somou 63,6 milhões de toneladas de pescado para consumo humano em 2011, sendo deste total cerca de 10% de moluscos marinhos. Nesta produção mundial, os moluscos de areia se destacam com o maior crescimento na produção. Em 1990, a produção de moluscos de areia representava a metade da produção total de ostras, já em 2010 a produção de moluscos de areia excedeu a produção de ostras, com 4,7 milhões de toneladas (PULVENIS, 2012).

Ao longo da costa brasileira podem ser destacadas algumas espécies de moluscos de areia exploradas: *Trachycardium muricatum* (Linnaeus, 1758), sinónímia *Trachycardium manoeli* (Prado, 1993) (Rios, 2009), *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791), sinónímia *Lucina jamaicensis* (Lamarck, 1801) (Rios, 2009), *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818), *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786), sinónímia *Solen gibbus* (Spengler, 1794) e *Solen caribaeus* (Lamarck, 1818) (Rios, 2009), *Donax hanleyanus* (Philippi, 1842), *Cyrtopleura costata* (Linnaeus, 1758) e *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791).

Destas espécies citadas, o berbigão *A. brasiliana* destaca-se por sua importância social e econômica para comunidades tradicionais, principalmente, nas regiões Sul e nordeste do Brasil (SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2011). Vários estudos sobre a biologia e ecologia de *A. brasiliana* tem sido desenvolvidos ao longo do litoral brasileiro, como no litoral de Santa Catarina (PEZZUTO; ECHTERNACHT, 1999; ARAÚJO, 2001; BOEHS; MAGALHÃES, 2004), do Paraná (GUISS, 1995; BOEHS, 2000; BOEHS et al., 2004, 2008, 2010), de São Paulo (NARCHI, 1966, 1972, 1974 e 1976; HIROKI, 1977; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980; ARRUDA-SOARES et al., 1982; LEONEL et al., 1983), do Rio de Janeiro (FIGUEREDO e LAVRADO, 2007; MATTOS et al., 2008), Bahia (LUZ E BOEHS, 2011), de Pernambuco SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2009, 2011; BARLETTA e COSTA, 2009; LAVANDER et al., 2011), da Paraíba (GROTTA; LUNETTA, 1980), do Rio Grande do Norte (RODRIGUES et al. 2008), do Ceará (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2004; BARREIRA; ARAÚJO, 2005) e das Índias Ocidentais Francesas, Antilhas (MONTI et al., 1991; MOUËZA et al., 1999).

Para muitas comunidades litorâneas o berbigão é utilizado na alimentação familiar. Essa importância remonta a alguns milhares de anos, e apresentados pela abundância de conchas nos Sambaquis existentes perto dos estuários (SCHEEL-YBERT et al., 2003).

Em Santa Catarina, foi instituída em 28 de julho de 1989, pelo Decreto N° 533 de 20 de maio de 1992, a primeira reserva extrativista marinha do Brasil, para a extração do berbigão *Anomalocardia brasiliiana*, denominada Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé. Esta reserva está localizada na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, área urbana do município de Florianópolis, próxima ao aeroporto da cidade e ocupando uma área total de 1444 ha, sendo uma fonte de trabalho e renda para, aproximadamente, 100 famílias de pescadores artesanais.

Atualmente, a comercialização no Brasil de *A. brasiliiana* e de outros moluscos de areia, é baseada na extração de animais em estoques naturais. Ainda não existem dados da real quantidade desse recurso extraída por ano. Ao longo da costa brasileira a venda de berbigão ocorre em diferentes escalas, a qual está limitada à disponibilidade deste recurso nos estoques naturais. Os principais fatores que podem afetar esta disponibilidade são: fatores antropogênicos, fatores ambientais e a sobre-exploração.

Por se tratar de uma espécie essencialmente extraída do estoque natural e o grande aporte de matéria orgânica e de nutrientes nas baías, a qualidade microbiológica do animal é fundamental para o consumidor. Uma alternativa para garantir a qualidade microbiológica de bivalves é através da depuração. Processo pelo qual o animal elimina as bactérias presentes no trato digestivo (LEE et al., 2008). Até o presente momento não foram realizados estudos sobre a depuração de *A. brasiliiana*.

Outro aspecto importante sobre a exploração de *A. brasiliiana*, é apresentado por SILVA-CAVALCANTI e COSTA (2011), os quais relatam que nas últimas décadas as comunidades costeiras tradicionais tem observado uma diminuição do recurso (*A. brasiliiana*) no ambiente e uma diminuição do tamanho de captura. Neste sentido, a aquicultura de *A. brasiliiana* pode vir a ser uma alternativa à continuidade na comercialização desta espécie.

No cultivo moluscos bivalves as sementes (formas jovens) podem ser obtidas através da extração nos estoques naturais, da captura em ambiente natural e da produção em laboratório. No caso de *A. brasiliiana*, a opção mais viável para obtenção de sementes é a produção em laboratório. Contudo, para a produção em laboratório de sementes de bivalves são necessários conhecimentos e domínio sobre tecnologias de condicionamento de reprodutores, de larvicultura e de assentamento.

Estudos relacionados ao ciclo de vida de *Anomalocardia brasiliiana*, foram desenvolvidos por MOUËZA et al. (1999), os quais descrevem aspectos morfológicos do desenvolvimento embriogênico, larval e pós-larval. Contudo, pouco ainda se sabe sobre a reprodução e larvicultura em condições controladas, com destaque a alimentação, temperatura, salinidade e densidade de cultivo dessa espécie.

Neste sentido, o presente estudo visa contribuir com as tecnologias de condicionamento de reprodutores, de larvicultura e de depuração do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* em laboratório.

O desenvolvimento de tecnologias para a produção de sementes de *A. brasiliiana* contribuirá não só com a aquicultura, mas também com a exploração, através do repovoamento de áreas de extração e recuperação dos estoques naturais. Além disso, o conhecimento sobre tecnologias de depuração de *A. brasiliiana* contribuem principalmente com a segurança alimentar da população.

I.2 Revisão bibliográfica

I.2.1 Taxonomia, distribuição e habitat

Seguindo a classificação taxonômica de Rios (2009), *Anomalocardia brasiliiana* pertence:

- Filo Mollusca;
- Classe Bivalvia;
- Sub-Classe Lamellibranchia;
- Família Veneridae;
- Gênero *Anomalocardia*;
- Espécie *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791).

Anomalocardia brasiliiana é popularmente conhecida como berbigão, vôngole, mija-mija, sarnambi, sernambi pequeno, sarnambitinga, chumbinho, marisco pedra e papa-fumo (TOBIAS; SILVA 1957; NARCHI, 1972).

A distribuição geográfica dessa espécie se dá desde as Índias Ocidentais, Suriname até o Brasil e Uruguai (RIOS, 2009). No Brasil, Segundo BOEHS et al. (2008) *A. brasiliiana* é amplamente distribuído ao longo da costa, sendo encontrado em águas calmas de enseadas, baías e estuários tanto no infralitoral raso quanto nas regiões entre marés, incluindo as marismas e os baixios não vegetados, sendo pouco frequente nos manguezais. (BOEHS et al., 2008). Esse molusco de areia habita locais com águas calmas, com sedimento arenoso e,

principalmente, areno-lodoso, onde se enterra superficialmente (BOEHS et al., 2008).

HIROKI (1977) observou em condições controladas de laboratório que esse bivalve tem resistência a baixas concentrações de oxigênio e a presença de sulfeto de hidrogênio. Observações semelhantes foram descritas por BOEHS et al. (2008) no meio ambiente. Esta rusticidade de *A. brasiliiana* favorece o seu estabelecimento nas regiões entre marés, faixas de reconhecida variabilidade ambiental. NARCHI (1974) relatou que *A. brasiliiana* habita locais com pouco material em suspensão, com sedimentos formados por areias finas. A presença de sífões curtos e fundidos, com tentáculos simples, impede o estabelecimento de *A. brasiliiana* em áreas com frequente ressuspensão de sedimentos (NARCHI, 1974). Por esse motivo, *A. brasiliiana* estaria, também, ausente em regiões de turbulência e alta energia ambiental, como em praias expostas e em áreas estuarinas com fortes correntes. PEZZUTO e ECHTERNACHT (1999) relataram uma alta mortalidade de *Anomalocardia brasiliiana* em um estoque natural na Ilha de Santa Catarina, que sofreu forte impacto antrópico em função da deposição de sedimentos, provenientes de aterro. Segundo estes autores, aparentemente os animais morreram em decorrência de asfixia causada pela elevação da turbidez da água.

I.2.2 Alimentação

O processo de alimentação dos moluscos bivalves ocorre através da seleção e transporte ativo de partículas microscópicas suspensas na coluna da água, como fitoplâncton e partículas inertes que compõe o detrito, podendo ser de origem orgânica ou inorgânica (NAVARRO, 2001). Esse processo é conhecido como filtração.

Na fase planctônica dos berbigões (larvas), a captura de partículas ocorre quando a larva está movimentando-se na coluna d'água e captura as partículas em suspensão.

Os bivalves formam uma corrente de água por suas brânquias onde o alimento é coletado e levado ao sistema digestivo através do transporte ciliar. Esta remoção das partículas em suspensão na água recebe o nome de taxa de clareamento, calculada através do volume de água liberado e de suas partículas por unidade de tempo (litros/hora). Esses organismos possuem a capacidade de manter as taxas de nutrientes relativamente constantes, balanceando e controlando as taxas de ingestão, absorção de nutrientes, eliminação de pseudofeces (“pellet”

composto de partículas rejeitadas e muco protéico) e fezes (LAGREZE, 2008).

Essa resposta funcional as variações de concentração e de qualidade de alimento foram estudadas por MACDONALD et al. (1998), comparando bivalves da epifauna (vieira *Placopecten magellanicus*) e da infauna (molusco de areia *Mya arenaria*). Esses autores descrevem que com alta concentração de alimento a taxa de filtração e o bombeamento de água diminuem, a produção de pseudofezes aumenta, mantendo uma taxa de ingestão próxima ao nível máximo. Já, com baixa concentração de alimento a taxa de ingestão aumenta e se estabiliza quando as pseudofezes são produzidas, ocorrendo o enchimento do trato digestivo. Desta forma os animais conseguem manter o balanço energético. A produção de pseudofezes é um mecanismo pre-ingestivo importante porque facilita o processo de seleção de partículas, onde as partículas de baixa qualidade nutricional podem ser rejeitadas. Ambientes com alta concentração de partículas com pouca matéria orgânica disponível acarreta um maior gasto energético e conseqüentemente menor energia disponível para crescimento e reprodução (LAGREZE, 2008).

Em laboratório, a alimentação de reprodutores com dieta apropriada pode manter o índice de condição (relação do peso seco da carne e a concha vazia), encurtar o período de condicionamento e proporcionar uma maior produção de gametas (DELGADO E PEREZ-CAMACHO, 2003, CHAVES-VILLALBA et al., 2003). A qualidade nutricional e a quantidade energética incorporada aos oócitos pelos reprodutores antes da fecundação (UTTING e MILLICAN, 1997; SÜHNEL et al., 2012) estão intrinsecamente ligados à embriogênese e à sobrevivência larval até a fase de veliger, quando o aparelho digestivo já está funcional (BÄNDEL, 1988; CARRIKER, 2001).

Para as formas jovens, uma dieta diversificada de microalgas tem maior capacidade de suprir as necessidades nutricionais das larvas do que uma dieta composta por uma única espécie de microalga (HELM; LAING, 1987; THOMPSON et al., 1993). Estas diferenças estão ligadas aos ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos são componentes estruturais fundamentais para animais marinhos (DUNSTAN et al., 1994; HENDRIKS et al., 2003) e moduladores das funções da membrana (PALACIOS et al., 2005). Sua síntese em bivalves é limitada (LAING et al., 1990; CHU e GREAVES, 1991), sendo adquiridos através do alimento. Dentre os ácidos graxos essenciais, se destacam os omega-3, ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e o ácido docosahexanóico (DHA, 22:6n-3).

Em geral, algas diatomáceas têm altos níveis de EPA e algas flageladas de DHA (DUNSTAN et al., 1994). Em função dessa diferença entre os níveis de DHA e EPA nas diferentes espécies, é recomendado utilizar uma combinação de algas flageladas e diatomáceas na dieta de reprodutores (ÜTTING e MILLICAN, 1997; HELM et al., 2004).

A alimentação de larvas de moluscos pode ser considerada um fator importante, pois influencia a variabilidade do crescimento de bivalves quando comparado com a temperatura ou a salinidade (HIS et al., 1989). É importante considerar a espécie de microalga a ser fornecida, pois nem todas as espécies de microalgas são ingeridas ou digeridas pelas larvas (MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2004). Espécies do gênero *Isochrysis*, *Pavlova* e *Chaetoceros* são as mais utilizadas na alimentação de larvas de moluscos bivalves (SOUTHGATE, 2008). Contudo, existe uma grande variedade de espécies de microalgas marinhas com potencial para alimentação de larvas em condições de laboratório. As microalgas fornecem a energia e os nutrientes para síntese de tecidos necessários para o crescimento e a metamorfose larval (SOUTHGATE, 2008).

O valor nutricional das microalgas depende de fatores como nutrientes, luz, temperatura, salinidade entre outros. De acordo com as condições de cultivo, uma mesma espécie de microalga pode ter diferente valor nutricional (THOMPSON et al., 1992; THOMPSON et al., 1993; THOMPSON et al., 1996).

A concentração de microalgas é outro aspecto que pode afetar a eficiência de alimentação e, conseqüentemente, o crescimento das larvas de moluscos bivalves (GALLAGER, 1988). Altas concentrações de microalgas podem colapsar o aparato digestivo levando as larvas a um aumento das taxas de rejeição (GALLAGER, 1988) e deste modo inibir o crescimento. Outro risco é o aparecimento de outros organismos sobre as valvas das larvas que pode desencadear uma infestação bacteriana e aumento da mortalidade (TORKILDSEN et al., 2000; HELM et al., 2004; TORKILDSEN e MAGNESEN, 2004). Por outro lado, quando a concentração de alimento está muito baixa, as larvas utilizam muita energia e tempo para procurar alimento (McKENZIE e LEGGETT, 1991; BEIRAS e PEREZ-CAMACHO, 1994). Isso pode resultar em baixas taxas de crescimento e tempos prolongados para o assentamento e metamorfose (ROBERT et al., 1988; PECHENIK et al., 1990; TANG et al., 2006).

I.2.3 Reprodução

O berbigão *Anomalocardia brasiliiana* é um organismo dióico sem dimorfismo sexual. As gônadas apresentam coloração esbranquiçada quando maduras em ambos os sexos (NARCHI, 1974, 1976; GROTTA e LUNETTA, 1980). A fertilização dos gametas ocorre na água (BOEHS et al., 2008).

O ciclo reprodutivo de *A. brasiliiana* no estoque natural foi estudado na Bahia por PESO (1980), e LUZ e BOEHS (2011), no Ceará por BARREIRA e ARAÚJO (2005), em Pernambuco por LAVANDER et al. (2011), na Paraíba por GROTTA e LUNETTA (1982), no Paraná por BOEHS (2000), em Santa Catarina por ARAÚJO (2001) e em São Paulo por NARCHI (1976).

Nos moluscos bivalves o ciclo reprodutivo é regulado por fatores endógenos e exógenos, sendo a temperatura um dos principais fatores exógenos (SASTRY, 1968; BAYNE et al., 1976; MANN, 1979; NEWEL et al., 1982; MURANAKA; LANNAN, 1984; BARBER; BLAKE, 2006).

A temperatura da água afeta diretamente o desenvolvimento da gônada e o tempo de condicionamento reprodutivo (MANN, 1979; MURANAKA e LANNAN, 1984). Este aspecto tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas quantitativas para determinar o tempo e a temperatura de condicionamento para a maturação dos reprodutores. Estas técnicas estão baseadas no conceito de “temperatura acumulada efetiva”, que é calculada através da diferença acumulada entre a temperatura de manutenção e a menor temperatura teórica, onde o desenvolvimento da gônada do animal é o “zero biológico”. Esta técnica outorga uma ferramenta de manejo efetiva para indicar o tempo requerido por um reprodutor para alcançar uma condição de desova (KIKUCHI e UKI 1974; MANN, 1979).

Espécies de bivalves de clima temperado apresentam dois períodos de desova ao longo do ano, geralmente com picos entre primavera e outono (MC DONALD e THOMPSON, 1988).

Anomalocardia brasiliiana em clima tropical apresenta ciclo reprodutivo diferente de animais da mesma espécie que habitam clima subtropical. GROTTA e LUNETTA (1982), avaliando duas populações de *A. brasiliiana* uma do estado da Paraíba e outra de São Paulo, observaram que em maiores latitudes (São Paulo, clima subtropical) ocorrem picos reprodutivos e em menores (Paraíba, clima tropical) os animais desovam durante todo o ano.

Na região sudeste, NARCHI (1976), estudando animais na Baía de Santos (São Paulo), observou que o ciclo reprodutivo de *A. brasiliensis* é contínuo, com dois períodos de eliminação de gametas: um mais longo, entre os meses de agosto a novembro (primavera) e outro mais curto, de fevereiro a abril (outono), havendo ainda um período de baixa emissão de gametas, no inverno. No litoral baiano, apesar do ciclo reprodutivo de *A. brasiliensis* ser contínuo, as épocas de maior intensidade de eliminação de gametas não coincide entre as diferentes populações (PESO, 1980).

Na região sul ARAÚJO (2001) registrou, na Reserva Extrativista de Pirajubaé, em Santa Catarina, picos mais elevados de eliminação de gametas no verão e na primavera, com período de repouso bem definido no inverno. BOEHS (2000) observou na Baía de Paranaguá, Paraná, os maiores picos de eliminação de gametas também outono e primavera, não sendo identificado período de repouso reprodutivo total.

Segundo GIESE e PEARSE (1979) a reprodução de invertebrados marinhos de forma contínua ocorre onde há pouca variação dos fatores ambientais, como é o caso de regiões tropicais e locais de alta profundidade, nas diferentes estações do ano. Nestas duas situações, ocorre uma estabilidade de fatores abióticos, especialmente fotoperíodo e temperatura.

A ocorrência de desovas não sincronizadas (assincrônicas) em bivalves de regiões tropicais dificulta o processo de reprodução em laboratório, principalmente devido à eliminação indesejada de gametas. Outra dificuldade é a indução à desova, como descrito por MOUËZA et al. (1999), que testaram diferentes métodos de indução sem resultados significativos.

1.2.4 Larvicultura e assentamento

Dentro das características mais relevantes nos aspectos morfológicos da fase larval, após a fecundação, estão as fases plantígradas, desde trocófora, larva “D” e véliger até a entrada na fase bentônica, larva pedivéliger (MOUËZA et al., 1999).

MOUËZA et al. (1999) observaram que com sete dias de larvicultura as larvas de *Anomalocardia brasiliensis*, em temperatura de 24-25°C entram na fase de metamorfose, quando ocorre a regressão do velum e a diferenciação dos filamentos branquiais. Segundo esse autor, o processo de metamorfose ocorre sem interrupção ou necessidade de substrato, enquanto que para outras espécies de bivalves, é necessário

um estímulo, substrato ou condição no ambiente para provocar a transição para o estágio em que os filamentos branquiais são funcionais.

O atraso no processo de metamorfose tem sido descrito com maior frequência entre a fase pedivéliger (início fase bentônica) e a planctônica, sendo esta uma condição que provoca mortalidades em outras espécies de bivalves (BAYNE, 1965, 1976; FRENKIEL; MOUËZA, 1979; GROS et al., 1997). Nos moluscos de areia a diferenciação dos sífões é a última etapa da metamorfose.

A densidade larval é um fator fundamental que deve ser considerado, já que o crescimento e a sobrevivência podem ser afetados. Altas densidades de larvas podem dificultar a natação das mesmas e, portanto, a ingestão (tomada) de alimento. Bem como, consumir o oxigênio e aumentar a toxidez através da acumulação de dejetos metabólicos (YAN et al., 2006).

O desenvolvimento larval é inibido por altas concentrações de amônia (GEFFARD et al., 2002) e baixos níveis de oxigênio podem resultar em menores taxas de crescimento e de assentamentos prematuros (WANG e WIDDOWS, 1991). Densidades muito baixas podem não interferir no crescimento e sobrevivência, mas levam a um sub aproveitamento da capacidade instalada para produção.

I.2.5 Temperatura

A temperatura da água é um fator muito importante para os moluscos bivalves, afetando diferentes aspectos, como a fisiologia energética (NAVARRO, 2001) e a reprodução (ROMÁN et al., 2001), entre outros. A temperatura é o principal regulador da gametogênese em bivalves marinhos (BARBER e BLACKKE, 2006; SASTRY, 1968), sendo um fator primordial para o sucesso do condicionamento de reprodutores.

Anomalocardia brasiliiana é uma espécie euritérmica (SCHAEFFER-NOVELLI, 1976). Organismos euritérmicos (pecilotérmicos) estão limitados por uma tolerância térmica de aclimação; baixas temperaturas causam uma diminuição na atividade celular, principalmente devido a inativação de proteínas, enquanto altas temperaturas desnaturam as proteínas levando o animal à morte (VAN DER HAVE, 2002).

O transporte de oxigênio, a respiração, a excreção e o funcionamento dos órgãos estão correlacionados positivamente com o aumento da temperatura, dentro da faixa de tolerância de cada espécie, resultando em um incremento do custo energético do metabolismo basal

(SOMERO, 2002). Esse aumento no custo energético pode afetar o balanço energético dos moluscos bivalves, reduzindo a energia disponível para o crescimento somático, armazenamento de energia e reprodução (WIDDOWS e JOHNSON, 1988). Contudo, a alimentação e a filtração também podem aumentar com o incremento da temperatura (KITNER e RIISGARD, 2005) o que pode influenciar na quantidade de energia absorvida.

A resposta dos bivalves ao processo de condicionamento reprodutivo varia muito entre as espécies. Existem evidências de respostas variáveis entre populações da mesma espécie em diferentes zonas geográficas, como observado por IGLESIAS et al. (1996) para *Mytilus edulis* e para *Argopecten purpuratus* (AVENDAÑO e LE PENNEC, 1997).

A manipulação da temperatura da água no condicionamento de reprodutores em laboratório pode ser uma ferramenta importante para o incremento da taxa de gametogênese, como já foi observado para *Tapes philippinarum* (MANN, 1979), *Crassostrea gigas* (CHAVEZ-VILLALBA et al., 2002; FABIUUX et al., 2005; ROBINSON, 1992), *Ostrea edulis* (MANN, 1979) e *Striostrea prismatica* (ARGÜELLO-GUEVARA et al., 2013). Também pode aumentar a produção e sobrevivência larval (SANTOS et al., 1993; ROBINSON, 1992).

1.2.6 Salinidade

Anomalocardia brasiliiana é uma espécie eurihalina (SCHAEFFER-NOVELLI, 1976), contudo, a mudança brusca de salinidade pode afetar a taxa de filtração nos moluscos bivalves devido ao fechamento parcial ou total das valvas como forma de isolamento dos órgãos internos com o meio externo (SHUMWAY, 1977). Os moluscos bivalves são osmoconformadores com pouca ou nenhuma capacidade extracelular para regulação osmótica (SHUMWAY, 1977). Quando o animal continua filtrando água em uma salinidade alterada (hipersalina ou hiposalina) este precisa regular o volume celular (DEATON e PIERCE, 1994; DEATON, 2001).

Os osmoconformadores, como é o caso do berbigão *A. brasiliiana*, mantêm o volume celular através do ganho e perda de solutos inorgânicos (SHUMWAY, 1977; SOMERO e BOWLUS, 1983). Os mecanismos homeostáticos tem um alto custo energético, principalmente se combinados com uma baixa taxa de clareamento (HUTCHINSON e HAWKINS, 1992; RAJESH et al., 2001) que pode

produzir em uma redução no crescimento somático e/ou reprodutivo (NAVARRO e GONZALEZ, 1998; NAVARRO et al., 2000).

LEONEL et al. (1983), testaram com *A. brasiliiana* as salinidades de 8,5, 17, 25,5, 34, 42,5 e 51 durante um período de 29 dias e observaram que as salinidades de 8,5 e 51 apresentaram tempo letal médio de 11,5 e 20,5 dias, respectivamente. Nas demais salinidades, o berbigão sobreviveu até o 29º dia. Segundo LEONEL (1981), citado por LEONEL et al. (1983), o fechamento das valvas de *A. brasiliiana* foi evidenciado durante períodos prolongados quando os animais foram expostos a salinidades de 2, 6, 10, 14, 18, 22, 42 e 50. A resposta de fechamento das valvas em moluscos é um mecanismo que permite, temporariamente, a manutenção da hiperosmoticidade do fluido perivisceral e da hemolinfa, quando em meios diluídos (GILLES, 1972). Contudo, não se sabe como essa amplitude de salinidades afeta o ciclo reprodutivo e a depuração em condições controladas de laboratório.

I.2.7 Depuração

Uma vez que os moluscos de areia são organismos que se alimentam por filtração, como outros bivalves, podem acumular e concentrar microrganismos patogênicos presentes na água do mar.

Por habitar baías e áreas estuarinas, as condições de saúde dessa espécie são dependentes da qualidade da água do mar. Normalmente essas regiões, onde ocorrem assentamentos populacionais circundantes, estão expostas a pressões antropogênicas, as quais contribuem para o aumento da contaminação microbiológica e química nesses ecossistemas.

A presença de organismos patogênicos, como as bactérias *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp. (FORMIGA-CRUZ et al., 2003; EL-SHENAWY, 2004), vírus da hepatite A e norovírus (CROCI et al., 2007), pode representar um risco para a saúde humana e comprometer o consumo dos moluscos. Estudos com bactérias patogênicas, como *E. coli*, podem ser uma indicação da possível presença de patógenos entéricos e fornecer mais informações sobre a segurança das condições sanitárias de moluscos e do meio ambiente.

A depuração é a técnica utilizada em muitas partes do mundo para a remoção de contaminantes microbianos de moluscos. Os animais são acondicionados em tanques com água limpa, para sua atividade de bombeamento por um período de tempo, o qual varia de espécie para espécie. Esse processo é realizado para atender normas de sanidade e dar segurança de qualidade para os consumidores.

No processo de depuração devem ser provisionadas as melhores condições fisiológicas dos bivalves para aumentar a atividade de filtração ou bombeamento e maximizar a remoção dos contaminantes microbianos. Variáveis como temperatura, salinidade ou oxigênio dissolvido devem ser considerados para a eficiência desse processo.

I.3 Objetivos

I.3.1 Objetivo geral

Contribuir com os conhecimentos sobre o condicionamento, larvicultura e depuração do berbigão *Anomalocardia brasiliiana*.

I.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da temperatura, da salinidade e da dieta na maturação de reprodutores de *Anomalocardia brasiliiana* em condições de laboratório;
- Avaliar o efeito do tempo e da densidade de larvas e a dieta na sobrevivência de larvas de *A. brasiliiana*;
- Avaliar a bioacumulação e o tempo de depuração de *Escherichia coli* no molusco de areia *A. brasiliiana* (Gmelin, 1791) em diferentes salinidades em condições de laboratório.

CAPÍTULO II.
EFEITO DA TEMPERATURA E DA SALINIDADE NO CICLO
REPRODUTIVO DE *Anomalocardia brasiliana* EM
LABORATÓRIO

O artigo será enviado para publicação no periódico *Journal of Shellfish Research*, tendo sido redigido segundo as normas da referida revista científica.

Efeito da temperatura e da salinidade no ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* em laboratório

Francisco José Lagreze Squella*, Simone Sühnel, Graziela Vieira, Claudio Manoel Rodrigues de Melo

Laboratório de Moluscos Marinhos, UFSC. Beco dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, CEP 88061-600, Florianópolis, Brasil.

*Autor para correspondência: francisco_lagreze@yahoo.com.br

Título resumido: Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* em laboratório.

Resumo

Com o objetivo de contribuir sobre os conhecimentos para produção de sementes do berbigão *Anomalocardia brasiliiana*, este estudo avaliou o condicionamento de reprodutores em laboratório. Para isso, foram testados três tratamentos sobre o condicionamento dos animais, dois com a variação da temperatura de 21°C para 25°C, sendo um tratamento com salinidade 30 e o outro com 35 e, um terceiro tratamento, com variação da temperatura de 16°C para 25°C e salinidade 35. Foi avaliado o efeito dos tratamentos após 15, 30, 45 e 55 dias de condicionamento e ao iniciar o experimento no estágio sexual dos animais, através de cortes histológicos. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade de manter *A. brasiliiana* em laboratório para condicionamento, bem como foram observados animais nos 4 estágios sexuais: gametogênese, pré-desova, desova e repouso. Com a temperatura variando de 16 à 25°C foi possível controlar a ocorrência de desovas, maturar os animais e induzir à sincronia reprodutiva dos machos e das fêmeas. Observou-se, também, que não houve diferença no estágio sexual nas salinidade 30 e 35, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Palavras-chave: Berbigão; estágio sexual; reprodutores; sincronia reprodutiva.

1. Introdução

A aquicultura continua crescendo mais rapidamente do que qualquer outro setor da produção de alimentos de origem animal nos últimos anos. De acordo com Pulvenis (2012), a produção mundial da aquicultura somou 63,6 milhões de toneladas de pescado para consumo humano em 2011. Das espécies de moluscos cultivadas mundialmente, os moluscos de areia se destacam com o maior crescimento na produção. Em 1990, a produção de moluscos de areia representava a metade da produção total de ostras, já em 2010 a produção de moluscos de areia excedeu a produção de ostras, com 4,7 milhões de toneladas (Pulvenis, 2012).

No Brasil o consumo de moluscos de areia ainda é baseado na extração de animais em estoques naturais. Das espécies exploradas, o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* destaca-se por sua importância social e econômica para comunidades tradicionais na região Sul e nordeste do Brasil (Silva-Cavalcanti e Costa, 2011). O berbigão *A. brasiliiana* ocorre em regiões estuarinas desde as Índias Ocidentais, Suriname até o Brasil e Uruguai (Rios, 2009). É uma espécie euritérmica e eurihalina, apresentando grande resistência à deficiência de oxigênio (Schaeffer-Novelli, 1976) e uma ampla variedade de salinidades e temperaturas.

A comercialização de *A. brasiliiana* está limitada a disponibilidade deste recurso nos estoques naturais. Na exploração, fatores antropogênicos, como poluição das águas e fatores ambientais, como enchentes, podem afetar a disponibilidade dessa espécie de venerídeo. Neste sentido, a produção de sementes em laboratório, para o cultivo ou repovoamento de *A. brasiliiana*, é uma alternativa para garantir a comercialização desta espécie de forma sustentável.

Em revisão bibliográfica realizada, observa-se diferentes estudos relacionados à ecologia e biologia de *A. brasiliiana*. Contudo, até o presente momento pouco se sabe sobre o ciclo reprodutivo de *A. brasiliiana* em condições controladas de laboratório.

Na produção de sementes de *A. brasiliiana* em laboratório a maturação dos reprodutores é uma etapa importante para a qualidade das larvas geradas e a possibilidade de obter desovas fora da época do ciclo natural de reprodução. Fatores endógenos e exógenos controlam a maturação de moluscos, com destaque à temperatura (Sastry, 1968; Bayne et al., 1976; Mann, 1979; Newel et al., 1982; Muranaka e Lannan, 1984; Barber e Blake, 2006).

Para regiões tropicais as desovas assíncronas de bivalves dificultam o processo de reprodução em laboratório. Um dos problemas nesse processo é a ocorrência de desovas não desejadas nos tanques de maturação. Outra dificuldade é em relação à indução à desova, como descrito por Mouëza et al. (1999), que testaram diferentes métodos de indução sem resultados significativos.

Para contribuir com o conhecimento da reprodução de *A. brasiliana* em condições controladas, o presente estudo avaliou o efeito da temperatura e da salinidade no condicionamento reprodutivo desses venerídeos.

2. Material e Métodos

2.1 Local do experimento e coleta dos animais

O experimento de condicionamento reprodutivo do berbigão *A. brasiliana*, Família Veneridae, foi realizado em 2011, no Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC (LMM), Florianópolis, Brasil. Espécimes de *A. brasiliana* com $24,65 \pm 1,36$ mm de altura, medidas de acordo com Caill-Milly et al. (2012), foram coletadas a 0,5 metros de profundidade e temperatura de 18°C, na Praia da Daniela (27°27'25,40"S; 48°32'31,51"W), Florianópolis. Após a coleta os animais foram transportados em caixas térmicas, sem água, até o LMM.

2.2 Preparo dos animais e aclimação

Ao chegar ao laboratório, os animais foram lavados com água doce potável, imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaClO a 2%) por 10 minutos e, posteriormente, enxaguados com água doce potável. Após higienização os animais foram induzidos à eliminação dos gametas para padronização dos estágios de maturação e evitar a ocorrência de desovas inesperadas durante o período experimental.

A técnica de eliminação dos gametas consistiu na exposição ao ar e ao estresse térmico. Resumidamente, os animais foram expostos ao ar (por 2 horas), colocados em sacos de malha (0,5 mm) e acondicionados em tanques de desova com água salgada (filtrada a 1 µm e tratada com UV) a temperatura de 18°C e salinidade de 35. Após 10 minutos, a temperatura da água salgada nos tanques foi elevada para 24°C e os animais mantidos nessa temperatura *overnight*. No dia seguinte, os animais foram transferidos para os tanques do experimento e a temperatura e salinidade ajustadas gradativamente, durante 24 horas, até o valor de cada tratamento. Após atingir o valor desejado para cada tratamento, os animais foram aclimatados por mais 24 horas para então iniciar o experimento (D0).

2.3 Experimento de condicionamento reprodutivo

O experimento teve duração de 55 dias. Utilizou-se água salgada filtrada a 1 μm . Foram utilizados 3 tratamentos, como segue: Tratamento T21-25/S30 - salinidade de 30, temperatura da água salgada inicial de 21°C e após 10 dias constante em 25°C; Tratamento T21-25/S35 - salinidade de 35, temperatura da água salgada inicial de 21°C e após 10 dias constante em 25°C; e Tratamento T16-25/S35 - salinidade de 35, temperatura da água salgada de 16°C por 10 dias, subindo gradativamente (0,5°C.dia⁻¹, durante 40 dias) até 25°C e mantendo-se constante em 25°C até o término do experimento.

Para cada tratamento utilizou-se um sistema de circulação fechada contendo 8 tanques de 10 L cada (unidades experimentais), com dreno central, 1 reservatório de decantação (100 L), 1 reservatório de bombeamento (100 L) e 1 reservatório de alimento (200 L). No fundo de cada tanque foi instalada uma grade plástica para manter os animais suspensos evitando contato dos mesmos com suas fezes e pseudofezes. Para o auxílio do controle da temperatura foi utilizado um resfriador de água (1/2HP) e um aquecedor elétrico de titânio acoplados a termostatos digitais de 500W. Em cada tanque (unidade experimental) foram acondicionados 50 animais mantidos com aeração constante e renovação de 200% por hora (330 mL.min⁻¹) de água contendo o alimento. A cada 24 horas os reservatórios de alimento, decantação e bombeamento foram limpos e completados novamente com as salinidades de cada tratamento. O sistema era religado somente após atingir a temperatura de cada tratamento. A cada 15 dias os tanques com os animais foram limpos (lavados com água doce potável).

A dieta utilizada no experimento foi composta por duas microalgas: *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) e *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898), na proporção 1:1. Essa dieta foi selecionada devido ao balanço no perfil de ácidos graxos, baseado no trabalho desenvolvido por Sühnel et al. (2012).

As microalgas foram cultivadas no LMM com meio F2 (Guillard, 1975), modificado com silicato, e coletadas na fase exponencial de crescimento. A taxa de alimentação 1,5-4,0% da biomassa (Helm et al., 2004), fornecida diariamente, foi calculada com base no peso seco da carne do berbigão. Essa taxa foi ajustada de acordo com o consumo de microalgas, fazendo contagens diárias de microalgas na água do reservatório de bombeamento.

2.4 Amostragem

Durante o período experimental cada tanque foi diariamente sifonado, registrada a temperatura da água e a mortalidade dos animais. Para avaliar o efeito da salinidade e da temperatura foi acompanhado microscopicamente o estágio sexual dos animais. Foram realizadas amostragens ($n=24$) ao iniciar o experimento (D0) e, posteriormente, quinzenais (D15, D30, D45) de cada tratamento e uma última amostragem no 55º dia (D55).

Para acompanhar o estágio sexual dos animais no ambiente natural durante o período do experimento, paralelamente, a cada amostragem (D0, D15, D30, D45 e D55), foram realizadas coletas de animais ($n=24$) com tamanho médio de $24,62 \pm 1,25$ mm de altura (Caill-Milly et al., 2012), no estoque natural localizado na Praia da Daniela ($27^{\circ}27'25,40''S$; $48^{\circ}32'31,51''W$). Os animais foram coletados a 0,5 metros de profundidade e registrada a temperatura da água no local de coleta.

2.5 Análise histológica

Para a análise histológica dos três tratamentos testados e do ambiente foi realizando corte transversal (2mm) de cada animal amostrado (Howard e Smith, 1983) e submetido a procedimento histológico padrão (Sühnel et al., 2010) com fixador de Davidson e hematoxilina de Harris e eosina (HHE). Na avaliação das lâminas foi registrado o sexo e identificado o estágio sexual de cada animal. Para avaliação do estágio sexual (machos e fêmeas), foram utilizados 4 estágios seguindo modelo desenvolvido por Sühnel et al. (2010) para *Nodipecten nodosus*, como segue: gametogênese; pré-desova; desova e repouso.

2.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o pacote computacional SAS® (Sas, 2003). Os dados de alimentação foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e teste de separação de médias Tukey. O estágio sexual dos animais (dados histológicos) foram comparados usando t-test com permutação (teste não paramétrico) utilizando a *proc multtest* (Westfall et al., 1999) do pacote computacional SAS®.

3. Resultados

Após 55 dias de experimento a mortalidade total por tratamento foi baixa, com 6 animais (1,5%) no tratamento T21-25/S35, seguido de

3 animais (0,75%) do tratamento T21-25/S30 e com 1 animal morto no tratamento T16-25/S35 (0,25%).

O consumo de microalgas nos tratamentos T21-25/S30 e T21-25/S35 foi homogêneo durante todo o período experimental, sendo a taxa de alimentação de $3,68 \pm 0,47\%$ e $3,68 \pm 0,48\%$ do peso seco da carne, respectivamente. Já no tratamento T16-25/S35, registrou-se menor consumo de microalgas nos primeiros 22 dias, sendo a taxa de alimentação de $1,59 \pm 0,43\%$ do peso seco da carne, significativamente diferente ($p < 0,05$) do consumo nos 33 dias restantes ($3,95 \pm 0,22\%$).

3.1. Temperatura da água salgada nos tanques

Para os tratamentos T21-25/S30 e T21-25/S35 a temperatura nos primeiros 10 dias de experimento foi de $22,61 \pm 1,48^\circ\text{C}$ e $22,62 \pm 1,43^\circ\text{C}$, respectivamente e, para os 45 dias restantes, de $24,80 \pm 0,57^\circ\text{C}$ e $24,81 \pm 0,64^\circ\text{C}$, respectivamente. Já para o tratamento T16-25/S35, a temperatura nos primeiros 10 dias foi de $16,13 \pm 0,31^\circ\text{C}$, elevando gradativamente (aproximadamente $0,5^\circ\text{C}$ por dia) para 25°C nos 45 dias restantes (Figura 1). A temperatura da água no meio ambiente, durante o período do experimento, variou de $19,30^\circ\text{C}$ no início do período experimental a $23,97^\circ\text{C}$ no 55º dia (D55) (Figura 1).

[Figura 1]

3.2. Análise histológica

Neste estudo 472 animais foram analisados na histologia. Na avaliação do tecido gonadal dos animais, a proporção sexual de machos e fêmeas (M:F) observada foi de 1,48:1 (55,51% e 37,50%, respectivamente) e 6,99% dos animais foram indiferenciados.

Na avaliação histológica dos machos de *A. brasiliiana* (Figuras 2 a 5) observaram-se espécimes nos quatro estágios sexuais, gametogêneses, pré-desova, desova e repouso (Tabela 1).

[Tabela 1]

Na avaliação histológica das fêmeas de *A. brasiliiana* (Figuras 6 a 9), também, observaram-se espécimes nos quatro estágios sexuais (Tabela 1).

[Figuras 2-5]

[Figuras 6-9]

Em alguns espécimes foi observado, na região da gônada, somente tecido conjuntivo e alguns pontos com tecido germinativo evidente (parede do folículo) sem a presença de células germinativa, não sendo possível a determinação do sexo do animal, sendo o sexo indiferenciado (indeterminado).

Durante a avaliação microscópica, observou-se a presença do parasita *Bucephalus* sp. em um espécime (tratamento T16-25/S35), com elevada infestação, causando destruição dos folículos (castração do animal) e impossibilitando a identificação do sexo (Figura 10). Um metazoário não identificado, com prevalência de 2,5% do total de animais analisados, foi observado infectando as brânquias de *Anomalocardia brasiliiana*, nos 3 tratamentos e nos animais do ambiente (Figura 11). Foi observada infiltração hemocitária no tecido conjuntivo em 58,3% dos berbigões parasitados por este metazoário não identificado.

[Figuras 10 e 11]

3.3. Estágio sexual: tratamentos T21-25/S30, T21-25/S35, T16-25/S35 e meio ambiente

Avaliando o estágio sexual dos machos de *A. brasiliiana* no tratamento T21-25/S30 (Figura 12), a maioria dos animais estava em estágio de desova (76,92%) antes de iniciar o experimento (D0), não diferente de D15, D45 e D55 e, significativamente, diferente ($p < 0,05$) de D30. Após 15 dias de maturação (D15), os machos não apresentaram diferença significativa com D30, D45 e D55, estando 50% dos animais em estágio de pré-desova. Bem como, com 30 dias (D30) os machos, na sua maioria, estavam em estágio de pré-desova (93,75%), não diferente de D45 e de D55. Com 45 dias (D45) observou-se início de eliminação de gametas (42,86% dos machos) não diferente de D55, onde 63,64% dos machos também estavam em estágio de desova.

No tratamento T21-25/S35, não foi observada diferença significativa nos estágios reprodutivos entre os tempos amostrados, estando a maioria dos machos, ao iniciar o experimento (D0), em estágio de desova (57,89%). Os machos mantiveram esse estágio até o final do experimento, com 78,57% (D15), 45,45% (D30), 80% (D45) e 66,67% (D55). A maior quantidade de machos em estágio de pré-desova foi observada em D30 (45,45%).

No tratamento T16-25/S35, a maior parte dos machos manteve o estágio de desova em D0 e D15, sem diferença significativa entre si, com 55,56% e 53,85% respectivamente, mas ambos (D0 e D15)

diferentes ($p < 0,01$) de D30, D45 e D55. Com 30 dias de experimento (D30) observou-se maturação dos machos, com 40% em estágio de gametogênese e 40% em estágio de pré-desova, não diferente significativamente de D45 e D55. O estágio de pré-desova manteve-se na maioria dos machos em D45 e D55, sem diferença significativa entre si, com 68,75% e 93,33%, respectivamente.

No meio ambiente, durante o período experimental, não foi observada diferença significativa entre os tempos amostrados, estando a maior parte dos machos em estágio de desova, com 55,56% em D0. Após 15 dias (D15, com temperatura da água do mar de 21,29°C) 41,67% dos machos estavam em estágio de pré-desova e 41,67% de desova. Mantendo-se esses estágios para D30 (22,52°C), com 35,71% (pré-desova) e 42,86% (desova). No final do período experimental, em D45 (21,04°C) e D55 (23,97°C), a maioria dos machos estava em estágio de desova (78,57% e 85,71%, respectivamente).

[Figura 12] e [Figura 13]

Avaliando o estágio sexual das fêmeas de *A. brasiliiana* durante o período experimental (Figura 13), No tratamento T21-25/S30, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre D0 e D45 e D55, com 50% das fêmeas estavam em estágio de desova e 50% em repouso em D0. Com 15 dias de experimento (D15), observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a D45, estando 41,67% das fêmeas em estágio de gametogênese e o restante em estágio de repouso. Após 30 dias (D30) observou-se início de desova (28,57%) com o restante das fêmeas em estágio de pré-desova 42,86% e repouso (28,57%), não diferente significativamente dos demais tempos testados (D0, D15, D45 e D55). Após 45 dias (D45), 42,86% das fêmeas estavam em estágio de pré-desova e o restante em gametogênese e desova, não diferindo significativamente de D55. Já em D55, a maioria das fêmeas estava em estágio de desova (40%).

No tratamento T21-25/S35, não foi observada diferença significativa dos estágios reprodutivos entre os tempos D0, D15, D30 e D45. Em D0 e D15 a maioria das fêmeas se manteve em repouso, com 75% (D0) e 55,56% (D15) respectivamente, estando o restante em estágio de desova, com 25% (D0) e 44,44% (D15). Com 30 dias de condicionamento (D30), foi observada uma leve maturação das fêmeas, com 14,29% em pré-desova. Contudo, nesse mesmo tempo (D30), a maioria das fêmeas estava em estágio de desova (57,14%). Com 45 dias de condicionamento (D45), foram observadas fêmeas em todos os estágios

sexuais, com 12,50% em gametogêneses, 25% em pré-desova, 25,00% em desova e 37,50% em repouso. Já aos 55 dias de experimento (D55) os estágios reprodutivos foram diferentes significativamente dos demais estágios nos tempos testados (D0, D15, D30 e D45), com a maioria das fêmeas em estágio de pré-desova (76,47%).

No tratamento T16-25/S35, os tempos D0 e D15, não diferiram entre si, mas foram significativamente diferente ($p < 0,05$) de D30, D45 e D55. Em D0 e D15, a maioria das fêmeas estavam em estágio de repouso, com 70 e 88,89%, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre D30, D45 e D55. Após 30 dias de experimento, observou-se início de gametogêneses em 42,86% das fêmeas e uma maior porcentagem de fêmeas em pré-desova após 45 e 55 dias (D45 e D55), com 62,50 e 75%, respectivamente.

No ambiente, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) dos estágios reprodutivos entre os tempos D0 e D15, com 87,50% das fêmeas em estágio de repouso no tempo D0. Na amostragem realizada em D15, a maioria das fêmeas estava em estágio de desova (45,45%), sem diferença significativa com os estágios reprodutivos nos demais tempos testados (D30, D45 e D55). Já em D45, 40% das fêmeas estavam em estágio de desova e 40% em estágio de repouso e em D55 em estágio de repouso (57,14%), ambos sem diferença significativa entre si.

Avaliando o estágio sexual dos machos coletados no meio ambiente em cada tempo amostrado, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) em D15 com o tratamento T16-25/S35, em D30 com T21-25/S30 e T16-25/S35 e em D45 e D55 com T16-25/S35. Avaliando as fêmeas no ambiente, foi observada diferença significativa nos estágios reprodutivos ($p < 0,05$) em D15 e D45 com o tratamento T16-25/S35 e em D55 com T21-25/S30, T21-25/S35 e T16-25/S35.

Avaliando o efeito da salinidade no estágio sexual entre os tratamentos T21-25/S30 e T21-25-S35, em cada tempo amostrado (D0, D15, D30, D45 e D55), não foi observada diferença significativa tanto para os machos quanto para as fêmeas. Já, avaliando o efeito das temperaturas testadas, com variação de 21 à 25°C (T21-25/S35) e de 16 à 25°C (T16-25/S35) foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos estágios reprodutivos no tempo D45.

4. Discussão

Indivíduos de *A. brasiliiana* utilizados no presente estudo apresentaram uma relação de machos para fêmeas semelhante aos

resultados obtidos por Boehs et al. (2008), com proporções de machos e fêmeas (M:F) variando de 1,15:1 a 1,61:1.

No presente estudo, os animais coletados no estoque natural em D45, a qual foi realizada na época da primavera, mostraram uma maior porcentagem em estágio de desova. Esses dados corroboram com os obtidos por Araújo (2001), que observou em populações de *A. brasiliana*, do estoque natural na região sul do Brasil (Florianópolis/SC), picos reprodutivos na primavera e no outono.

Anomalocardia brasiliana em clima tropical apresenta ciclo reprodutivo diferente de animais da mesma espécie que habitam clima sub-tropical no Brasil. Contudo, no estudo realizado por Grotta e Lunetta (1982) onde foram avaliadas duas populações de *A. brasiliana*, uma da Paraíba e outra do estado de São Paulo, foi observado que em maiores latitudes (São Paulo) ocorrem picos reprodutivos e, em menores (Paraíba) os animais desovam durante todo o ano. Segundo Giese e Pearse (1974), para moluscos a reprodução de forma contínua ocorre onde há pouca variação dos fatores ambientais, como é o caso de regiões tropicais. Nesses ambientes os bivalves utilizam o excesso de energia para reprodução, ocorrendo vários picos reprodutivos ao longo do ano.

Em regiões temperadas os bivalves são submetidos a forte variação de temperatura e de disponibilidade de alimento ao longo do ano, de tal forma que a reprodução é sazonal, com um a dois picos reprodutivos por ano (Helm et al., 2004), geralmente, com picos entre primavera e outono.

A temperatura e a disponibilidade de alimento são os principais fatores que afetam a reprodução de moluscos bivalves. O efeito dessas variáveis é complexo e depende especificamente do ganho e gasto energético no ambiente natural (Bayne e Newell, 1983). A maturação gonadal dos moluscos é um processo que requer um alto gasto energético (Barber e Blake, 1991).

A temperatura é o principal fator que influencia a gametogênese em bivalves marinhos (Barber e Blake, 2006). Em *A. brasiliana* foi observado por Araújo (2001) um aumento da gametogênese com o aumento da temperatura na região sul do Brasil, onde as temperaturas da água variam de 16 a 30°C ao longo do ano (Suplicy et al., 2003). Com a variação da temperatura de 9°C, no tratamento T16-25/S35, foi observada uma sincronia reprodutiva. Essa sincronia reprodutiva não foi observada nos animais coletados no estoque natural e nos outros dois tratamentos, onde a variação da temperatura foi menor (4°C).

A redução no consumo de alimento observada nos animais no tratamento T16-25/S35 pode estar relacionada com baixa temperatura e

a sua influência na taxa de filtração. Segundo Kittner e Riisgard (2005) a temperatura e a taxa de filtração em bivalves apresenta uma relação linear positiva dentro do intervalo de tolerância de cada espécie. Este fato foi observado no tratamento T16-25/S35, onde o consumo de microalgas foi maior após a temperatura de 18°C.

A salinidade também pode afetar significativamente o desenvolvimento reprodutivo nos moluscos bivalves. Uma salinidade inapropriada produz o fechamento das valvas como resposta típica para o isolamento dos órgãos internos de um ambiente hiposalino ou hipersalino (Shumway, 1977; Elston et al., 2003). Esse fechamento das valvas de *A. brasiliiana* foi observado por Leonel (1981) durante períodos prolongados quando os animais foram expostos à salinidades de 2, 6, 10, 14, 18, 22, 42 e 50.

Quando ocorre aclimação a uma determinada salinidade (dentro do admissível para cada espécie) ocorre um gasto energético para a manutenção do volume celular através do ganho ou perda de solutos inorgânicos (Shumway, 1977; Shumway e Youngson, 1979).

Em baixas salinidades, o aumento da demanda metabólica pode se transformar em um déficit energético, principalmente quando combinado com a diminuição da taxa de clareamento (Rajesh et al., 2001). Um déficit energético pode acarretar uma diminuição no crescimento somático ou reprodutivo (Navarro et al., 2000). No caso de *A. brasiliiana* as salinidades testadas no presente estudo não afetaram o ciclo reprodutivo quando testadas nas mesmas condições de temperatura. Estas salinidades estão dentro da faixa sugerida por Leonel et al. (1983), onde *A. brasiliiana* suporta, durante 29 dias, uma variação de salinidade entre 17 e 42. Leonel et al. (1983) também observaram que nas salinidades extremas de 8,5 e 51, o tempo de sobrevivência é menor, 11,5 e 20,5 dias, respectivamente.

Outro aspecto importante no condicionamento bivalves de clima tropical, em condições de laboratório, é a ocorrência de desovas espontâneas. No presente estudo, através da variação da temperatura realizada no tratamento T16-25/S35, foi possível controlar a ocorrência de desovas e maturar os animais. Desta forma, com o controle da ocorrência de desovas pode facilitar o planejamento de desovas para a produção de sementes do berbigão ao longo do ano.

A produção de sementes de *A. brasiliiana* em laboratório além de ser importante para aquicultura é fundamental para viabilizar a realização de estudos sobre o repovoamento dessa espécie, fazendo melhor uso desse recurso natural. Futuros trabalhos devem ser desenvolvidos para testar o controle da temperatura no condicionamento

reprodutivo de animais em distintas zonas geográficas do Brasil onde esta espécie ocorre naturalmente.

5. Conclusão

O condicionamento reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* utilizando o regime de temperatura variando de 16 e 25 °C mostrou ser efetivo para evitar ocorrência de desovas durante o período experimental. Também demonstrou a possibilidade de controlar o ciclo reprodutivo. As salinidades de 30 e 35 não diferiram entre sim nos estágios sexuais.

6. Agradecimentos

Agradecemos à CAPES/UFSC pelo suporte financeiro e bolsa de doutorado. Ao Ministério de Pesca e Aquicultura pelo suporte financeiro através do projeto “Gente da Maré” (Termo de Convênio 056/2008). Ao CNPq pelo apoio financeiro (Processo 477309/2011-9) e pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa ao último autor. Ao Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola do Departamento de Aquicultura (UFSC), onde foram realizadas as análises histológicas.

7. Referências

- Araújo, C. M. 2001. Biologia Reprodutiva do Berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin,1769) (Molusca, Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha de Pirajubaé. Tese de doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 204 pp.
- Barber, B. J. & N. L. Blake. 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S. E., editor. *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Amsterdam, Netherland: Elsevier, pp. 377-409.
- Barber, B. J. & N. L. Blake. 2006. Reproductive physiology. In: Shumway, S. E. and G. J. Parsons, editors. *Scallops: biology, ecology and aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science 35*. New York, USA: Elsevier Sciences. pp. 357-416.
- Barletta, M. & M. Costa. 2009. Living and non-living resources exploitation in tropical semi-arid estuaries. *J. Coastal Res.* 56:371-375.
- Barreira, C. A. R. & M. L. R. Araújo. 2005. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. *B. Inst. Pesca* 31(1):9-20.
- Bayne, B. L., R. J. Thompson & J. Widdows. 1976. *Physiology: I*. Bayne, B. L., editor. *Marine mussels: their ecology and physiology*. London, UK: London Cambridge University Press. 506 pp.
- Bayne, B. L. & R. C. Newell. 1983. Physiological energetic of marine mollusks. In: A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur, editors. *The mollusca. Physiology 1*. New York, USA: Academic Press. pp. 407-515.
- Boehs, G. 2000. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Curitiba. PhD diss., UFPR. 201 p.
- Boehs, G. & A. R. M. Magalhães. 2004. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 21(4):865-869.

Boehs, G., T. M. Absher & A. Cruz-Kaled. 2004. Composition and distribution of benthic mollusc on intertidal flats of Paranaguá Bay (Paraná, Brazil). *Sci. Mar.* 68:537-543.

Boehs, G., T. M. Absher, & A. C. Cruz-Kaled. 2008. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia:Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *B. Inst. Pesca.* 34(2):259-270.

Boehs, G., A. Villalba, L. O. Ceuta & J. R. Luz. 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira in river Ihéus, Bahia, Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 103(1):43-47.

Caill-Milly, N., N. Noëlle Bru, K. Mahé, C. Borie & F. D'Amico. 2012. Shell shape analysis and spatial allometry patterns of manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in a mesotidal Coastal Lagoon. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 2012:1-11.

Elston, R. A., D. P. Cheney, B. F MacDonald & A. D Suhrbier. 2003. Tolerance and response of Manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) to low salinity. *J. Shellfish Res.* 22:667-674.

Figueredo, M. I. S & H. P. Lavrado. 2007. Estrutura populacional de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca Bivalvia) em uma lagoa hipersalina na Lagoa de Araruama, RJ, Brasil. XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar, Florianópolis.

Giese, A. C. & J. S. Pearse. 1974. Introduction: General Principles the Reproduction of marine Invertebrates. In: Giese, A. C. & Pearse, J. S. (ed). New York, Academic Press, v. 1, pp 1-49.

Grotta, M., & J. E. Lunetta. 1980. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca – Bivalvia) do litoral do Estado da Paraíba. *Rev. Nordest. Biol.* 3:5-55.

Grotta, M., & J. E. Lunetta. 1982. Reproductive physiological variation of *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca – Bivalvia) in Different Latitudes. *Rev. Nordest. Biol.* 5(1):21-28.

Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.

Guis, C. 1995. Influência da Gramínea *Spartina alterniflora* (Loiseleur, 1807) sobre a distribuição e densidade do bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791). Master diss., UFPR. 73 pp

Helm, M. M., N. Bourne & A. Lovatelli. 2004. Hatchery Culture of Bivalves. A Practical Manual. FAO Fisheries Technical Paper No. 471. FAO: Rome. 177 pp

Howard D. W. & C. S. Smith. 1983. Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks. USA: NOAA National Oceanic and Atmospheric Administration. 97 pp

Kittner, C. & H. U. Riisgard. 2005. Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 305:147–152.

Lavander, H. D., L. O. C Júnior, R. L. Oliveira, S. R. S. Neto, A. O. Galvez & S. R. M. Peixoto. 2011. Biologia reprodutiva da *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) no litoral norte de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(2):344-350.

Leonel, R. M. V., A. R. M. Magalhães & J. E. Lunneta. 1983. Sobrevivência de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), em diferentes salinidades. *Boletim de Fisiologia da USP* 7:63-72.

Luz J. R. & G. Boehs. 2011. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. *Braz. J. Biol.* 71(3):679-686.

MANN, R. 1979. Some biological and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 59:95–110.

Mattos, G., R. S. Cardoso, & C. H. S. Caetano. 2008. Dinâmica populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791)

(Bivalvia: Veneridae) na praia das Fleixeiras, Ilha de Itacuruça, Rio de Janeiro- Resultados preliminares. III Congresso Brasileiro de Oceanografia-CBO 2008, I Congresso Ibéro-Americano de Oceanografia, Fortaleza (CE), 20 a 24 de maio de 2008.

Monti, C. D., L. Frenkiel, & M. Mouëza. 1991. Demography and growth of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Bivalvia, Veneridae) in a mangrove, in Guadeloupe (French West Indies). *J. Moll. Stud.* 57:249-257.

Mouëza, M., L. Frenkiel & D. Monti. 1988. Reproduction et Dynamique des population des mollusques bivalves d'interet commercial en Guadalupe: *Anomalocardia brasiliiana* Gmelin et *Lucina pectinata* Gmelin. Rapport Action Concertée Oceanologie Commission Codert, MRT, 66 pp

Mouëza, M., O. Gros & L. Frenkiel. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). *J. Moll. Stud.* 65:73-88.

Mnaka, M. S. & J. E. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39:217-228.

Narchi, W. 1974. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. *Papéis Avulsos Zool.* 27:235-262.

Narchi, W. 1976. Ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca Bivalvia). *Bol. Zool. Univ. São Paulo* 1:331-350.

Navarro, J. M., G. E. Leiva, G. Martinez & C. Aguilera. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth in the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247:67-83.

Nelder J. A. & R. W. M. Wedderburn. 1972. Generalized linear model. *J. R. Stat. Soc.* 135:370-384.

Newell, R. I. E., Hilbish, T. J., Koehn, R. K., Newell, C. J. 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L.

(Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Biol. Bull* 162:299–310.

Pezzuto, P. R. & A. M. Echternacht. 1999. Avaliação de impactos da construção da Via Expressa SC-Sul sobre o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Pelecypoda) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (Florianópolis, SC – Brasil). *Atlântica*, Rio Grande, 21:105-119.

Pulvenis, J.F. 2012. Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Rome. Updated 9 July 2012. (Access in February: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>).

Rajesh, K. V., K. S. Mohamed & V. Kripa. 2001. Influence of algal cell concentration, salinity and body size on the filtration and ingestion rates of cultivable Indian bivalves. *Ind. J. Mar. Sci.* 30:87–92.

Rios, E. C. 2009. Compendium of Brazilian sea shells. Rio Grande, RS: Evangraf. 676 p.

Rodrigues, A. M., A. O. Marques, R. T. V. Fernandes, & G. H. Henry-Silva. 2008. Distribuição e abundância do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) nas praias da região estuarina do rio Apodi/Mossoró/RN. III Congresso Brasileiro de Oceanografia-CBO 2008, I Congresso Ibéro-Americano de Oceanografia, Fortaleza, 20 a 24 de maio de 2008.

SAS. 2003. Institute Inc. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Sastry, A. N. 1968. The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41:44–53.

Schaeffer-Novelli, Y. 1976. Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791). (Mollusca: Bivalvia), na Praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 119 p.

Shumway, S. E. 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Mar. Biol.* 41:153-177.

Shumway, S. E. & A. Youngson. 1979. The effects of fluctuating salinity on the physiology of *Modiolus demissus* (Dillwyn). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 40:167-181.

Silva-Cavalcanti, J. S. & M. Costa. 2009. Fisheries in Protected and Non-Protected areas: What is the difference? The case of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1971) (Mollusca: Bivalvia) at tropical estuaries of Northeast Brazil. *J. Coast. Res.* 56:1454-1458.

Silva-cavalcanti, J. & M. F.Costa. 2011. Fisheries of *Anomalocardia brasiliiana* in Tropical Estuaries. *Pan-Am. J. Aq. Sci.* 6:86-99.

Sühnel, S., F. Lagreze, M. Bercht, J. F. Ferreira, A. L. C. Schaefer, A. R. M. Magalhães & M. Maraschin. 2010. Sexual stages of the female portion in the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758) and astaxanthin quantity in each stage. *Braz. J. Biol.* 70:651-658.

Sühnel, S., F. Lagreze, G. Zanette, A. R. M Magalhães & F. F Ferreira. 2012. Effect of the fatty acid EPA e DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). *Aquac.* 330-333: 167-171.

Suplicy, F. M., J. F. Schmitt, N. A. Moltschaniwskyj & Ferreira, J. F. 2003. Modelling of filter -feeding behavior in the brown mussel *Perna perna* (L) exposed to natural variations of weston availability in Santa Catarina, Brazil. *J. Shellf. Res. Estados Unidos.* 22:125-134.

Trider D.J. & Castell J.D. 1980. Influence of neutral lipid on seasonal variation of total lipid in oysters, *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellf. Assoc.* 70:112-118.

Westfall, P. H., T. D. Randall, R. Dror, R. D. Wolfinger & Y. Hochberg. 1999. Multiple comparisons and multiple test using SAS[®]. Cary, USA: Sas Institute Inc. 644 p.

Tabela 1. Descrição microscópica dos estágios sexuais dos machos e das fêmeas do berbigão *Anomalocardia brasiliana*.

Nome	Abreviação	Fêmeas	Machos
Gametogênese	GA	Presença de diferentes linhagens de células germinativas (oogônias) junto à parede do folículo; Presença de poucos oócitos, aderidos ou não, na parede do folículo; oócitos em diferentes tamanhos; aspecto heterogêneo. Presença de tecido conjuntivo inter e intrafolicular evidente; parede do folículo mais espessa; com espaços intrafoliculares.	Presença de diferentes linhagens de células germinativas (espermatogônias, espermatócitos) junto à parede do folículo; poucas espermátides e espermatozóides no folículo. Parede do folículo mais espessa; com espaços intrafoliculares; Tecido conjuntivo inter e intrafolicular evidente.
Pré-desova	PS	Na fase inicial, oócitos presentes tanto na parede quanto no lúmen do folículo; presença de oócitos com formato arredondado; ainda pode ocorrer presença de células germinativas; pouco ou nenhum tecido conjuntivo inter e intrafolicular. Na fase avançada, os folículos estavam distendidos e repletos de oócitos; muitos folículos; gonoduto (canais genitais) vazio; pouco ou nenhum tecido conjuntivo inter e intrafolicular; sem espaços interfolicular e intrafoliculares; com qualquer estímulo ou corte já há liberação de gametas.	Na fase inicial, presença de espermatozóides intrafolicular sem ou com flagelo eosinófilos evidentes na direção do lúmen do folículo; ainda pode ocorrer presença de células germinativas; Pouco ou nenhum tecido conjuntivo inter e intrafolicular. Na fase avançada, muitos folículos; folículos repletos de gametas; gonoduto vazio; pouco ou nenhum tecido conjuntivo inter e intrafolicular; sem espaços inter e intrafoliculares. Com qualquer estímulo ou corte já há liberação de gametas.

Desova	SP	<p>Na fase inicial, presença de oócitos nos folículos; paredes dos folículos reconhecíveis; espaços intrafoliculares junto à parede e lúmen do folículo; pode haver presença de gametas nos gonodutos.</p> <p>Na fase avançada, presença de poucos oócitos no lúmen do folículo; com espaços interfoliculares; folículo com formato irregular, devido à recente desova; pode-se observar folículo parcialmente vazio, com oócitos remanescentes.</p> <p>Pode-se observar presença de hemócitos fazendo a fagocitose dos oócitos remanescentes.</p>	<p>Na fase inicial, presença de espermatozóides nos folículos; paredes dos folículos reconhecíveis; espaços intrafoliculares junto à parede e lúmen do folículo; pode haver presença de gametas nos gonodutos.</p> <p>Na fase avançada, poucos espermatozóides no lúmen do folículo ou folículo parcialmente vazio, com espermatozóides remanescentes; folículo com formato irregular, devido à recente desova; com espaços inter e intrafoliculares.</p> <p>Pode-se observar presença de hemócitos fazendo a fagocitose dos espermatozóides remanescentes.</p>
Repouso	RE	<p>Poucos ou nenhum oócito remanescente.</p> <p>Poucos folículos; folículos remanescentes colapsados e com pequeno diâmetro; muito tecido conjuntivo inter e intrafolicular.</p>	<p>Poucos ou nenhum espermatozóide remanescente.</p> <p>Poucos folículos; folículos remanescentes colapsados e com pequeno diâmetro; muito tecido conjuntivo inter e intrafolicular.</p>

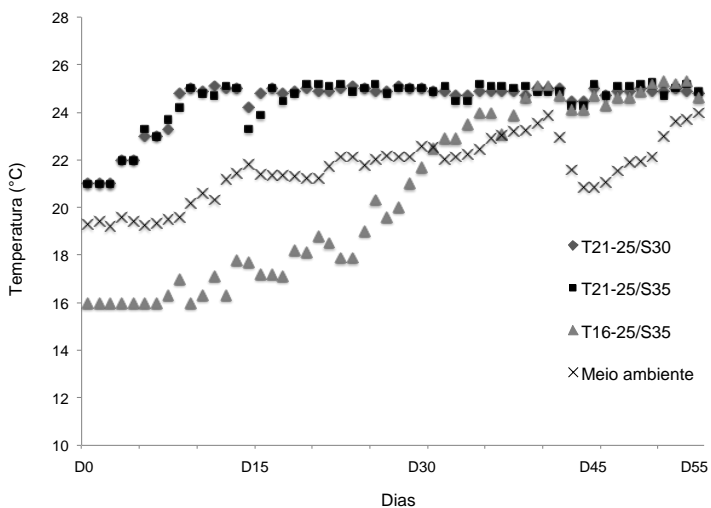


Figura 1. Temperatura diária registrada durante os 55 dias de experimento nos tanques de maturação (tratamentos T21-25/S30, T21-25/S35 e T16-25/S35) no laboratório e no meio ambiente (Praia da Daniela, Florianópolis, Brasil).

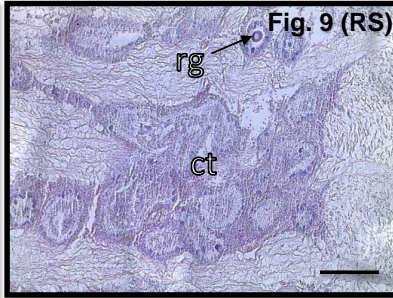
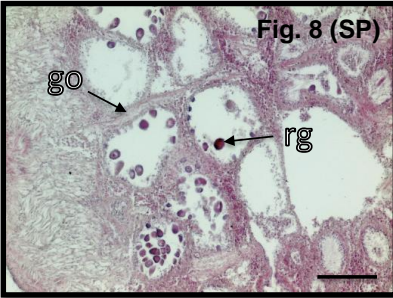
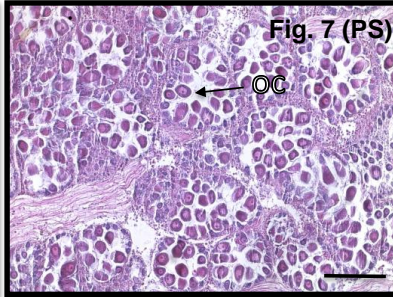
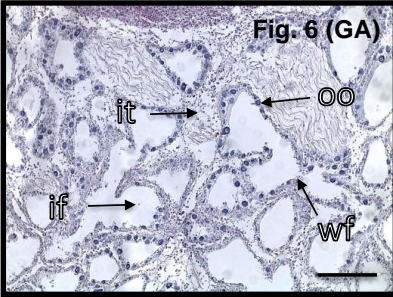
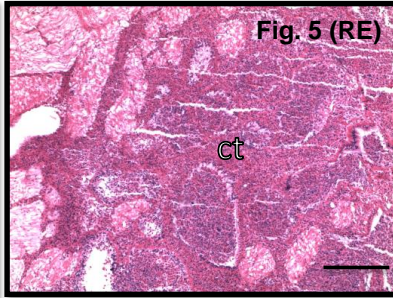
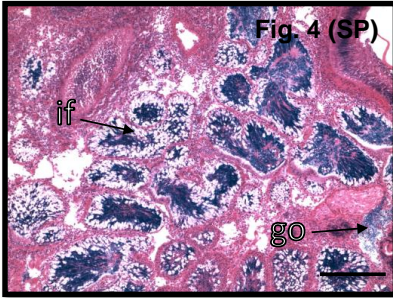
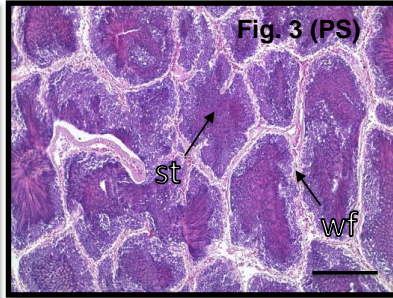
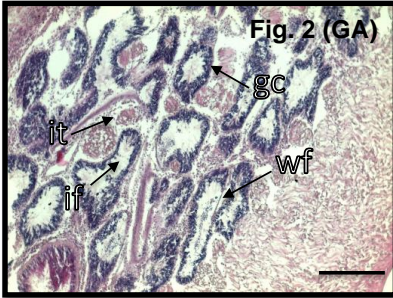


Figura 2 a 9: Fotografias microscópicas dos estágios sexuais dos machos (figuras 2 a 5) e das fêmeas (figuras 6 a 9) do berbigão *Anomalocardia brasiliana*, coletadas em Florianópolis, Brasil. Fig. 2 - gametogênese (GA); Fig. 3 - pré-desova (PS); Fig. 4 - desova (SP) Fig. 5 - repouso (RE). Barra = 200 μ m. Onde, ct: tecido conectivo; gc: células germinativas; go: gonoduto; if: espaço intrafolicular; it: espaço interfolicular; oc: oócito; oo: oogônia; rg: gametas remanescentes; st: espermatozoides; wf: parede do folículo.

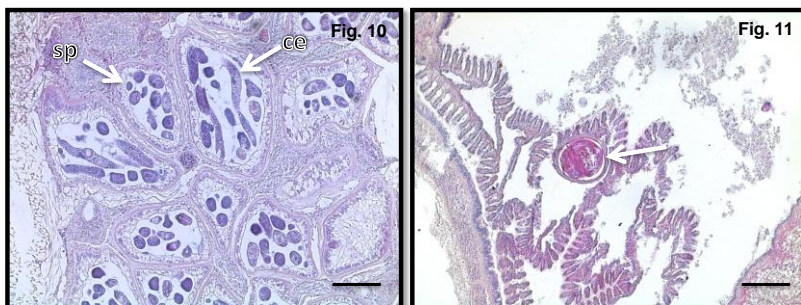
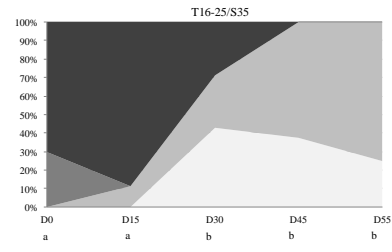
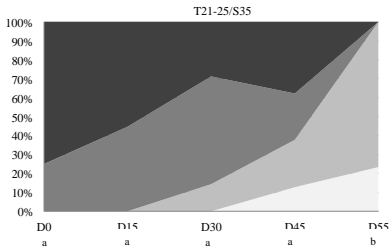
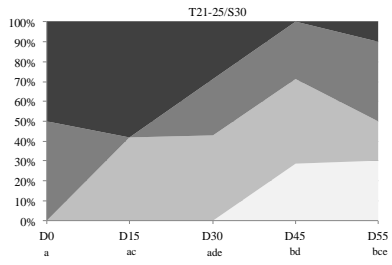
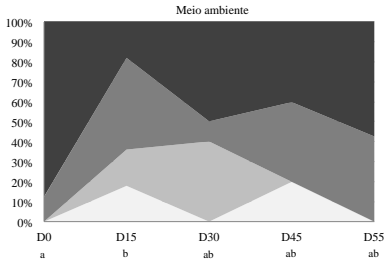
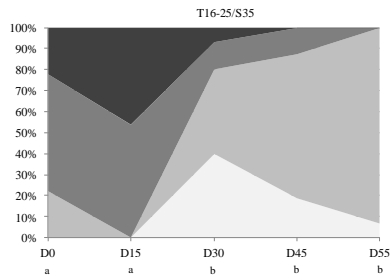
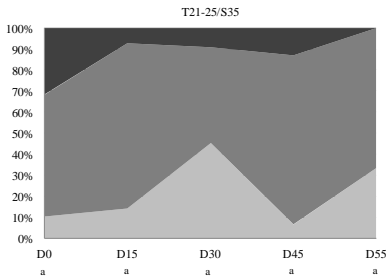
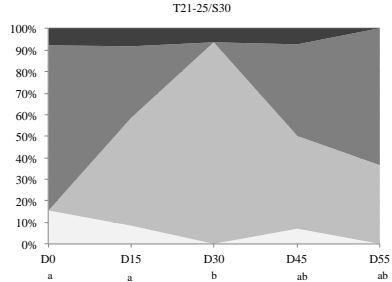
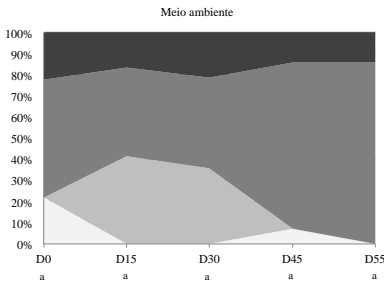


Figura 10 e 11. Fotografia microscópica de condição e parasita registrado na avaliação histológica de espécimes do berbigão *Anomalocardia brasiliana*, Praia da Daniela, Florianópolis, Brasil. Fig. 10, esporocisto (sp) e cercária (ce) de *Bucephalus* sp. infectando o tecido gonádico de *A. brasiliana*. Fig. 11, metazoário (ceta) não identificado infectando a brânquia de *A. brasiliana*. Barra = 200 μ m.

Fêmeas



Machos



Gametogênese
 Pré-desova
 Desova
 Repouso

Figura 12. Estágio sexual (%) das fêmeas e dos machos de *A. brasiliiana* condicionados em laboratório (tratamentos T21-25/S30, T21-25/S35 e T16-25/S35) e coletadas no meio ambiente nos 5 tempos de amostragem (D0, D15, D30, D45 e D55) durante o período experimental, em dias.

CAPÍTULO III.
LARVICULTURA DO MOLUSCO DE AREIA *Anomalocardia*
***brasiliensis* (Gmelin, 1791) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Artigo enviado em janeiro/2014 para publicação no periódico
Boletim do Instituto de Pesca

**INFLUÊNCIA DA DIETA, DENSIDADE E TEMPO DE
LARVICULTURA DO BERBIGÃO *Anomalocardia brasiliiana*
(Gmelin, 1791)**

Francisco José LAGREZE Squella*¹, Marcos Caivano Pedroso de
ALBUQUERQUE², Jaqueline ARAUJO³, Simone SÜHNEL⁴, Claudio
Manoel Rodrigues de MELO²

¹*Aluno de pós-graduação, autor para correspondência:
francisco_lagreze@yahoo.com.br, ²Professor, ³Técnico, ⁴Pesquisador.
Laboratório de Moluscos Marinhos, UFSC. Beco dos Coroas, 305, Barra
da Lagoa, CEP 88061-600, Florianópolis, Brasil.

RESUMO

Com o objetivo de contribuir com a tecnologia de produção de sementes do berbigão *Anomalocardia brasiliana* em laboratório, avaliou-se a densidade e a dieta no cultivo larval e o tempo de larvicultura de *A. brasiliana*. Para isto foram realizados 4 experimentos, como segue: experimento 1: avaliação das densidades 10, 15, 30 e 50 larvas.cm⁻² na larvicultura; experimento 2: avaliação do tempo de larvicultura para o assentamento nas densidades de 25 e 50 larvas.cm⁻²; experimentos 3 e 4: efeito de dietas uni e bialgal na larvicultura. Os resultados demonstraram ser viável a larvicultura desse venerídeo em alta densidade, sendo o melhor resultado com 10 larva.ml⁻¹. As larvas podem ser transferidas para o assentamento com 5 dias de cultivo em densidade de 25 larvas.cm⁻². Observou-se que os animais alimentados com dieta bialgal apresentaram maior sobrevivência e crescimento. A combinação *Chaetoceros muelleri* com *Nannochloropsis oculata* ou *Pavlova lutheri* apresentou-se como a melhor opção para alimentação de larvas de *A. brasiliana*.

Palavras-chave: Berbigão; vôngole; marisco; densidade; tempo de larvicultura; alimentação; larva.

INFLUENCE OF DIET, DENSITY AND TIME OF LARVICULTURE ON THE CLAM *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) IN HATCHERY.

ABSTRACT

To contribute with the *Anomalocardia brasiliiana* production technology of clam seeds in a hatchery, this study evaluated the density, time and diet on larval rearing of clam. For this 4 experiments were performed as follows: Experiment 1: evaluation of densities 10, 15, 30 and 50 larvae.cm⁻² in the larviculture; Experiment 2: evaluation of the larviculture time to settlement at densities of 25 and 50 larvae.cm⁻²; Experiments 3 and 4: effect of diets uni and bialgal in the larviculture. Results showed that is possible to culture this clam in high densities. As well, the larvae can be transferred to settlement within five days of larviculture at a density of 25 larvae.cm⁻². Assessing the diets tested during larviculture, it was observed that larvae fed with bialgal diet had higher survival and growth. The combination *Chaetoceros muelleri* with *Nannochloropsis oculata* or *Pavlova lutheri* presented itself as the best option for feeding larvae of *A. brasiliiana*.

Key words: carib pointed-venus clam; density; larviculture period; feeding; larvae.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta mais de 20 espécies de moluscos de areia, sendo *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) a espécie que mais se destaca por seu importante papel socioeconômico para a região litorânea brasileira (RIOS, 2009). *A. brasiliana* ocorre desde as Antilhas até o Uruguai (RIOS, 2009), com ampla distribuição ao longo da costa brasileira, principalmente em enseadas, baías e estuários (BOEHS *et al.*, 2008). Este venerídeo é popularmente conhecido como berbigão, vôngole, mija-mija, sarnambi, sernambi pequeno, sarnambitinga, chumbinho, marisco pedra e papa-fumo (NARCHI, 1972).

Na costa brasileira, a comercialização desse molusco de areia está baseada no extrativismo em estoques naturais. Essa atividade é realizada em diferentes escalas e, principalmente, por comunidades litorâneas, sendo, em alguns casos, a fonte de proteína mais importante na alimentação familiar (Lagreze F., observação pessoal).

Os principais fatores que podem afetar a disponibilidade de *A. brasiliana* são: sobre-exploração, fatores antropogênicos (tais como a poluição das águas) e fatores ambientais (como, por exemplo, enchentes). A produção de sementes desse molusco em laboratório pode ser uma alternativa para essa limitação, favorecendo o sucesso tanto da extração em estoques repovoados quanto do cultivo.

Estudos sobre aspectos ecológicos (BOEHS *et al.*, 2008), ciclo reprodutivo (LUZ e BOEHS, 2011) e patológicos (SÜHNEL *et al.*, in press) de *A. brasiliana*, tem sido realizados ao longo da costa da América Central e do Sul. Contudo, pouco ainda se sabe sobre o cultivo dessa espécie, com destaque à produção de sementes em laboratório.

No estudo realizado por MOUËZA *et al.* (1999) avaliaram-se aspectos morfológicos do desenvolvimento larval de *A. brasiliana*. Entre as características mais relevantes após a fecundação, estão as fases plantígradas, desde trocófora, larva “D” ou véliger até a fase bentônica, que é a larva pedivéliger. *A. brasiliana*, assim como outros venerídeos (HELM *et al.*, 2004) não necessita de um substrato consolidado para iniciar a metamorfose na fase de assentamento.

As larvas de molusco na fase planctônica são sensíveis aos fatores ambientais, que podem afetar o crescimento e a seleção do método de cultivo. Os fatores temperatura, salinidade, dieta e densidade de cultivo também afetam o assentamento e a metamorfose (LIU *et al.*, 2006). Em sistemas de produção em laboratório, a densidade pode ser controlada e tem uma grande influência na sobrevivência de larvas de moluscos bivalves (DEMING e RUSSELL, 1999; LIU *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006).

A alimentação de larvas de moluscos pode ser considerada um fator chave, pois influencia a variabilidade no crescimento de bivalves quando comparado com a temperatura ou a salinidade (MARSHAL *et al.* 2010). Avaliando o efeito da temperatura, salinidade e da dieta no crescimento das larvas de *Ostrea edulis* (ROBERT *et al.*, 1988), *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* (HIS *et al.*, 1989), mais de 70% da variância no crescimento foi explicada pelo estado nutricional das mesmas.

Na alimentação de moluscos é importante considerar a espécie de microalga a ser fornecida, pois nem todas são ingeridas ou digeridas pelas larvas (MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Espécies do gênero *Isochrysis*, *Pavlova* e *Chaetoceros* são as mais utilizadas na larvicultura de bivalves (SOUTHGATE, 2008). Contudo, existe uma grande variedade de microalgas marinhas com potencial para alimentação de larvas em condições de laboratório. As microalgas fornecem a energia e os nutrientes para síntese de tecidos necessários para o crescimento e metamorfose larval (SOUTHGATE, 2008).

A produção comercial de formas jovens de moluscos bivalves tem, entre outros, o propósito de otimizar o método de cultivo e incrementar a produção por unidade, utilizando uma menor quantidade de água e com custos mínimo. Com o objetivo de contribuir com a tecnologia da produção de sementes de berbigão em laboratório, este estudo avaliou a densidade na larvicultura e no assentamento, o tempo de cultivo e a dieta de larvas do berbigão *A. brasiliiana* em condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Animais adultos ($24,65 \pm 1,36$ mm) de *A. brasiliiana* foram coletados na zona entre marés da praia da Daniela, Florianópolis, Brasil ($27^{\circ}27'25,40''S$; $48^{\circ}32'31,51''W$) e transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) (Universidade Federal de Santa Catarina), localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis, para realização dos experimentos de larvicultura.

Obtenção das larvas “D”

Os animais adultos do berbigão *A. brasiliiana*, ao chegarem ao LMM, foram lavados em solução de hipoclorito (2%) e aclimatados em tanque de corpo tronco-cônico de 200 L contendo água do mar filtrada (1 μ m), esterilizada com ultravioleta (UV), salinidade de 35 e

temperatura de 24°C. Os animais foram acondicionados em quatro sacos de malha com 0,5 kg de berbigão em cada saco, totalizando 2 kg em 200 L. Após 24 horas de aclimação, os animais foram induzidos à eliminação dos gametas por choque térmico com o aumento da temperatura de 24 a 28°C bruscamente e, em seguida, mantendo em 28°C por 15 horas (*overnight*). Após o período de 15 horas, os embriões foram coletados e transferidos para um tanque (100 L), contendo água do mar filtrada a 1 µm, esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25°C, mantidos por 24 horas até larva “D”. Após este período as larvas, foram coletadas com peneira (35 µm) e utilizadas nos experimentos.

Experimento 1: avaliação da densidade de larvas na larvicultura

Foram testados quatro tratamentos: 10, 15, 30 e 50 larvas.mL⁻¹ (larva “D”) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para cada densidade, as larvas “D” foram colocadas em tanques (15 L) utilizando volume de 12 L de água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25°C. Foi instalado em cada tanque um filtro “banjo” (HELM *et al.*, 2004 [estrutura composta por uma secção transversal de 5 cm de cano de PVC (100 mm de diâmetro) tampado com malha (35 µm) de cada lado e com uma saída em PVC (20 mm de diâmetro) até a lateral do nível superior da água do tanque], para a renovação da água sem precisar retirar as larvas. Foi utilizado sistema de aeração constante nos tanques de larvicultura, para manter a circulação da água.

No manejo da larvicultura, a renovação total da água dos tanques foi realizada a cada 24 horas, sem retirar as larvas do tanque e o peneiramento a cada 48 horas, com eliminação de larvas mal formadas ou mortas e higienização de todo sistema, utilizando solução de hipoclorito de sódio (2%). A alimentação diária foi composta pela microalga *Isochrysis galbana*, na concentração de 2 x 10⁴ células.mL⁻¹ nos dois primeiros dias, e pelas microalgas *I. galbana* e *Chaetoceros muelleri* (1:1), na concentração de 5 x 10⁴ células.mL⁻¹, até larva pedivéliger.

Após sete dias de larvicultura, foi avaliada a sobrevivência das larvas pedivéliger.

Experimento 2: avaliação da densidade de larvas no assentamento, cultivadas por 5 e 7 dias de larvicultura

Neste experimento foi testado o assentamento de larvas com idade de 5 e de 7 dias (5d e 7d, respectivamente) em duas densidades de

assentamento: 25 larvas.cm⁻² (D25) e de 50 larvas.cm⁻² (D50) em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (dois fatores tempo e densidade) com três repetições. As larvas “D” foram colocadas nos tanques (100 L) em densidade de 10 larvas.mL⁻¹ e água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, salinidade de 35, temperatura de 25°C e aeração constante. Em cada tanque foi instalado um “banjo” lateral para renovação de água. O manejo da larvicultura e a alimentação das larvas foi realizado como descrito anteriormente para o experimento 1.

Após cada tempo de larvicultura, 5 e 7 dias, as larvas retidas na malha de 120 µm foram separadas, quantificadas e colocadas para assentamento em cilindros de PVC (200 mm de diâmetro), com malha (90 µm) no fundo, acomodados em tanques (100 L). No assentamento foram utilizadas 7.850 larvas.cilindro⁻¹ para densidade de 25D e 15.700 larvas.cilindro⁻¹ para densidade de 50D. Cada tanque continha três cilindros e funcionava com sistema de “airlift” para a circulação da água e do alimento em fluxo descendente (*downwelling*). Nesse sistema foi utilizada água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25°C. A alimentação durante o assentamento foi diária, composta pelas microalgas *I. galbana* e *C. muelleri* (1:1) a uma concentração de 7×10^4 células.mL⁻¹.

No manejo do assentamento foi realizada troca de água total a cada 48 horas. Após 12 dias de assentamento, os animais, já em fase de pré-sementes, foram retirados dos cilindros para avaliação da sobrevivência.

Tanto para o experimento 1 quanto para o experimento 2, a determinação da sobrevivência das larvas pedivéliger e das pré-sementes foi realizada com auxílio de câmara de *Seddewick Rafter* e de microscópio de luz. Para a contagem, em triplicata, uma amostra (1 mL) homogeneizada do recipiente (500 mL), contendo as larvas e água do mar, foi retirada para quantificar o total de larvas vivas presentes.

Experimentos 3 e 4: avaliação da dieta de microalgas

No experimento 3 foi testada dieta unialgal na larvicultura de *A. brasiliiana*, sendo 5 espécies de microalgas testadas: *I. galbana* (Iso), *Rhodomonas salina* (Rh), *Chaetoceros calcitrans* (Cc), *C. muelleri* (Cm) e *Nannochloropsis oculata* (Na). Além das microalgas, foi utilizado um grupo de controle com larvas sem alimento (SA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

No experimento 4 foram testadas 8 dietas bialgais, na proporção 1:1, compostas pelas seguintes microalgas:

Tratamento Iso-Cc: *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans*;
Tratamento Iso-Cm: *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*;
Tratamento Rh-Cc: *Rhodomonas salina* e *Chaetoceros calcitrans*;
Tratamento Rh-Cm: *Rhodomonas salina* e *Chaetoceros muelleri*;
Tratamento Na-Cc: *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros calcitrans*;
Tratamento Na-Cm: *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros muelleri*;
Tratamento Pav-Cc: *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros calcitrans*;
Tratamento Pav-Cm: *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros muelleri*;
Tratamento controle (SA): sem alimento.

O experimento 4 foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para ambos os experimentos, as larvas “D” foram colocadas em bequeres de vidro (unidades experimentais), contendo 400 mL de água do mar filtrada (1 μm), esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25°C, cada um foi povoado com 2.000 larvas (5 larvas.mL⁻¹). Os bequeres foram colocados em “banho-maria” (tanque de 50 L) para manter a temperatura (25°C) em todas as unidades. Os bequeres foram mantidos sem aeração. A troca total de água foi realizada a cada 48 horas, com o peneiramento das larvas utilizando malha 35 μm e o alimento foi fornecido diariamente. A quantidade de células de cada espécie de microalga testada foi ajustada a cada troca de água de acordo com o crescimento dos animais, observado de amostras de larvas de cada unidade experimental, conforme descrito para *Tapes philipinarum* (HELM *et al.*, 2004).

O tempo de larvicultura foi fixado em 7 dias para os dois experimentos. Após este período, todas as larvas de cada tratamento foram retiradas, fixadas (Formol 10%) e armazenadas em tubos eppendorff (2 mL) para posterior avaliação. Para avaliação, o conteúdo líquido de cada eppendorff foi homogeneizado, pipetado 1 mL e as larvas contadas em câmara de *Seddewick Rafter* com microscópio de luz. De cada tubo, foi quantificado em 100 larvas o número total de larvas consideradas “vivas” (com os órgãos intactos) e “mortas” (com concha vazia e/ou tecido em processo de necrose) (O’CONNOR *et al.*, 2012). Das larvas “vivas” foi medido (n=30) o comprimento (μm) de concha (SL). As medições foram realizadas em microscópio ótico acoplado a câmara digital (Leica DS50) utilizando software de medição (Leica, Camera Software). Além disso, foi calculado o crescimento total médio das larvas, através da diferença entre o valor de comprimento de

concha no início do experimento (n=30) e o comprimento da concha no final do experimento, após 7 dias de larvicultura.

Microalgas

As microalgas utilizadas no presente estudo foram cultivadas em sistema semi-contínuo com meio Guillard F/2 modificado pelo LMM, utilizando água filtrada (0,2 µm) e esterilizada (UV), aeração filtrada (0,22 µm) com CO₂ (aproximadamente 2%), temperatura de 22°C e um regime de luz de 24 horas. As microalgas foram coletadas na fase exponencial de crescimento.

Para determinar a quantidade de células necessárias para cada dieta foi utilizado o peso seco das microalgas (NELL e O'CONNOR, 1991; NELL *et al.*, 1994). Antes de iniciar os experimentos, foi avaliada a presença/ausência do *Vibrio* sp. nas algas, utilizando Agar TCBS (*Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose*) (O'CONNOR *et al.*, 2011). As espécies de microalgas utilizadas no experimento 3 e 4, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Microalgas utilizadas nos experimentos 3 e 4, tamanho (comprimento e largura em µm) e peso seco descritos por NELL e O'CONNOR (1991).

Espécies	Tamanho (µm)		Peso seco (µg.célula ⁻¹)
	Comprimento	Largura	
<i>Rhodomonas salina</i>	11,4 ± 1,5	6,9 ± 1,2	60 ± 1,4
<i>Isochrysis</i> sp., variedade <i>Tahiti</i>	8,5 ± 1,6	5,4 ± 1,1	19 ± 4,3
<i>Pavlova lutheri</i>	6,9 ± 1,4	4,9 ± 0,8	23 ± 4,1
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	4,0 ± 0,9	3,1 ± 0,6	15 ± 3,3
<i>Chaetoceros muelleri</i>	7,4 ± 1,2	5,4 ± 1,1	20 ± 3,8
<i>Nannochloropsis oculata</i>	5,0 ± 1,1	4,5 ± 0,9	21 ± 4,8

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote computacional SAS® (SAS, 2003).

Realizou-se testes de homogeneidade de variância das médias e de distribuição normal dos erros para todas as variáveis estudadas (sobrevivência e comprimento da concha). Os dados de sobrevivência (experimento 1, 3 e 4) e comprimento de concha (experimentos 3 e 4) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de um fator, quando observadas diferenças entre os tratamentos (havendo mais de

dois tratamentos), foi aplicado o teste Tukey de separação de médias. Os dados de sobrevivência (experimento 2) foram submetidos a Análise de Variância fatorial (dois fatores: tempo e densidade) e posteriormente realizou-se o desdobramento da interação (tempo vs. densidade) .

RESULTADOS

Teste de homogeneidade de variância e normalidade

Não observou-se heterogeneidade de variância entre os tratamentos ou desvio da normalidade dos erros nos dados analisados, em todos os experimentos. Assim, utilizou-se análise de variância para todos as variáveis estudadas (sobrevivência e crescimento).

Experimento 1

Avaliando a sobrevivência das larvas após sete dias de larvicultura, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Foi observada maior sobrevivência para a densidade de 10 larvas.mL⁻¹, com $77,78 \pm 10,39\%$ e menor para 50 larvas.mL⁻¹, com $37,78 \pm 14,99\%$ (Figura 1). Ao final do experimento não foram observadas larvas retidas na malha de 120 μm para 30 e 50 larvas.mL⁻¹. Já para os tratamentos de 10 e 15 larvas.mL⁻¹, 70 a 80% do total de larvas encontravam-se retidas em malha de 120 μm , com a maioria na fase de pedivéliger. Quando analisado o número final de larvas para cada densidade não foram observadas diferenças significativas ($p < 0.05$).

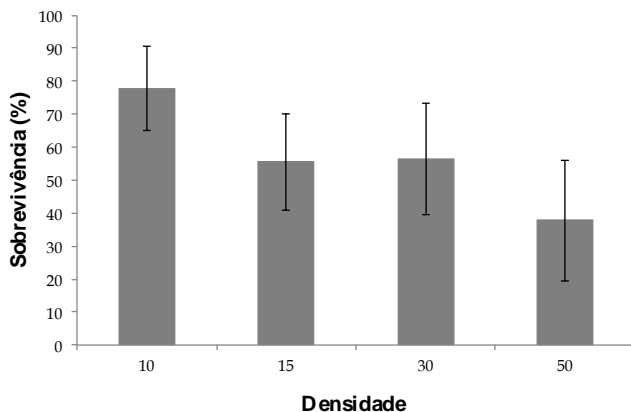


Figura 1. Média e desvio padrão da sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* com 7 dias de larvicultura para as 4 densidades testadas: 10, 15, 30 e 50 larvas.mL⁻¹.

Experimento 2

Pela análise de variância fatorial não houve diferença entre as densidades de cultivo, contudo houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tempo e a interação (densidade vs. tempo). Através do desdobramento da interação observa-se que, no tempo de 5 dias, a sobrevivência das larvas cultivadas na D25 foi significativamente ($p < 0,05$) superior ($75,16 \pm 16,57$) aquela observada na D50 ($45,64 \pm 4,25$). No tempo 7 dias, a sobrevivência na D50 foi superior ($38,42 \pm 5,92$) aquela observada na D25 ($19,39 \pm 4,25$). Analisando o tempo em cada densidade, verifica-se que na D25 a sobrevivência das larvas foi significativamente ($p < 0,05$) superior ($75,16 \pm 16,57$) com 5 dias em relação a 7 dias de larvicultura ($19,39 \pm 4,25$). Contudo, não houve diferença na sobrevivência larval entre 5d ($45,64 \pm 4,25$) e 7d ($38,42 \pm 5,92$) quando a densidade de cultivo era D50. (Figura 2).

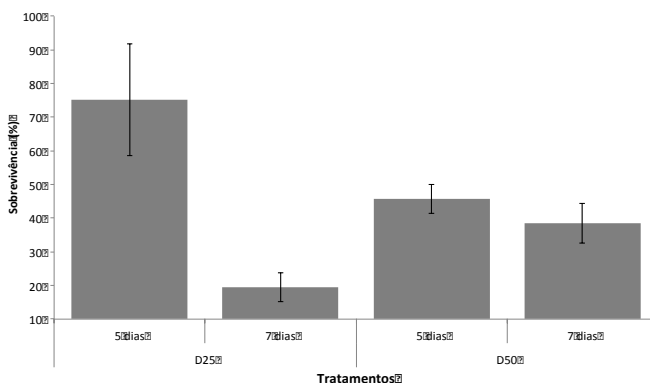


Figura 2. Média e desvio padrão da sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* na fase de assentamento com 5 e 7 dias de larvicultura em duas densidades, 25 e 50 larvas.mL⁻¹ (D25 e D50, respectivamente).

Experimento 3 e 4

As análises bacteriológicas mostraram ausência do *Vibrio* sp. nas microalgas utilizadas no experimento 3 e 4. Avaliando a sobrevivência de larvas após sete dias de larvicultura, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com dieta unialgal (Figura 3A). A maior sobrevivência foi verificada para a dieta Na, com $46,42 \pm$

10,87% e as menores ocorreram para as dietas Rh e Cm, com $22,47 \pm 6,63\%$ e $23,54 \pm 15,81\%$, respectivamente.

Os tratamentos com dieta bialgal não apresentaram diferenças significativas. A maior sobrevivência foi observada para a dieta Pav-Cm, com $72,67 \pm 18,58\%$ e as menores para as dietas Na-Cc e Rh-Cc, com $12,00 \pm 1,73\%$ e $13,00 \pm 7,00\%$, respectivamente. A sobrevivência das larvas sem alimento (Sa) na dieta unialgal foi de $38,00 \pm 13,00\%$ e para bialgal $23,00 \pm 11,00\%$.

Quando avaliado o comprimento de concha após sete dias de larvicultura no experimento com dietas unialgal, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) dos animais alimentados com a dieta Cc em relação as demais, com comprimento médio de $160,15 \pm 18,03 \mu\text{m}$ (Figura 4A). Já para as larvas alimentadas com as dietas Iso e Na não diferiram entre si, mas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com as demais dietas testadas, com comprimento médio de $142,63 \pm 8,10 \mu\text{m}$ e $134,02 \pm 10,61 \mu\text{m}$, respectivamente. O menor comprimento de concha foi para larvas alimentadas com Cm, não significativamente diferente de Rh e sem alimento, sendo inferior às larvas sem alimento.

Para as dietas bialgais, os melhores resultados de comprimento de concha foram observados para as dietas de Na-Cm, Pav-Cc e Pav-Cm, com $168,72 \pm 6,22 \mu\text{m}$, $165,67 \pm 2,09 \mu\text{m}$ e $164,65 \pm 2,30 \mu\text{m}$, respectivamente que apesar de não diferirem entre si, diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação às demais dietas (Figura 4B). As larvas que apresentaram os menores valores de comprimento de concha foram para aquelas alimentadas com Rh-Cc, Rh-Cm e o tratamento sem alimento, sendo estas diferentes significativamente ($p < 0,05$) das demais dietas.

Avaliando o crescimento total (Tabela 2), onde a altura inicial para todos os tratamentos foi de $104,25 \pm 4,15 \mu\text{m}$, larvas alimentadas com uma dieta unialgal Cm (altura final $88,82 \pm 20,00 \mu\text{m}$) resultaram em um valor negativo. O mesmo ocorreu com o tratamento sem alimento (altura final $103,68 \pm 12,31 \mu\text{m}$). Já nos tratamentos com dietas bialgais, todos os tratamentos apresentaram valores positivos, incluído o tratamento sem alimento.

Quando comparados o crescimento total entre os dois experimentos pode se observar valores de até $71,87 \mu\text{m}$ para dieta Na-Cm, superior ao maior valor da dieta unialgal Cc, com $44,90 \mu\text{m}$.

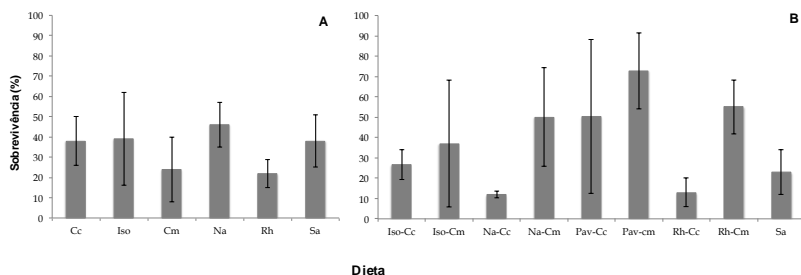


Figura 3. Média e desvio-padrão da sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais (A) e com mistura de duas algas (B) após 7 dias de larvicultura. Onde, Cc: *Chaetoceros calcitrans*; Iso: *Isochrysis galbana*; Cm: *Chaetoceros muelleri*; Na: *Nannochloropsis oculata*; Rh: *Rhodomonas salina*; Pav: *Pavlova lutheri*; e Sa: sem alimento.

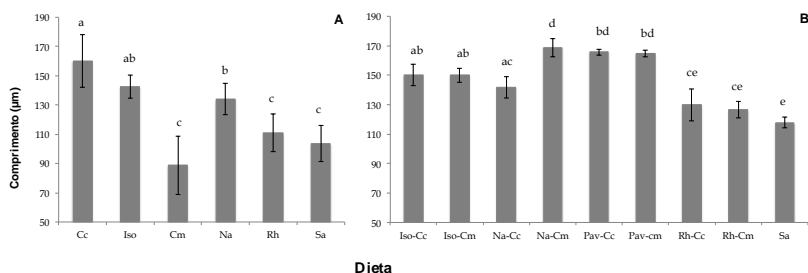


Figura 4. Média e desvio-padrão do comprimento de concha das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais (A) e com mistura de duas algas (B) após sete dias de larvicultura. Onde, Cc: *Chaetoceros calcitrans*; Iso: *Isochrysis galbana*; Cm: *Chaetoceros muelleri*; Na: *Nannochloropsis oculata*; Rh: *Rhodomonas salina*; Pav: *Pavlova lutheri*; e Sa: sem alimento.

Tabela 2. Crescimento total médio (diferença entre o tamanho inicial e final) das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* após 7 dias de larvicultura utilizando dietas unialgal e bialgais. Onde, Cc: *Chaetoceros calcitrans*; Iso: *Isochrysis galbana*; Cm: *Chaetoceros muelleri*; Na: *Nannochloropsis oculata*; Rh: *Rhodomonas salina*; Pav: *Pavlova lutheri*; e SA: sem alimento.

Dieta	Crescimento total médio da larva (μm)
Unialgal	
<i>C. calcitrans</i>	55,90 \pm 9,42
<i>I. galbana</i>	38,38 \pm 2,49
<i>C. muelleri</i>	-15,42 \pm 16,68
<i>N. oculata</i>	29,76 \pm 3,30
<i>R. salina</i>	6,69 \pm 4,80
SA	-0,57 \pm 2,18
Bialgal	
Iso-Cc	53,46 \pm 6,01
Iso-Cm	53,06 \pm 3,86
Na-Cc	45,00 \pm 5,98
Na-Cm	71,87 \pm 5,08
Pav-Cc	68,82 \pm 0,44
Pav-cm	67,81 \pm 1,89
Rh-Cc	32,91 \pm 8,75
Rh-Cm	29,74 \pm 4,72
SA	20,89 \pm 2,93

DISCUSSÃO

Na larvicultura de bivalves, LOOSANOFF e DAVIS (1963) observaram que em alta densidade há um efeito deletério no crescimento e na sobrevivência causado pelas frequentes colisões entre as larvas, resultando em um consumo descontínuo de alimento, pois, diante do choque, as larvas fecham as valvas e não se alimentam das microalgas.

O aumento do nível de metabólitos, como amônia, a competição por alimento entre as larvas e susceptibilidade a doenças são também

efeitos observados quando há um aumento na densidade larval (URIARTE *et al.*, 2001). A densidade de larvas afetou a sobrevivência de *Meretrix meretrix* (LIU *et al.*, 2006) e de *Ruditapes philippinarum* (YAN *et al.*, 2006). Para ambos estudos, as densidades próximas de 10 larva.mL⁻¹ apresentaram melhores resultados de sobrevivência e de crescimento.

Normalmente o alimento é um fator limitante no crescimento em altas densidades de cultivo. No presente estudo a alimentação foi fixada para todos os tratamentos o que pode ter influenciado no desempenho das larvas em densidades maiores por uma maior competitividade devido a uma menor disponibilidade de microalgas. Por outro lado elevada concentração pode sobrecarregar o sistema digestivo levando a um incremento das taxas de rejeição das algas (GALLAGER, 1988). Outro risco que acompanha o excesso de alimento é o fato de que o excesso de fezes, pseudofezes e algas não consumidas se acumulem no tanque aumentando o crescimento bacteriano e conseqüentemente afetando a sobrevivência (HELM *et al.*, 2004; TORKILDSEN e MAGNESEN, 2004).

A densidade no assentamento está relacionada, entre outros fatores, com o sistema de cultivo utilizado. No assentamento de moluscos de areia são sugeridas densidades de 100 a 150 larvas.cm⁻² (HELM *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 1993) para larvas de *T. philippinarum*. Segundo LIU *et al.* (2011), a densidades de 20 a 320 larvas.cm² não afetou a taxa de metamorfose de larvas de *Clinocardium nutallii*. Contudo, estes autores sugerem que a taxa de ocupação da superfície da malha não seja maior que 100% da área em sistema descendente ou “downwelling”.

Nos sistemas de fluxo descendente devem-se evitar altas densidades, as quais podem criar zonas mortas de fluxo, diminuindo o crescimento das pré-sementes ou causando mortalidades.

No assentamento de *A. brasiliana*, assim como para outros venerídeos, as larvas se fixam umas às outras ou nas paredes do tanque através do bisco. Isso impossibilita a utilização de fluxo ascendente nos tanques de assentamento (como é realizado com ostras) devido à formação de aglomerados e, conseqüentemente, perdas pelo fluxo de drenagem.

MOUËZA *et al.* (1999) relatam que o processo de metamorfose de *A. brasiliana* inicia no sétimo dia de larvicultura a 25°C e termina com a diferenciação do sifão no décimo quinto dia. Contudo, observou-se no presente estudo que o tempo de larvicultura, também a 25°C, pode ser reduzido para cinco dias quando o assentamento é realizado em

baixa densidade (ver figura 1). A menor sobrevivência foi observada em D25 com 7 dias de larvicultura.

As larvas pediveliger de *A. brasiliana* não necessitaram de substrato para metamorfose (MOUËZA *et al.*, 1999), não passando por atraso decorrentes da busca de um substrato para se fixar. Esse atraso na metamorfose causa mortalidades em outras espécies de bivalves (BAYNE, 1965, 1976; FRENKIEL e MOUËZA, 1979; GROS *et al.*, 1997). Com os resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que é possível transferir as larvas de *A. brasiliana* ainda na fase planctônica (com 5 dias de larvicultura em densidade de 25 larvas.cm⁻²) para o sistema de assentamento onde ocorrerão as subseqüentes mudanças para metamorfose. Esta metodologia facilita o sistema de produção de sementes, terminando mais cedo a etapa de cultivo larval.

Outro aspecto que afeta a sobrevivência das larvas é a dieta utilizada na larvicultura. Dietas diversificadas de microalgas apresentam maior capacidade de suprir as necessidades nutricionais das larvas quando comparadas a utilização de uma única espécie de microalga (HELM e LAING, 1987; THOMPSON *et al.*, 1993). Isso corrobora os resultados obtidos no presente estudo, onde não foi observada diferença na sobrevivência de larvas sem alimento e tratamentos unialgal. Muitas das reservas armazenadas na gametogênese de moluscos são utilizadas durante a embriogênese (GALLAGER e MANN, 1986; WHYTE *et al.*, 1990). Após a embriogênese, durante a fase larval até o assentamento, aumenta a demanda por fontes exógenas de nutrientes (PERNET *et al.*, 2003). Na ausência de alimento, segundo YAN *et al.* (2009), as larvas se comportam como um sistema metabólico fechado, que é predominantemente alimentado pelas reservas energéticas endógenas. Mesmo sendo ministrada uma espécie de microalga, isso não foi suficiente para suprir as exigências nutricionais das larvas.

A ingestão das células está relacionada diretamente com o tamanho da larva de moluscos (LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ, 1997). Por exemplo, larvas veliger (menores de 150 µm) podem se alimentar com algas de até 16 µm e larvas veliger maiores (com mais de 200 µm) com microalgas de até 30 µm (SOMMER *et al.*, 2000; BALDWIN e NEWELL, 1995). No presente estudo, as larvas alimentadas com dieta unialgal de *Rhodomonas salina* e de *Chaetoceros muelleri* tiveram um crescimento baixo e até negativo (CM) devido, provavelmente, ao tamanho dessas microalgas em relação as outras algas testadas (Tabela 1). É possível observar que os valores médios de crescimento com CM tem uma alta variabilidade o que pode indicar que as larvas com mais reserva tenham sobrevivido os 7 dias de experimento

e que estas representaram as menores larvas no início do experimento, o mesmo pode ter ocorrido com as larvas sem alimento. LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ (1997) observaram que larvas de *Argopecten ventricosus-circularis*, com altura aproximada de 95 μm , não conseguem ingerir as algas que possuem espículas como *Chaetoceros calcitrans* e *C. muelleri* e, por sua vez, até o sétimo dia de vida as larvas não conseguiram ingerir *Tetraselmis suecica* (8-9 μm) ou *Thalassiosira pseudonana* (10-11 μm).

Além do tamanho da célula, deve ser considerada a digestibilidade da microalga. A qual está relacionada com a estrutura da parede celular e a morfologia da alga. Em geral, as espécies flageladas são de fácil digestão, como é o caso de *P. lutheri* e *I. galbana* (LE PENNEC e RANGEL-DAVALOS 1985; LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ, 1997).

O gênero *Nannochloropsis* é citado como microalgas de baixa digestão, ainda que ingerida facilmente, possivelmente devido à presença da parede celular de glicoproteína (LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ, 1997; MARTÍNEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2004). Contudo, RONQUILLO *et al.* (2012) observaram que juvenis da ostra *Ostrea edulis* apresentaram maior crescimento quando alimentados com uma mistura de *P. lutheri* e *N. oculata*. Da mesma forma, O'CONNOR *et al.* (2011), observaram que as melhores taxas de crescimento e metamorfoses de larvas da ostra *Ostrea angasi* foram obtidas utilizando dietas contendo *N. oculata*. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com esses autores, onde as dietas contendo *N. oculata* mostraram o melhor crescimento das larvas, sendo a melhor dieta composta por essa microalga e *C. muelleri*.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente indicam que a larvicultura de *A. brasiliana* em sistema estático com trocas de água diárias e peneiramentos a cada 48 horas deve ser realizada com densidades iniciais entre 10 e 15 larvas.mL⁻¹. Recomenda-se utilizar dietas mistas, com as microalgas *C. muelleri* e *N. oculata* ou *P. lutheri*. Após o quinto dia, as larvas podem ser transferidas para o assentamento em densidade de 25 larvas.cm⁻².

A utilização de dieta unialgal com as microalgas *R. salina* e *C. muelleri* não são recomendadas para alimentação de larvas de *A. brasiliana*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES/UFSC pelo suporte financeiro e bolsa de doutorado. Ao Ministério de Pesca e Aquicultura pelo suporte financeiro através do projeto “Gente da Maré” (Termo de Convênio 056/2008). Ao CNPq pelo apoio financeiro (Processo 477309/2011-9) e pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa ao último autor.

REFERÊNCIAS

- BALDWIN, B.S. e NEWELL, R.I.E. 1995 Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Marine Ecology Progress Series*, 120: 135–145.
- BAYNE, B.L. 1965 Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.) *Ophelia*, 2: 1-47.
- BAYNE, B.L.; THOMPSON R.J.; WIDDOWS, J. 1976 Physiology: I. In: BAYNE, B.L. (ed) *Marine mussels: their ecology and physiology*. London: Cambridge University Press. 506p.
- BOEHS, G.; ABSHER, T.M.; CRUZ-KALED, A.C. 2008 Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia:Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(2): 259 - 270.
- BREESE, W.T. e MALOUF, R.E. 1974 Hatchery Manual for the Pacific Oyster. Corvallis, Oregon State University, Sea Grant College, Program, 22p. Publ. No ORESU-H75-002.
- DEMING, C.J.; RUSSELL, M.P., 1999. Assessing manipulations of larval density and culling in hatchery production of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 18: 99-105.
- DONALDSON, J. 1991 Commercial production of microalgae at Coast Oyster Company. In: FULKS, W. e K.L. MAIN (eds). *Rotifer and microalgae culture systems*, Proceedings of a US-Asia Workshop, Honolulu, Hawaii, January 28-31, 1991. The Oceanic Institute, Hawaii, USA, 229-236.

FRENKIEL, L. e MOUËZA, M. 1979 Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Marine Biology*, 55: 187-195.

GALLAGER, S.M. e MANN, R. 1986 Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56: 105-121

GROS, O.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. 1997 Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology*, 116: 86-101.

HELM, M.M. e LAING, I. 1987 Preliminary observations on the nutritional value of “Tahiti Isochrysis” to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62: 281-288.

HELM, M.M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. 2004 *Hatchery Culture of Bivalves. A Practical Manual*. FAO Fisheries Technical Paper No. 471. FAO, Rome. 177p.

HIS, E.; ROBERT, R.; DINET, A. 1989 Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100: 455-463.

JONES, G.G.; SANFORD, C.L.; JONES B.L. 1993 Manila Clams: Hatchery and Nursery Methods. Innovative Aquaculture Products Ltd. Skerry Bay, Lasqueti Island BC V0R 2J0, Canada 73. Disponível em: <<http://www.innovativeaqua.com/Publication/clam.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2013.

LE PENNEC, M. e RANGEL-DAVALOS, C. 1985 Observations en microscopie a epifluorescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez des jeunes larves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia). *Aquaculture*, 47: 39-51.

LIU, B.Z.; DONG, B.; TANG, B.J.; ZHANG, T.; XIANG, J.H. 2006 Effect of stocking density on growth, settlement and survival of clam larvae, *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 258: 344-349.

LIU, W.; PEARCE, C.M.; ALABI, A.O.; BEERENS, A.; GURNEY-SMITH, H. 2011 Effects of stocking density, ration, and temperature on growth of early post-settled juveniles of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, 320(1–2): 129-136.

LOOSANOFF, V. e DAVIS, H.C. 1963 Rearing of bivalve larvae. *Advances in Marine Biology*, 1: 1-136.

LORA-VILCHIS, M.C. e MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. 1997 Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*, 28(12): 905–910.

LUZ, J.R. e BOEHS, G. 2011 Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoiera River, Ilhéus, Bahia. *Brazilian Journal of Biology*, 71(3): 679-686.

MARSHAL, R.; McKINLEY, S.; PEARCE, C.M. 2010 Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2: 33-55.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; RANGEL-DÁVALOS, C. 2004 Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*, 230: 417–423.

MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. 1999 Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). *Journal of Molluscan Studies*, 65: 73-88.

NARCHI, W. 1972 Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). *Bulletin of Marine Science*, 22: 643-670.

NELL, J.A. e O'CONNOR, W.A. 1991 The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99: 277–284.

NELL, J.A.; O'CONNOR, W.A.; HEASMAN, M.P.; GOARD, L.J. 1994 Hatchery production for the venerid clam *Katelysia rhytiphora* (Lamy) and the Sydney cockle *Anadara trapezia* (Deshayes). *Aquaculture*, 119: 149–156.

O'CONNOR, S.; MOLSCHANIWSKYJ, N.; BOLCH, C.J.S.; O'CONNOR, W. 2012 Dietary influence on growth and development of flat oyster, *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871), larvae. *Aquaculture Research*, 43(9): 1-11.

PERNET, F.; TREMBLAY, R.; BOURGET, E. 2003 Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: larval growth, competency, and settlement. *Journal of Shellfish Research*, 22: 377–388.

RIOS, E.C. 2009 *Compendium of Brazilian Sea Shells*. Rio Grande, RS: Evangraf. 676p.

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*. *Mar. Biol.* 97: 95-100.

RONQUILLO, J.D.; FRASER, J.; McCONKEY, A. 2012 Effect of mixed microalgal diets on growth and polynsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. *Aquaculture*, 360-361: 64-68.

SOMMER, F.; STIBOR, H.; SOMMER, U.; VELIMIROV, B. 2000 Grazing by mesozooplankton from Kiel Bight, Baltic Sea, on different sized algae and natural seston size fractions. *Marine Ecology Progress Series*, 199: 43–53.

SOUTHGATE, P.C. 2008 Pearl oyster culture. In: SOUTHGATE, P.C.; LUCAS, J. (Eds.) *The pearl Oyster*. Elsevier 1st Ed., p. 231-272. SAS Institute Inc., 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SÜHNEL, S.; IVACHUK, C.S.; SCHAEFER, A.L.C.; THOMSON, C.A.; MEYER, G.R.; MACIEL, M.L.T.; MARTINS, M.L.; RUIZ, R.A.; FIGUERAS, A.; JOHNSON, S.C.; GURNEY-SMITH, H.J.; MAGALHÃES, A.R.M. Evaluation of perkinsiosis, bonamiosis and

martelliiosis in commercial marine bivalves in southern Brazil. *Journal of Shellfish Research* submetido em setembro de 2013 e aceito em dezembro de 2013.

THOMPSON, P.A.; GUO, M.; HARRISON, P.J. 1993 The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 117: 259-268.

TORKILDSEN, L. e MAGNESEN, T., 2004. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) - survival in different rearing systems. *Aquac. Int.* 12:489-507.

URIARTE, I.; FARIAS, A.; CASTILLA, J.C. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture Engineering*, 25: 139-147.

UTTING S.D. 1986 A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture*, 56: 123-138.

UTTING, S. e SPENCER, B.E. 1991 The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Lab. Leaflet, *Fish. Res. n.* 68, *Directorate of Fisheries Research*, Lowestoft, UK. 31p

WALNE, P.R. 1970 *Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus*. Fishery Investigations. London: H.M.S.O., series 2, 26(5): 62

WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N.; GINTHE, N.G. 1990 Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Biology* 106: 239-244.

WIDDOWS, J. 1991 Physiological ecology of mussel larvae. *Aquaculture*, 94:147-163.

YAN, X.; ZHANG, G.; YANG, F. 2006 Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253(1): 350-358.

YAN, X.; ZHANG, Y.; HUO, Z.; YANG, F.; ZHANG, G. 2009 Effects of starvation on larval growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 29: 327-334.

CAPÍTULO IV.
BIOACUMULAÇÃO E DEPURAÇÃO DE *Escherichia coli* NO
MOLUSCO DE AREIA *Anomalocardia brasiliana* EM
DIFERENTES SALINIDADES

O artigo será enviado para publicação no periódico *Journal of Food Protection*, tendo sido redigido segundo as normas da referida revista científica.

Bioacumulação e depuração de *Escherichia coli* no molusco de areia *Anomalocardia brasiliana* em diferentes salinidades

Francisco José Lagreze Squella^{1*}; Roberta Juliano Ramos²; Simone Sühnel¹; Marília Miotto²; Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque¹; Cleide Rosana Werneck Vieira²; Claudio Manuel Rodrigues de Melo¹

¹Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Servidão dos Coroas, s/n, Barra da Lagoa, CEP 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: telefone (55) (48) 3236 1196; e-mail francisco_lagreze@yahoo.com.br,

Palavras chave: berbigão, vôngole, entero bactérias, contaminação.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a eficiência de um sistema de depuração de *E. coli* no berbigão *A. brasiliana* utilizando diferentes níveis de salinidade. Foi utilizada a cepa de *E. coli* ATCC-25922 para contaminar os berbigões previamente coletados de estoque natural, localizado na Praia da Daniela, em Florianópolis. Os berbigões foram aclimatados por 6 h, seguido de um período de 18 h de contaminação com *E. coli*. O experimento de depuração foi desenvolvido no Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC, em sistema de recirculação de água fechado. Foram realizadas contagens de *E. coli* nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h após a contaminação em animais depurados com salinidade de 30 (S30), 25 (S25) e 20 (S20) e para a salinidade de 35 (S35) nos tempos 0, 12 e 24 h. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados antes, durante e após o processo de depuração. Após 48 h de depuração, a maior diminuição de *E. coli* na carne foi observada para a salinidade S25, com a redução de 3,20 ciclos logarítmicos. Enquanto que após 24 h, a salinidade com maior diminuição foi S35, com a redução de 2,59 ciclos logarítmicos. Após 24, 36 e 48 h, a menor redução foi observada para salinidade S20.

INTRODUÇÃO

O molusco de areia *Anomalocardia brasiliana* é um molusco apreciado em várias regiões, especialmente na costa brasileira. Este bivalve é conhecido com diferentes nomes populares, como berbigão”, “vôngole”, “mija-mija”, “sarnambi”, “sarnambi-pequeno”, “sarnambitinga”, “chumbinho”, “marisco-pedra” e “papa-fumo” (22, 13). Esta espécie possui a distribuição desde as Antilhas (Índias Ocidentais) até o Uruguai, ocorrendo ao longo de toda a costa brasileira (17). Esta espécie tem importância sócio-econômico, sendo comercializada em diferentes escalas ao longo da costa brasileira, principalmente pelas comunidades costeiras, que o consomem também na dieta familiar.

A. brasiliana habita águas calmas nas regiões litorâneas e no infra-litoral raso, incluindo manguezais e baixios não vegetados com sedimento arenoso e/ou areno-lodoso. Esse bivalve enterra-se, superficialmente, no sedimento (3).

Atualmente, a comercialização de *A. brasiliana* ao longo da costa brasileira é baseada na extração em estoques naturais. Uma vez que os moluscos de areia são organismos que se alimentam por remoção das partículas suspensas na coluna d’água (NAVARRO, 2001) como outros bivalves, podem acumular e concentrar microorganismos patogênicos presentes na água do mar. As condições de saúde dessa espécie são dependentes da qualidade da água do mar.

Normalmente, as baías e áreas estuarinas, onde ocorrem assentamentos populacionais circundantes, estão expostas a pressões antropogênicas, as quais contribuem para o aumento da contaminação microbiológica e química desses ecossistemas. A presença de organismos patogênicos, como bactérias coliformes *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp. (9; 6), vírus da hepatite A e norovírus (5), pode representar um risco para a saúde humana e comprometer o consumo desses moluscos. Neste caso, a pesquisa com bactérias patogênicas, como *E. coli* pode ser uma indicação da possível presença de patógenos entéricos e fornecer mais informações sobre a segurança das condições sanitárias de moluscos e do meio ambiente, uma vez que *A. brasiliana*, é euritérmica e eurihalina, demonstrando grande resistência à deficiência de oxigênio (19).

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a bioacumulação e o tempo de depuração de *E. coli* no molusco de areia *A. brasiliana* exposto à diferentes salinidades.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécie de moluscos e localização

Este estudo foi realizado com animais adultos de *A. brasiliiana* (Gmelin, 1791), com 25-35 mm de comprimento, coletados em março de 2011 na Praia da Daniela, Florianópolis, Brasil (27°27'32,46"S e 48°32'37,16"W).

O experimento de depuração foi realizado no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises e o cultivo da bactéria *E. coli* foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA/UFSC).

Preparação da bactéria *Escherichia coli*

A estirpe da bactéria *E. coli* (ATCC 25922), utilizada no experimento, foi cultivada em 10 ml de caldo triptona de soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) a 37°C durante 18 a 24 h. As culturas enriquecidas foram semeadas individualmente em agar triptona de soja (TSA, Oxoid, Basingstoke, UK) e incubados a 37°C por 18 a 24 h. Uma colônia da placa de TSA foi retirada e enriquecida em 50 ml de TSB a 37°C durante 18 h. A cultura enriquecida de *E. coli* foi colocada em um tubo de centrifuga estéril e centrifugada a 3000 x g durante 15 min (MCD HT-2000, Formosa, República da China). As células sedimentadas foram ressuspensas em 50 ml de solução salina estéril (0,9%) para produzir uma cultura de cerca de 4×10^8 UFC.ml⁻¹, de acordo com o padrão de McFarland (bioMe'rieux, Marcy l'Etoile, França).

Contaminação dos moluscos de areia com *Escherichia coli*

Os animais, após a coleta, foram transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos em caixas isotérmicas. No LMM os animais foram aclimatados por 6 h em tanque (250 litros) contendo água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, com temperatura de 24 ± 0,5°C e saturação de oxigênio de 6,5 ± 0,5 mg.l⁻¹, controlada com multiparâmetro (modelo YSI-550A, YSI, Inc., Yellow Springs, OH). A aclimação dos animais foi realizada em quatro salinidades: S35 (salinidade de 35); S30 (salinidade de 30); S25 (salinidade de 25 – salinidade controle, pois era a mesma do local de coleta dos animais no estoque natural); e S20 (salinidade 20).

Para cada salinidade, após aclimação (Ti), os berbigões foram divididos em dois grupos, o grupo contaminado ($n=300$), animais expostos à contaminação com a bactéria *E. coli* e o grupo controle

(controle negativo, $n=100$), animais não expostos a contaminação. No grupo contaminado, os berbigões foram infectados adicionando a bactéria *E. coli* no tanque de depuração (350 litros) a uma concentração final de 10^3 a 10^4 NMP.100ml⁻¹. O tempo de exposição para bioacumulação das bactérias foi de 18 h. Os animais do grupo controle foram identificados (com tinta acrílica vermelha) e transferidos para outro tanque (350 litros) e mantidos nesse tanque durante as 18 h. Após esse período, os moluscos de ambos os grupos (contaminados e controle) foram removidos, separadamente por grupo, dos tanques, as valvas foram lavadas, removidos os materiais aderidos a parte externa das valvas e higienizados em solução de hipoclorito de sódio diluído em água doce (0,5%). O tanque de depuração foi higienizado, lavando-se com água doce, clorando com hipoclorito de sódio (0,5%) e, em seguida, enxaguando com água doce e água do mar filtrada (1 μ m), esterilizada com UV. Após o processo de higienização os animais foram transferidos para o tanque de depuração.

Experimento de depuração

O sistema de depuração instalado no LMM consistiu de tanque de depuração (350 litros), filtros de polipropileno de 3 e 5 μ m (3M do Brasil), bomba centrífuga, sistema de aeração (tubo venturo) e lâmpadas UV (modelo Q884-23, Quimis). A depuração foi realizada em sistema fechado (recirculação), com a água do mar filtrada (1 μ m), esterilizada com UV, fluxo de água do mar de 7 litros.min⁻¹ no tanque de depuração com temperatura inicial de $24,3 \pm 1,1^\circ\text{C}$ e saturação de oxigênio de $6,5 \pm 0,5$ mg.l⁻¹. A temperatura e saturação de oxigênio foram acompanhadas durante o período do experimento de depuração, com multiparâmetro (modelo YSI-550A, YSI, Inc., Yellow Springs, OH).

Após o período de contaminação e a higienização dos animais e do tanque de depuração, os animais, de ambos os grupos controle e contaminados, foram colocados em cestas plásticas (3 cestas para cada grupo) 90 mm suspensas acima do nível do fundo do tanque de depuração para minimizar a recontaminação.

O experimento de depuração foi realizado em quatro salinidades S35, S30, S25 e S20, separadamente. Para as salinidades S30, S25 e S20 foram testadas quatro tempos de depuração 12, 24, 36 e 48 h e para salinidade S35 dois tempos: 12 e 24 h.

Análise da bactéria *Escherichia coli*

A análise microbiológica de *E. coli* em amostras de carne moluscos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita na

American Public Health Association (1), utilizando método do número mais provável em séries de três tubos múltiplos. Para análise da água do mar foi utilizada a técnica de cinco tubos múltiplos, descrita no manual Métodos Padrões de Exame de Água e Esgoto [*Standards Examination of Water and Wastewater* - APHA/AWWA/WEF (2)].

Os animais e a água do mar foram amostrados antes da bioacumulação (Ti), ao iniciar a depuração (T0) e após o processo de depuração nos tempos 12 (T12), 24 (T24), 36 (T36) e 48 (T48) h.

A análise de *E. coli* na carne dos animais contaminados foi realizada em três amostras ($n=3$) formadas por um *pool* de 15 animais cada. Para os animais não contaminados, a análise foi realizada em 1 *pool*, formado por 15 animais. Para formação do *pool*, os animais foram coletados aleatoriamente de cada grupo e colocados em saco estéril. A análise de *E. coli* na da água do mar foi realizada em 100 ml de água colocada com recipiente com tampa (1 litro) de polipropileno estéril. As amostras (carne e água) foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) em caixas térmicas com gel-packs congelados para manter uma temperatura em torno de 7°C.

Análise de *Escherichia coli* na carne do berbigão

Após chegarem no LMA, os moluscos foram imediatamente lavados com escova sob água potável corrente e secados ao ar livre em bandejas plásticas previamente desinfetados com álcool 70%. Após a secagem, as valvas foram abertas com faca estéril e a carne e o líquido intervalvar foram transferidos assepticamente para saco estéril e formado os *pools* (15 animais). Amostras de 25 g de cada *pool* foram diluídas em 225 ml de água peptonada (0,1%) e subsequentemente desintegrada e homogeneizada. A partir dessa diluição 1/10, foi transferido 1 ml das diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) para cada tubo (série de 3 tubos para cada diluição) contendo Caldo de Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubados a 35°C durante 48 h. Dos tubos de LST, que mostraram turvação e produção de gás, 100 µl foram transferidos para tubos contendo Caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados em banho-maria (45°C) por 48 h. Os tubos de EC que mostraram turvação e produção de gás foram inoculados em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) por esgotamento e inoculados a 35°C por 24 h. As colônias típicas de *E. coli* foram submetidas a série bioquímica (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato - IMVIC). As contagens de *E. coli* foram realizada através da tabela do Número Mais Provável (NMP).

Análise de Escherichia coli na água do mar

Para análise da presença de *E. coli* na água do mar, assim que as amostras chegaram no LMA, a água foi inoculada em uma série de 5 tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) duplamente concentrado, seguida de duas séries de 5 tubos com LST em concentração normal, adicionando-se em cada série de 5 tubos 10, 1 e 0,1 ml da água de cultivo respectivamente, e incubados a 35°C por 48 h. Os tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram repicados para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados em banho-maria a 45,5°C por 24 h. Os tubos de EC com turvação e produção de gás, foram inoculados em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) por esgotamento e incubados a 35°C por 24 h. As colônias típicas de *E. coli* foram submetidas a série bioquímica (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMVIC)). As contagens foram realizadas através da utilização da tabela do NMP, para séries de cinco tubos por diluição (10, 1 e 0,1 ml), seção 9221C (2).

Análise estatística

Os resultados dos exames microbiológicos foram transformados em logaritmo na base 10 (\log_{10}) (16). As análises estatísticas foram realizadas com o software SAS. As populações bacterianas em moluscos nos diferentes tempos de amostragem foram analisadas com ANOVA e teste Tukey de separação de médias com $p < 0,05$. Para analisar a redução de *E. coli* na carne de *A. brasiliiana* foi aplicado teste t pareado na redução dos ciclos logaritmos entre os tempos de depuração testados, considerando como $H_0: D=0$ e $H_1: D \neq 0$.

RESULTADOS

O sistema de depuração desenvolvido no presente estudo mostrou ser adequado para o molusco de areia *A. brasiliiana*, o qual manteve sua atividade de filtração durante todo o período experimental, observado pela grande quantidade de fezes e pseudofezes no fundo do tanque no momento da limpeza.

Bioacumulação de *Escherichia coli* nos berbigões

Antes da exposição dos berbigões *A. brasiliiana* à bactéria *E. coli*, a carne dos animais mostrou concentrações com valores 0,48 \log_{10} NMP.g⁻¹ (S30, S25 e S20) e 1,33 \log_{10} NMP.g⁻¹ (S35).

Para todas as salinidades testadas foi observada bioacumulação da bactéria *E. coli* na carne dos berbigões. A salinidade 35 salinidade apresentou valores mais elevados de *E. coli*, $5,32 \pm 0,76 \log_{10}$ NMP.g⁻¹

($20,8 \times 10^4$ NMP.g⁻¹), significativamente diferente ($p < 0,05$) da salinidade 20, que apresentou menor valor de *E. coli* após a contaminação, $2,42 \pm 0,23 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ ($0,02 \times 10^4$ NMP.g⁻¹). Os resultados para salinidade S20 foram significativamente diferente ($p < 0,05$) das salinidades S30 e S25, com $4,91 \pm 1,18 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ ($8,1 \times 10^4$ NMP.g⁻¹) e $4,70 \pm 0,50 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ ($5,0 \times 10^4$ NMP.g⁻¹), respectivamente.

Temperatura e pH da água do mar no experimento de depuração

A temperatura e o pH da água do mar no tanque de depuração, medidos durante o período experimental, não apresentaram variação significativa (Tabela 1).

Mudanças na população de *Escherichia coli* nos animais não contaminados artificialmente

A população de *E. coli* nos animais não expostos à contaminação iniciou com valores baixos para as salinidades S35, S30 e S20 ($0,79 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, $0,48 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ e $0,48 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, respectivamente) e com valores mais elevados para S25 ($2,66 \log_{10}$ NMP.g⁻¹).

As salinidades S35 e S30 apresentaram aumento na população de *E. coli* durante todo o período de depuração em relação a T0. Para a salinidade S35, T12 apresentou população de $1,56 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ e T24 de $2,46 \log_{10}$ NMP.g⁻¹. Para a salinidade S30, T12 e T36 também foi observada a mesma concentração de bactérias, com $1,54 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, em T24 $2,46 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ e em T48 $1,88 \log_{10}$ NMP.g⁻¹.

A salinidade S25 em relação a T0, apresentou um aumento na concentração de *E. coli* no tempo T24 ($3,04 \log_{10}$ NMP.g⁻¹) e uma redução em T12, T36 e T48 ($2,38 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, $1,63 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ e $0,96 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, respectivamente).

Na salinidade S20 as contagens mantiveram-se baixas ao longo dos tempos de depuração testados com $0,48 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ em T12, $0,30 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ em T24 e T48 e $0,56 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ em T36.

Mudanças na população de *Escherichia coli* nos animais contaminados artificialmente

Os valores de *E. coli* na carne do berbigão *A. brasiliiana* para as salinidades e tempos de depuração testados podem ser visualizados Figura 1.

Para a salinidades 35 (S35), o valor mais baixo de carga bacteriana foi observado após 24 h (T24) de depuração ($2,73 \pm 0,78$

\log_{10} NMP.g⁻¹), significativamente diferente ($p < 0,05$) de T0 ($5,32 \pm 0,76 \log_{10}$ NMP.g⁻¹).

Para S30, o valor mais baixo de carga bacteriana foi observado após 36 h (T36) de depuração ($2,42 \pm 0,35 \log_{10}$ NMP.g⁻¹), diferente significativamente ($p < 0,05$) de T0 ($4,91 \pm 1,18 \log_{10}$ NMP.g⁻¹).

Em S25, o menor valor da carga bacteriana foi observado após 48 h ($1,50 \pm 0,39 \log_{10}$ NMP.g⁻¹), diferente significativamente ($p < 0,05$) de T0 ($4,70 \pm 0,50 \log_{10}$ NMP.g⁻¹). Bem como, nesta salinidade a depuração após T12 ($2,70 \pm 0,42 \log_{10}$ NMP.g⁻¹), T24 ($2,87 \pm 0,86 \log_{10}$ NMP.g⁻¹) e T36 ($2,57 \pm 0,58 \log_{10}$ NMP.g⁻¹) foram diferente significativamente ($p < 0,05$) de T0.

Para a salinidade 20 (S20), o menor valor da carga bacteriana foi observado após 48 h ($1,26 \pm 0,23 \log_{10}$ NMP.g⁻¹). Nessa salinidade, tanto T12 ($1,33 \pm 0,03 \log_{10}$ NMP.g⁻¹) quanto T48 diferiram ($p < 0,05$) de T0 ($2,42 \pm 0,23 \log_{10}$ NMP.g⁻¹).

Redução de *Escherichia coli* na carne de *Anomalocardia brasiliana*

Os resultados da análise da redução de ciclos logaritmos estão apresentados na Tabela 2. Para a salinidade 35 (S35) a redução de *E. coli* foi significativa ($p < 0,05$) diferente entre T0 e T24 ($2,59 \log_{10}$ NMP.g⁻¹). Em S30, não foi observada redução significativa entre os tempos testados e com relação a T0. Já para S25, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre T0 e todos os tempos testados (T12 com $1,99 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, T24 com $1,83 \log_{10}$ NMP.g⁻¹, T36 com $2,13 \log_{10}$ NMP.g⁻¹ e T48 com $3,20 \log_{10}$ NMP.g⁻¹), bem como entre T12 e T48 ($1,20 \log_{10}$ NMP.g⁻¹). Para S20, a redução significativa ($p < 0,05$) foi observada entre T0 e os tempos T12 ($1,09 \log_{10}$ NMP.g⁻¹), T36 ($0,95 \log_{10}$ NMP.g⁻¹) e T48 ($1,16 \log_{10}$ NMP.g⁻¹).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que avalia a capacidade do berbigão *A. brasiliana* bioacumular e depurar *E. coli* em diferentes salinidades. Os parâmetros de temperatura, pH e oxigênio utilizados no presente estudo estão dentro dos valores sugeridos pela FAO (10) para a depuração de moluscos bivalves em geral.

Trabalhos desenvolvidos avaliando a bioacumulação de bactérias em moluscos bivalves mostram que a quantidade de partículas suspensas na água tem um efeito maior do que a densidade bacteriana. Plusquellec et al. (15) sugere que a acumulação bacteriana em mexilhões esta mais influenciada pela densidade de partículas na água

do que pela densidade bacteriana. Bem como, Cabelli e Hefferman (4) observaram que a acumulação de *E. coli* no molusco de areia americano (*Mercenaria mercenaria*) não depende da concentração bacteriana na água, mas sim na relação entre *E. coli* e o total de partículas ingeríveis no intervalo de 4×10^1 a 3×10^7 células.100ml⁻¹. No presente estudo, a bioacumulação variou em função da salinidade, pois a água utilizada na contaminação dos berbigões estava livre de outras partículas.

Devido à ocorrência de chuvas extremas, é comum os berbigões *A. brasiliiana* ficarem expostos a baixas salinidades, necessitando assim, mecanismos de adaptação que permitam sobreviver nesses ambientes alterados. Segundo Leonel et al. (11), *A. brasiliiana* sobrevive entre salinidades de 17 a 42,5 durante 29 dias de exposição, contudo isso não significa que essa espécie tenha as mesmas respostas fisiológicas nas diferentes salinidades. No presente trabalho, observamos que o berbigão *A. brasiliiana* bioacumulou menos na salinidade 20, a qual está próxima do valor limite de salinidade, 17. Nas salinidades maiores (S25, S30 e S35), os animais responderam melhor a bioacumulação.

No processo de depuração, a salinidade de 25 apresentou uma redução significativa em todos os tempos testados, sendo a maior redução de ciclos logarítmicos após 48 h de depuração, enquanto que a salinidade 35 após 24 h. Já a salinidade de 20, a redução foi significativa após 12, 36 e 48 h, sendo o maior valor observado para T48. Na salinidade 20, a redução não foi significativa em T24 provavelmente devido a uma recontaminação dos animais. Outros estudos tem demonstrado que 48 h são suficientes para reduzir *E. coli* a valores aptos para consumo no molusco de areia *Egeria radiates* na Nigéria (7).

A salinidade pode afetar as taxas de filtração nos moluscos. Os moluscos bivalves são osmoconformadores com pouca ou nenhuma capacidade extracelular para regulação osmótica (20). Fanshawe (8) observou que o mexilhão *Mytilus edulis* exposto a salinidade de 32 acumulou maiores valores de *E. coli* e em menos tempo do que os animais expostos a salinidade de 20 e 16. Neste mesmo trabalho, Fanshawe (8) observou que ao final da depuração na salinidade de 32 houve uma redução de 3 ciclos logarítmicos e para a salinidade de 20 e 16 uma redução de 1 e 2 ciclos, respectivamente.

Ostras do gênero *Crassostrea* são em geral eurihalinas e habitam águas rasas. Experimentos com *Crassostrea commercialis* mostraram que a depuração de *E. coli* dos tecidos é lenta e inconsistente em salinidades de 16 e 20 quando comparadas com 32-36 ou 43-47 (18). Love et al. (12) observaram que a melhor salinidade para depuração foi de 28 para *M. mercenaria*.

No processo de depuração foi observada bioacumulação da bactéria *E. coli* na carne dos animais não expostos ao inóculo nas salinidades maiores (S25, S30 e S35). Esse fato provavelmente ocorreu devido ao contato com as fezes e pseudofezes provenientes dos animais contaminados. Ramos et al. (16), testando a depuração de ostras *Crassostrea gigas* contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, também observam contaminação dos animais não expostos ao inóculo por estarem expostos as fezes e pseudofezes dos animais contaminados. Segundo Timoney e Abston (21) observaram que a bactéria *E. coli* estava aderida as fezes e pseudofezes do moluscos de areia *M. mercenaria*, de forma física e não por ligação iônica. Neste sentido, para assegurar a eficiência da depuração é importante que o desenho de uma planta depuradora assegure que os biodepósitos não sejam resuspendidos ou que lotes de animais a serem depurados sejam misturados.

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que a salinidade de 25 proporcionou ao berbigão *A. brasiliiana* um maior conforto fisiológico observado através da maior bioacumulação e uma depuração mais eficiente com a maior redução de *E. coli* da carne. A salinidade de 20 provocou um aparente estresse nos berbigões e possivelmente precisariam um maior período para aclimação para realizar um teste de bioacumulação e depuração.

Novos testes devem ser realizados para avaliar a capacidade de depuração desta espécie em salinidades maiores, como as que são registradas no nordeste do Brasil no período de secas, onde este recurso é altamente explorado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES/UFSC pelo suporte financeiro e bolsa de doutorado. Ao Ministério de Pesca e Aquicultura pelo suporte financeiro através do projeto “Gente da Maré” (Termo de Convênio 056/2008). Ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa ao último autor. Agradecemos também a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

1. APHA (American Public Health Association) 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4 ed., Ed. Washington, D.C., 1219p.
2. APHA (American Public Health Association) 2005. American Water Works Association - AWWA, Water Environment Federation - WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 ed, Ed. Washington, D.C., 1336p.
3. Boehs, G., T.M. Absher, and A. C. Cruz-Kaled. 2008. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia:Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *B. Inst. Pesca* 34(2):259 - 270.
4. Cabelli, V. J., and W. P Hefferman. 1970. Accumulation of *Escherichia coli* by the Nothen Quahaug. *Appl. Microbiol.* 19(2):239.
5. Croci, L., M. N. Losio, E. Suffredini, E. Pavoni, S. DiPasquale, F. Fallacara, and G. Arcangeli. 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *Int. J. Food Microbiol.* 114:252-257.
6. El-Shenawy, N. S. 2004. Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. *Environ. Toxicol.* 19:143-153.
7. Ekanem, E. O., and G. O. Adegoke. 1995. Bacteriological study of West African clam (*Egeria radiata* Lamarch) and their overlying waters. *Food Microbiol.* 12, 381-385.
8. Fanshawe, T. 1995. Investigation of the effect of salinity on the uptake and elimination of *Escherichia coli*, by mussel *Mytilus edulis*. MSc. thesis, College of North Wales, Bangor.
9. Formiga-Cruz, M., A. K. Allard, A. C. Conden-Hanson, K. Henshilwood, B. E. Hernroth, J. Jofre, D. N. Lees, F. Lucena, M. Papapetropoulou, R. E. Rangdale, A. Tsibouxi, A. Vantarakis, and R. Girones. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1556-1563.

10. Lee R., A. Lovatelli, and L. Ababouch. 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 139p.
11. Leonel, R. M. V., A. R. M. Magalhães, and J. E. Lunetta. 1983. Sobrevivência de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), em diferentes salinidades. *Boletim de Fisiologia Animal Universidade de São Paulo*, 7:63-72.
12. Love, D., G. L. Lovelace, and M. D. Sobsey. 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercenaria mercenaria*) by depuration. *Int. J. Food Microbiol.* 143:211–217.
13. Narchi, W. 1972. Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). *Bull. Mar. Sci.* 22:643-670.
14. NAVARRO, J.M. Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos. In: MAEDA-MARTINZ A. N. ed. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Mexico, Editorial Limusa, v. 1, p.61-76. 2001.
15. Plusquellec A., M. Beucher, D. Prieur, and Y. Le Gal. 1990. Contamination of the mussel *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 by enteric bacteria. *J. Shellfish Res.* 9:95-101.
16. Ramos R. J., M. Miotto, F. J. S. Lagreze, A. Cirolini, J. F. Ferreira, and C. R. W. Vieira. 2012. Depuration of Oysters (*Crassostrea gigas*) Contaminated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* with UV Light and chlorinated seawater. *J. Food Prot.* 75:1501-1506.
17. Rios, E. C. 2009. Compendium of brazilian sea shells. Evangraf, Rio Grande, RS. 676 p.
18. Rowse A. J., and G. H. Fleet. 1984. Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 48(5):1061.

19. Schaeffer-Novelli, Y. 1976. Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin,1791). Mollusca:Bivalvia), na Praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 119 p.
20. Shumway, S.E. 1996. Natural environmental factors. In V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. F. Eble, (eds), The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, University of Maryland, College Park, Maryland. pp. 467-513.
21. Timoney J. F., and A. Abston. 1984. Accumulation and elimination of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by hard clams in an in vitro system. *Appl. Microbiol.* 47(5):986.
22. Tobias-Silva, M.M. 1957. Moluscos comestíveis do Brasil. *An. Farm. Quim.* 8(5/6):5-13.

Figura 1. Média e desvio padrão do logaritmo na base 10 do NMP de *Escherichia coli* na carne do molusco de areia *Anomalocardia brasiliiana* ao longo do tempo (Ti: início da bioacumulação; T0: início da depuração; T12: após 12 h de depuração; T24: após 24 h de depuração; T36: após 36 h de depuração; e T48: após 48 h de depuração) para as quatro salinidades testadas (S35, S30, S25 e S20).

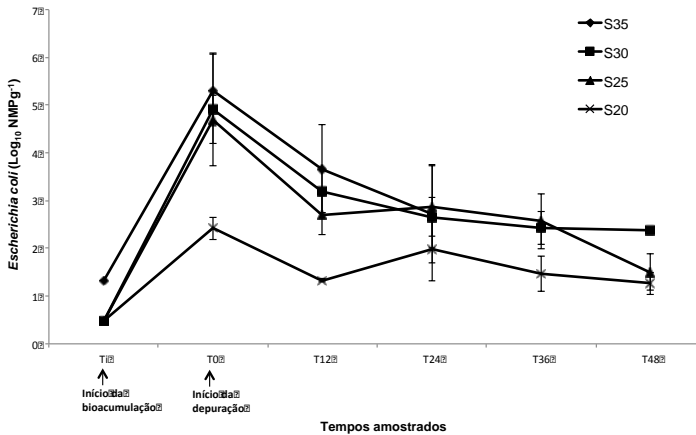


Tabela 1. Médias de temperatura e pH nos tanques de depuração durante o período experimental. As letras minúsculas mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) aplicando ANOVA e teste Tukey para separação das médias.

Tempo de depuração	Temperatura (°C)	pH
T0	24,30 ± 1,12 ^a	8,05 ± 0,14 ^a
T12	23,35 ± 0,83 ^a	7,96 ± 0,12 ^a
T24	24,38 ± 1,08 ^a	8,00 ± 0,07 ^a
T36	25,25 ± 0,83 ^a	8,00 ± 0,08 ^a
T48	24,33 ± 0,47 ^a	8,21 ± 0,13 ^a

Tabela 2. Resultados da análise (teste t) da redução de *Escherichia coli* na carne do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* entre os diferentes tempo de depuração para cada salinidade testada. Sendo: * = $p < 0,05$; ns = não significativo; - = não realizado.

		T0	T12	T24	T36	T48		T0	T12	T24	T36	T48
		<i>S25</i>						<i>S35</i>				
T0			*	*	*	*		ns	*	-	-	
T12		*		ns	ns	*		ns	ns	ns	-	-
T24	<i>S20</i>	ns	ns		ns	ns	<i>S30</i>	ns	ns		-	-
T36		*	ns	ns		ns		ns	ns	ns		-
T48		*	ns	ns	ns			ns	ns	ns	ns	

CAPÍTULO V.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES GERAIS

A través dos resultados obtidos no experimento de condicionamento reprodutivo observa-se ser possível manter reprodutores de *Anomalocardia brasiliana* em laboratório por um período de 55 dias. Com a variação da temperatura realizada no tratamento T16-25/S35 foi possível controlar o ciclo reprodutivo e a ocorrência de desovas nos animais. Esses dados são importantes para futuros estudos sobre a sincronização reprodutiva de *A. brasiliana* em laboratório. Um regime adequado de temperatura e de alimentação é fundamental para o planejamento das desovas do berbigão para a produção de sementes ao longo do ano. Essa produção pode viabilizar o cultivo e a realização de futuros estudos sobre o repovoamento dessa espécie para um melhor uso desse recurso natural.

Sugere-se que a larvicultura de *A. brasiliana* seja realizada com densidades iniciais entre 10 e 15 larvas.mL⁻¹. Após o quinto dia, as larvas podem ser transferidas para o assentamento e cultivadas com densidade de 25 larvas.cm⁻². Larvas de *A. brasiliana* apresentaram bom crescimento quando alimentadas com a microalga *N. oculata*, tanto com dieta unialgal quanto bialgal. Nas dietas mistas, recomenda-se as microalgas *Chaetoceros muelleri* com *Nannochloopsis oculata* ou *Pavlova lutheri*. Como dieta unialgal, as microalgas *Rhodomonas salina* e *Chaetoceros muelleri* não são recomendadas para alimentação de larvas de *A. brasiliana*.

Os resultados obtidos de maior bioacumulação e de maior redução, após 48 horas, de *E. coli* na carne do *A. brasiliana* na salinidade de 25, sugerem que essa salinidade proporcionou ao berbigão um maior conforto fisiológico. A salinidade de 20 pode ter provocado um aparente estresse nos berbigões. Para uma maior bioacumulação e uma depuração mais eficiente é necessário testar um período maior de aclimação nessa salinidade.

SUGESTÕES

Futuros trabalhos devem ser desenvolvidos para testar o controle da temperatura na maturação de *A. brasiliana* em distintas zonas geográficas do Brasil onde esta espécie ocorre naturalmente.

Sugere-se também, testar diferentes dietas no condicionamento reprodutivo de berbigões utilizando dietas secas e outras espécies de microalgas.

Com o objetivo de aumentar a capacidade de produção desta espécie futuros trabalhos devem ser desenvolvidos avaliando a produção de larvas de berbigão em sistemas intensivos. Sugere-se estudos sobre o efeito da temperatura e da salinidade no cultivo larval e no assentamento e da dieta no assentamento.

Novos testes devem ser realizados para avaliar a capacidade de depuração desta espécie em salinidades maiores, como as que são registradas no nordeste do Brasil no período de secas, onde este recurso é altamente explorado. Também, recomenda-se testar um período maior de aclimação para salinidades próximas ao limite de tolerância, como 20 e 40. Outro aspecto importante para ser testado é o efeito da temperatura na depuração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ARAÚJO, C. M. **Biologia Reprodutiva do Berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin,1769) (Molusca, Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha de Pirajubaé.** 2001. 204 f. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ARAÚJO, M. L. R.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Occurrence of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) in *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Veneridae) at Canto da Barra Beach, Fortim, Ceará State, Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 37, p. 35-37, 2004.

ARGÜELLO-GUEVARA, W.; LOOR, A.; SONNERNHOLZNER, S. Broodstock conditioning, and early larval development of the tropical rock oyster *Striostrea prismática* (Gray 1825). **Journal of Shellfish Research**, v. 32, p. 665-670, 2013.

ARRUDA-SOARES, H.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MANDELLI JR. J. “Berbigão” *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), bivalve comestível da região da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil: aspectos biológicos de interesse para a pesca comercial. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 9, p. 21-38, 1982.

AVENDAÑO M.; LE PENNEC M. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). **Aquaculture Research**, v. 28, p. 175-182, 1997.

BÄNDEL, K. Stages in the ontogeny and a model of the evolution of bivalves (Mollusca). **Paläontologische Zeitschrift**, v. 62, p. 217-254, 1988.

BARBER, B. J.; BLAKE, N. J. Reproductive physiology, In: SHUMWAY, S. E.; PARSONS G. J. (Ed.), **Scallops: biology, ecology and aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science.** Elsevier Sciences, New York, 2006. 35. p. 357-416.

BARLETTA, M.; COSTA, M. Living and non-living resources exploitation in tropical semi-arid estuaries. **Jouranal of Coastal Research**, v. 56, p. 371-375, 2009.

BARREIRA, C. A. R.; ARAÚJO, M. L. R. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, p. 9-20, 2005.

BAYNE, B. L. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.) *Ophelia*, v. 2, p. 1-47, 1965.

BAYNE, B. L.; THOMPSON R. J.; WIDDOWS, J. Physiology, In: BAYNE, B. L. (Ed), **Marine mussels: their ecology and physiology**. Cambridge University Press, London, 1976. 506 p.

BEIRAS, R.; PÉREZ-CAMACHO, A. Influence of food concentration on the physiological energetics and growth of *Ostrea edulis* larvae. **Marine Biology**, v. 120, p. 427-435, 1994.

BOEHS, G. **Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de Anomalocardia brasiliana (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil**. 2000. 201 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Composition and distribution of benthic molluscs on intertidal flats of Paranaguá Bay (Paraná, Brazil). **Scientia Marina**, v. 68, p. 537-543, 2004.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A. R. M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865-869, 2004.

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, p. 259 - 270, 2008.

BOEHS G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2010.

CARRIKER, M. R. Embryogenesis and organogenesis of veligers and early juveniles, In: KRAEUTER, J. N., CASTAGNA, M. (Ed), **Biology of the hard clam**. Elsevier, Amsterdam, 2001. 751 p.

CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. **Aquaculture**, v. 214, p. 115-130, 2002.

CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Shellfish Research**, v. 22, p. 721-731, 2003.

CHU, F. L.; GREAVES, J. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. **Marine Biology**, v. 110, p. 229-236, 1991.

CROCI, L. et al. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 252-257, 2007.

DEATON, L. E.; PIERCE, S. K. Introduction: cellular-volume regulation - mechanisms and control. **Journal of Experimental Zoology**, v. 268, p. 77-79, 1994.

DEATON, L.E., Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 260, p. 185-197. 2001.

DELGADO, M.; PÉREZ-CAMACHO, A. A study of gonadal development in *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: influence of food ration and energy balance. **Journal of Shellfish Research**, v. 22, p. 435-441, 2003.

DUNSTAN, G. A. et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). **Phytochemistry**, v. 35, p. 155-161, 1994.

EL-SHENAWY, N. S. Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. **Environmental Toxicology**, v. 19, p. 143-153, 2004.

EVERSOLE, A. G. Gametogenesis and spawning in North American clam population for culture, In: MANZI, J. J.; CASTAGNA, M. (Ed), **Clam Mariculture in North America**. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier Science, Amsterdam, 1989. 472 p.

FIGUEREDO, M. I. S.; LAVRADO, H. P. Estrutura populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca Bivalvia) em uma lagoa hipersalina (Lagoa de Araruama, RJ). In: XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar. XII COLACMAR, Florianópolis, Brasil. **Resumes...** Florianópolis, 2007. CD-ROM.

- FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). **Marine Biology**, v. 55, p. 187-195, 1979.
- FABIOUX, C. et al. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. **Aquaculture**, v. 250, p. 458-470, 2005.
- FORMIGA-CRUZ, M. et al. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1556-1563, 2003.
- GALLAGER, S. M. Visual observations of particle manipulation during feeding in larvae of a bivalve mollusc. **Bulletin of Marine Science**, v. 43, p. 344-365, 1988.
- GEFFARD, O. et al. Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects on embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 2310-2318, 2002.
- GIESE, A. C.; PEARSE, J. S. Introduction: General Principles, In: GIESE, A. C.; PEARSE, J. S. (ed), **Reproduction of marine Invertebrates**. Academic Press, New York, v. 1, p. 1-49, 1979.
- GILLES, R. Osmoregulation in three molluscs: *Acontochitona discrepans*, *Glycymeris glycymeris* and *Mytilus edulis*. **Biological Bulletin**, v. 142, n. 1, p. 25-35, 1972.
- GROS, O., FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). **Invertebrate Biology**, v. 116, p. 86-101, 1997.
- GROTTA, M.; LUNETTA, J. E. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca – Bivalvia) do litoral do Estado da Paraíba. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 3, p. 5-55, 1980.
- GROTTA, M.; LUNETTA, J. E. Reproductive physiological variation of *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca – Bivalvia) in different latitudes. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 5, p. 21-28, 1982.
- GUISS, C. 1995. **Influência da Gramínea *Spartina alterniflora* (Loiseleur, 1807) sobre a distribuição e densidade do bivalve *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791)**. 1995. 73 f. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

HELM, M. M.; LAING, I., Preliminary observations on the nutritional value of “Tahiti Isochrysis” to bivalve larvae. **Aquaculture**, v. 62, p. 281-288, 1987.

HELM, M. M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper No. 471, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2004, 177 p.

HENDRIKS, I. E.; VAN DUREN, L. A.; HERMAN, P. M. J. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 296, p. 199-213, 2003.

HIROKI, K. On the resistance of isolated bivalve gill pieces to oxygen deficiency and hydrogen sulphide. **Boletim de Fisiologia Animal Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 9-20, 1977.

HIS, E.; ROBERT, R.; DINET, A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 100, p. 455-463, 1989.

HUTCHINSON, S.; HAWKINS, L. E. Quantification of the physiological responses of the European flat oyster *Ostrea edulis* L. to temperature and salinity. **Journal of Molluscan Studies**, v. 58, p. 215-226, 1992.

IGLESIAS J. I. P. et al. Microgeographic variability in feeding, absorption and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): a transplant experiment. **Journal Shellfish Research**, v. 15, p. 673-680, 1996.

KIKUCHI, S.; UKI, N. Technical study of artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* I. Relationship between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus hannai* Ino. **Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research**, v. 33, p. 69-78, 1974a.

KITTNER, C.; RIISGARD, H. U. Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 305, p. 147-152, 2005.

LAGREZE, F. J. S. **Taxas fisiológicas alimentares e potencial de crescimento da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) cultivadas em ambiente com alta concentração de seston**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LAVANDER, H. D. et al. Biologia reprodutiva da *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) no litoral norte de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, p. 344-350, 2011.

LAING, I.; CHILD, A. R.; ACHIM, J. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). **Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom**, v. 70, p. 1-12, 1990.

LEE R.; LOVATELLI, A.; ABABOUC, L. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 139p. 2008.

LEONEL, R.M.V. Influência da salinidade sobre algumas respostas osmóticas de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia). 1981. 189 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

LEONEL, R.M.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; LUNETTA, J.E. Sobrevivência de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), em diferentes salinidades. **Boletim de Fisiologia Animal Universidade de São Paulo**, v. 7, p. 63-72. 1983.

LUZ J. R.; G. BOEHS. 2011. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 7, p. 679-686. 2011

MACDONALD, B. A.; BACON, G. S.; WARD, J. E.. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles II. Absorption efficiency and scope for growth. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 219, p. 127-141. 1998.

MANN, R. Some biological and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. **Journal of Marine Biology Association**, v. 59, p. 95-110. 1979.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; RANGEL-DÁVALOS, C. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. **Aquaculture**, v. 230, p. 417-423. 2004.

MATTOS, G.; CARDOSO, R.S.; CAETANO, C.H.S. Dinâmica populacional de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na praia das Fleixeiras, Ilha de Itacuruça, Rio de Janeiro- Resultados preliminares. III

Congresso Brasileiro de Oceanografia-CBO 2008, I Congresso Ibéro-Americano de Oceanografia, Fortaleza (CE), 20 a 24 de maio de 2008.

MACKENZIE, B.R.; LEGGETT, W.C. Quantifying the contribution of small-scale turbulence to the encounter rates between larval fish and their zooplankton prey: effects of wind and tide. **Marine Ecology Progress Series**, v. 73, p. 149-160. 1991

MONTI, C. D.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Demography and growth of *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin) (Bivalvia, Veneridae) in a mangrove, in Guadeloupe (French West Indies). **Journal of Mollusc Study**, v. 57, p. 249-257. 1991.

MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia, Veneridae). **Journal of Mollusc Study**, v. 65, p. 73-88. 1999.

MURANAKA, M. S.; LANNAN, J.E. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. **Aquaculture**, v. 39, p. 217-228. 1984.

NARCHI, W. Encontro de *Bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers) no Brasil. **Ciência e Cultura, São Paulo**, v. 18, p. 22-24. 1966.

NARCHI, W. Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). **Bull. Marine Science**, v. 22, p. 643-670. 1972.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos Zoologia**, v. 27, p. 235-262. 1974.

NARCHI, W. Ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca Bivalvia). **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 331-350. 1976.

NAVARRO, J.M., et al. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 247, p. 67-83. 2000

NAVARRO, J.M.; GONZALEZ, C.M. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. **Aquaculture**, v. 167, p. 315-327. 1998

NAVARRO, J.M. Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos. *In*: MAEDA-MARTINZ A. N. ed. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. Mexico, Editorial Limusa, v. 1, p.61-76. 2001.

PALACIOS, E., et al. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis I. Fatty acids. **Aquaculture**, v. 250, p. 270-282. 2005.

PECHENIK, J.A., et al. The influence of food concentration and temperature on growth and morphological differentiation of blue mussel *Mytilus edulis* L. larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 136, p. 47-64. 1990.

PESO, M.C. **Bivalves comestíveis da Baía de Todos os Santos: estudo quantitativo com especial referência a *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae)**. 1980 174p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1980.

PEZZUTO, P.R.; ECHTERNACHT, A.M. Avaliação de impactos da construção da Via Expressa SC-Sul sobre o berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Pelecypoda) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubá (Florianópolis, SC – Brasil). **Atlântica**, v. 21, p. 105-119. 1999.

PULVENIS, J.F. 2012. Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets. *In*: **FAO Fisheries and Aquaculture Department (online)**. Rome. Updated 9 July 2012. (acessado em 12 de fevereiro de 2014) <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>.

RAJESH, K.V.; MOHAMED, K.S.; KRIPA, V. Influence of algal cell concentration, salinity and body size on the filtration and ingestion rates of cultivable Indian bivalves. **Indian Journal of Marine Science**, v. 30, p. 87-92. 2001.

RIOS, E. C. **Compendium of brazilian sea shells**. Rio Grande, RS. Evangraf, 2009.

ROBERT, R.; HIS, E.; DINET, A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the European flat oyster *Ostrea edulis*. **Marine Biology**, v. 97, p. 95-100. 1988.

ROBINSON, A. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. **Aquaculture**, v. 106, p. 89-97. 1992.

RODRIGUES, A.M., et al. Distribuição e abundancia do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) nas praias da região estuarina do rio Apodi/Mossoró/RN. In: III Congresso Brasileiro de Oceanografia-CBO, I Congresso Ibero-Americano de Oceanografia, 2008 Fortaleza, **Resumos...** Fortaleza, 2008.

SANTOS, J.M.; DOWNING, S.L.; CHEW, K.K.; Studies on the effects of water temperature on the sexual development of adult Olympia oysters, *Ostrea lurida*. **World Aquaculture**, v. 24, p. 43-46. 1993.

SASTRY, A. N. The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. **Physiological Zoology**, v. 41, p. 44-53. 1968.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin,1791). Mollusca:Bivalvia), na Praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo.** 1976. 119 f. Tese (Doutorado em Zoologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Análise populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), na Praia do Saco do Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, v. 29, p. 351-355. 1980.

SCHEEL-YBERT, R., et al. Novas perspectivas na reconstrução do modo de vida dos sambaqueiros: uma abordagem multidisciplinar. **Revista de Arqueologia**, v. 16, p. 109-137. 2003

SHUMWAY, S.E. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. **Marine Biology**, v. 41, p. 153-177. 1977.

SILVA-CAVALCANTI, J.; COSTA M. F. Fisheries of *Anomalocardia brasiliiana* in tropical estuaries. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 6, p. 86-99. 2011

SILVA-CAVALCANTI, J. S.; COSTA, M. Fisheries in Protected and Non-Protected areas: What is the difference? The case of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) at tropical estuaries of Northeast Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 56, p. 1454-1458. 2009.

SOMERO, G.N.; BOWLUS, R.D. Osmolytes and metabolic end products of molluscs: the design of compatible solute systems. In: Hochachka, P.W. ed., **The Mollusca**. New York, Academic Press Inc., v. 1, p. 77-100. 1983

- SOMERO, G.N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 780–789. 2002.
- SOUTHGATE, P.C. Pearl oyster culture. In: SOUTHGATE, P.C.; LUCAS, J. eds. **The pearl Oyster**. Elsevier, v. 1, p. 231-272. 2008
- SÜHNEL, S., et al. Effect of the fatty acid EPA e DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). **Aquaculture**, v. 330-333, p. 167-171. 2012
- TANG, B., et al. Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*. **Aquaculture**, v. 254, p. 526-533. 2006.
- THOMPSON, P.A., et al. Effects of variation in temperature on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 24, p. 488-497. 1992
- THOMPSON, P.A.; GUO, M.X.; HARRISON, P.J. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*). **Marine Biology**, v. 117, p. 259-268. 1993.
- THOMPSON P.A.; GUO M.X.; HARRISON P.J. Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 143, p. 379–391. 1996.
- TOBIAS-SILVA, M.M. 1957. Moluscos comestíveis do Brasil. **An. Farm. Quim.** v. 8(5/6), p.5-13.
- TORKILDSEN, L., et al. Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae. **Aquaculture**, v. 185, p. 1–12. 2000.
- TORKILDSEN, L.; MAGNESEN, L. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) survival in different rearing systems. **Aquaculture International**, v. 12, p. 489–507. 2004.
- UTTING, S.D.; MILLICAN, P.F.; Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. **Aquaculture**, v. 155, p. 45-54. 1997.
- VAN DER HAVE, T.M. A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. **OIKOS**, v. 98, p. 141–155. 2002

WANG, W.X.; WIDDOWS, J. Physiological responses of mussel larvae *Mytilus edulis* to environmental hypoxia and anoxia. **Marine Ecology Progress Series**, v. 70, p. 223-236. 1991.

WIDDOWS, J.; JOHNSON, D. Physiological energetics of *Mytilus edulis* scope for growth. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, p. 113-121. 1988.

YAN, X.; ZHANG, G.; YANG, F. Effects of diet, stocking density and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. **Aquaculture**, v. 253, p. 350-358. 2006.