

# **Otimização do cultivo de espécies nativas europeias de bivalves em maternidade**

**Beatriz Rocha Lopes**

2025

# **Otimização do cultivo de espécies nativas europeias de bivalves em maternidade**

**Beatriz Rocha Lopes**

Dissertação para o grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Baptista e do  
Gerente da Maternidade Maximilien Maugan

2025

## Agradecimentos

A elaboração deste trabalho foi possível graças à minha dedicação e empenho, mas sobretudo ao apoio de várias pessoas e instituições, a quem deixo o meu sincero agradecimento.

Agradeço à minha orientadora Professora Especialista Teresa Baptista, não só pela orientação científica, disponibilidade e contributos valiosos para a melhoria deste trabalho, mas também pelo apoio prestado na articulação com a empresa e pela ajuda determinante para que este estágio fosse possível. Ao meu orientador Maximilien Maugan, Gerente da maternidade Oceano Fresco, pela orientação científica e técnica, pela disponibilidade constante e pelo acompanhamento próximo, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Torres, Técnica Sénior da Oceano Fresco, que confiou em mim desde o primeiro dia e me deu liberdade para aprender, evoluir e crescer a nível profissional. A sua confiança, apoio e incentivo marcaram profundamente a minha experiência de estágio, e por isso estarei sempre muito grata. Expresso igualmente a minha gratidão a todos os meus colegas e amigos da Oceano Fresco, que contribuíram para tornar este estágio não só mais leve, mas também profundamente enriquecedor. Para além dos momentos de boa disposição partilhados, aprendi imenso convosco e guardo com carinho cada experiência vivida.

Às minhas amigas do Túlio, agradeço por, apesar da distância, estarem sempre presentes. A vossa amizade de longa data foi e será sempre um refúgio para mim. À minha amiga Catarina Clemente, a amiga do coração que a faculdade me trouxe. És a minha versão morena, a minha *yellow person*, e a tua amizade tem sido uma das maiores dádivas deste percurso. À Catarina Abrantes, a minha amiga e madrinha de faculdade, agradeço pelo apoio e, sobretudo, pelo seu humor único. Aos meus colegas de casa, agradeço pela companhia diária e pela animação constante que encheu os meus dias de boas memórias. Aos meus colegas de trabalho, agradeço pela compreensão e pelo apoio ao longo da conclusão desta etapa. Ao meu chefe, Paulo Frias, manifesto a minha sincera gratidão pela confiança, pela disponibilidade e pelo encorajamento constantes. Para além de me dar condições para prosseguir a escrita, estive sempre presente nos momentos mais difíceis, incentivando-me e assegurando que eu não desistisse.

Ao Ricardo, agradeço pelo carinho constante, pela paciência infinita e pelo amor que me acompanha todos os dias. És uma parte essencial deste caminho e desta conquista.

À minha família, o meu porto seguro, estou eternamente grata pela presença constante ao longo de todo este percurso. A vossa dedicação e apoio foram determinantes e são o alicerce mais importante da minha vida. À minha mãe e ao meu pai, pelo amor incondicional e por todo o apoio psicológico, emocional e financeiro que me sustentou ao longo deste percurso. Graças a vocês, consigo hoje celebrar esta conquista. A ti mãe, deixo um agradecimento muito especial. Sempre presente, soubeste-me orientar nas indecisões e acrescentar sempre uma palavra de valor. A tua resiliência perante as adversidades inspira-me diariamente e recorda-me que ser boa pessoa vale mais do que qualquer estatuto profissional, sendo esse o ensinamento mais importante que levo para a vida. À minha irmã mais velha, Catarina, a minha chorona, que nunca esconde as lágrimas sempre que me vê partir. O teu carinho mostra-me o quanto és especial e a sorte imensa que tenho em ter-te na minha vida.

Por último, quero agradecer à minha avó Antónia, a minha alma gémea e confidente. Sou eternamente grata pelo apoio incondicional, pelas horas infinitas de conversa, pela comida preparada sempre com o maior carinho e por estares presente em cada etapa da minha vida. És o pilar da nossa família e uma inspiração diária para mim. Devo-te muito, pois, mesmo quando

a vida não foi justa contigo, escolheste viver sempre em prol da família, mostrando-me o verdadeiro significado de amor, entrega e resiliência.

No final desta longa caminhada, reconheço que esta conquista não me pertence apenas a mim, mas a todos os que, de uma forma ou de outra, foram o meu apoio e inspiração.

## Resumo

O crescimento da população mundial e a sobre-exploração dos recursos marinhos tornam urgente encontrar alternativas viáveis para garantir proteína animal sustentável e acessível. Os bivalves assumem particular relevância por aliarem elevado valor nutricional a baixo impacto ambiental, característico de espécies de nível trófico reduzido. Em Portugal, um dos maiores consumidores mundiais de produtos do mar, a produção nacional cobre menos de metade da procura, reforçando a importância do cultivo de bivalves.

Tradicionalmente dependente da apanha de sementes em bancos naturais, a produção de bivalves recorre hoje a maternidades, que asseguram fornecimento contínuo de juvenis e reduzem a pressão sobre os stocks selvagens. Este modelo contribui para a sustentabilidade dos ecossistemas costeiros, mas enfrenta desafios como a variabilidade no fornecimento de sementes, a suscetibilidade a doenças e a necessidade de um controlo rigoroso das condições ambientais.

Este trabalho descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio na maternidade da Oceano Fresco, centrado na produção das espécies nativas de amêijoia europeia *Venerupis corrugata* e *Ruditapes decussatus*. O estágio envolveu as principais etapas da produção, incluindo o acondicionamento de reprodutores, desova, cultivo larvar e o cultivo de microalgas, bem como o acompanhamento microbiológico e a aplicação de medidas de biossegurança. É também apresentado um ensaio experimental com sementes de *V. corrugata* em sistema *upweller*, no qual foram testadas diferentes densidades iniciais. Os resultados demonstraram que densidades intermédias, em particular 280 g de sementes por crivo, proporcionaram maior eficiência produtiva, conciliando crescimento e uniformidade. O estudo confirma que a densidade inicial é um fator determinante para otimizar a produção de sementes de bivalves em maternidade.

**Palavras-chave:** Aquacultura, Maternidade de bivalves, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis corrugata*, Oceano Fresco.

## Abstract

The growth of the world population and the overexploitation of marine resources make it urgent to find viable alternatives to ensure sustainable and affordable animal protein. Bivalves are particularly important because they combine high nutritional value with low environmental impact, characteristic of species with a low trophic level. In Portugal, one of the world's largest consumers of seafood, domestic production covers less than half of demand, reinforcing the importance of bivalve farming.

Traditionally dependent on seed collection from natural beds, bivalve production now relies on hatcheries, which ensure a continuous supply of juveniles and reduce pressure on wild stocks. This model contributes to the sustainability of coastal ecosystems, but faces challenges such as variability in seed supply, susceptibility to disease, and the need for strict control of environmental conditions.

This paper describes the activities carried out during the internship at the Oceano Fresco hatchery, focusing on the production of the native European clam species *Venerupis corrugata* and *Ruditapes decussatus*. The internship involved the main stages of production, including the conditioning of broodstock, spawning, larval cultivation, and microalgae cultivation, as well as microbiological monitoring and the application of biosafety measures. An experimental trial with *V. corrugata* seeds in an upweller system is also presented, in which different initial densities were tested. The results showed that intermediate densities, in particular 280 g of seeds per screen, provided greater production efficiency, combining growth and uniformity. The study confirms that initial density is a determining factor in optimizing the production of bivalve seeds in hatcheries.

**Keywords:** Aquaculture, Bivalve hatchery, *Ruditapes decussatus* , *Venerupis corrugata* , Oceano Fresco.

# Índice

<b>1. Introdução .....</b>	<b>4</b>
1.1. Aquacultura no mundo .....	4
1.2. Aquacultura em Portugal .....	6
1.3. Sustentabilidade ambiental da aquacultura .....	7
1.4. A importância dos moluscos bivalves .....	9
1.5. O potencial da Aquacultura de moluscos bivalves .....	10
1.6. Produção de amêijoas em aquacultura .....	13
1.7. Morfologia, reprodução e ciclo de vida dos moluscos bivalves .....	14
1.7.1. Amêijoas-macha ( <i>Venerupis corrugata</i> (Gmelin, 1791)) .....	19
1.7.2. Amêijoas-boas ( <i>Ruditapes decussatus</i> (Linnaeus, 1758)) .....	20
1.8. Cultivo de alimento vivo – microalgas .....	22
<b>2. Descrição do local de estágio .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Desenvolvimento do programa de estágio (descrição dos trabalhos efetuados) .....</b>	<b>29</b>
3.1. Abastecimento, armazenamento e tratamento de água .....	29
3.2. Circulação hidráulica .....	30
3.3. Sala do Inóculo de microalgas .....	31
3.4. Sala dos Sacos .....	37
3.5. Sala do <i>Batch</i> .....	39
3.6. Sala dos reprodutores .....	42
3.6.1. Receção e acondicionamento dos reprodutores .....	42
3.7. Desova .....	44
3.8. Sala do pós-larvário .....	50
3.9. Sala da Semente .....	51
4. Programas de melhoramento seletivo .....	54
<b>5. Otimização da produtividade do cultivo de sementes de amêijoas no sistema <i>Upweller</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>58</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>58</b>
5.1. Introdução .....	59
5.2. Metodologia .....	60
5.2.1. Sistema de cultivo e montagem experimental .....	60
5.2.2. Desenho experimental .....	60

5.2.3.	Recolha e análise dos dados.....	63
5.3.	Resultados.....	64
5.4.	Discussão .....	67
5.5.	Conclusão.....	69
<b>6.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>70</b>

## Índice de Figuras

Figura 1- Produção mundial de animais aquáticos de pesca e aquacultura de animais (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024). .....	5
Figura 2 - Volume de produção em aquacultura, por espécie de molusco (Fonte: INE, 2024). ....	7
Figura 3 - Produção de Aquacultura em Portugal (Fonte: INE, 2024). .....	7
Figura 4 - Produção mundial de Aquacultura de moluscos (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024). .....	11
Figura 5 - Consumo aparente de alimentos de animais aquáticos por grupo de espécies principais, 1961 e 2021 (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024). .....	12
Figura 6 - Ciclo de produção de bivalves em aquacultura (fonte: FAO, 2009 - <i>Venerupis corrugata</i> (Montagu, 1803) [Veneridae]). .....	14
Figura 7 - Características externas e internas de um bivalve (Fonte: FAO - Bivalves–Bailey-Matthews Shell Museum, Florida, USA). .....	15
Figura 8 - Anatomia geral de um bivalve (Fonte: FAO - Bivalves–Bailey-Matthews Shell Museum, Florida, USA). .....	16
Figura 9 -Ciclo de vida de uma amêijoia (Fonte: da Costa et al. (2019) - Cultivo de bivalves em maternidade e critérios para a sua localização). .....	18
Figura 10 - Caraterísticas externas e internas das valvas da concha de amêijoia-macha, <i>Venerupis corrugata</i> (Fonte: FAO, 2009 - <i>Venerupis corrugata</i> (Montagu, 1803) [Veneridae]). ..	20
Figura 11 - Caraterísticas externas e internas das valvas da concha de amêijoia-boia, <i>Ruditapes decussatus</i> (Fonte: ICTIOTERM - <i>Ruditapes decussatus</i> (Linnaeus, 1758)). .....	21
Figura 12 - Crescimento padrão de uma cultura de microalgas. 1 - fase lag ou de latência; 2 - fase de crescimento exponencial; 3 - fase de desaceleração no crescimento; 4 - fase estacionária; 5 - fase de morte. ....	23
Figura 13 - Etapas da produção de microalgas (Fonte: Helm et al., 2004 - The hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO). .....	24
Figura 14 - Sistemas de cultivo de microalgas à escala laboratorial (A-D), em sistema fechado (E-I) e em sistema fechado (J e K) (Fonte: Pinto et al., 2021 - Microalgae – cultivation, recovery of compounds and applications). .....	25
Figura 15 - Localização da empresa Oceano Fresco no Porto de Abrigo da Nazaré (Fonte: Google Maps).....	28
Figura 16 - Localização do ponto de extração de água salgada (Fonte: Oceano Fresco). .....	29
Figura 17 - Estação de Tratamento da água no exterior da maternidade. A. Reservatórios; B. Filtros de areia; C. Filtros de cartucho e D. Luzes Ultravioleta. ....	30
Figura 18 - Esquema da repicagem de inóculos (Fonte: Ferreira, 2009 - Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos.) .....	31
Figura 19 - Representação esquemática das áreas de contagem da câmara de Neubauer (Fonte: Soares, 2020 - Projeto e desenvolvimento de microfermentadores monitorados por sensor de fibra óptica). .....	33
Figura 20 - Processo de divisão das culturas de microalgas. A. Adição de nutrientes; B. Transferência da cultura antiga para os novos balões; C. Colocação na prateleira para crescimento; D. Adição de meio fresco; E. Transferência da cultura antiga para os novos Erlenmeyers e F. Colocação na estante para crescimento. ....	34
Figura 21 - Processo de divisão das culturas de microalgas: inoculação em linha.....	35

Figura 22 - Diluições decimais seriadas para inoculação de placas de Marine Agar e inoculação de placas de TCBS, através da amostra pura.....	36
Figura 23 - Preparação do material necessário para procedimentos microbiológicos na câmara de fluxo laminar.....	36
Figura 24 - Sistema de entrada de água e colheita de microalgas da sala dos sacos: 1. Distribuição da água pelas linhas; 2. Distribuição da água por cada saco; 3. Colheita de microalgas e 4. Recolha da colheita de microalgas.....	37
Figura 25 - Estação de tratamento da água da sala dos sacos. 1. Filtros de cartucho; 2. Permutador; 3. Pasteurizador; 4. Tanque dos nutrientes; 5. Injeção de dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ). .....	37
Figura 26 - Inoculação em linha na sala dos sacos. A. Entrada do ar; B. Saída do ar e C. Entrada da cultura. ....	38
Figura 27 - Procedimentos de preparação e inoculação de tanques na sala do Batch. ....	41
Figura 28 - Procedimento de inoculação de tanques na sala do Batch com o fotobiorreator (PBR). .....	42
Figura 29 - Acondicionamento dos reprodutores. ....	43
Figura 30 - Observação do estado de maturação de indivíduos da espécie de amêijoia-boia ( <i>R. decussatus</i> ). .....	45
Figura 31 - Fotografias de esfregaço de gónada de amêijoia-macha ao microscópio ótico: (A) fêmea no estado 3, madura e (B) macho no estado 3, maduro.....	45
Figura 32 - Recolha e armazenamento dos reprodutores no dia anterior à desova: (A) e (B) Colocação de placas de gelo e papel cartão na caixa; (C) Limpeza dos indivíduos; (D) Recolha e separação por lotes em sacos de rede; (E) e (F) Acondicionamento dos reprodutores na caixa com panos húmidos. ....	46
Figura 33 - Indução da desova em indivíduos de amêijoia-boia, <i>Ruditapes decussatus</i> . (A) Preparação dos tanques; (B) Acondicionamento das amêijoas; (C) libertação de gametas masculinos na água; (D) Estímulo à desova; (E) Drop do tanque e (F) Recolha dos ovos.....	47
Figura 34 - Quantificação dos ovos de amêijoia-boia, <i>R. decussatus</i> . (A) e (B) Contagem na câmara de Sedgwick-Rafter e (C) Colocação dos ovos no novo tanque (2000 L). ....	47
Figura 35 - Fotografias ao microscópio de luz do desenvolvimento embrionário de <i>V. corrugata</i> . 1: Oócito não fertilizado. 2: Estádio de 2 células. 3: Estádio de 4 células. 4: Estádio de 8 células. 5: Estádio de 16 células. 6: Estádio de 32 células. 7: Estádio de 64 células. 8: Blástula. Barra de escala: 20 µm (Fonte: Cerviño, 2011 - Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa <i>Venerupis corrugata</i> (Montagu, 1803)). .....	49
Figura 36 - Pós-larvas de amêijoia-macha ( <i>V. corrugata</i> ). (A) Medição do comprimento total da concha. Tamanho da concha: 310 µm; (B) Avaliação do estômago e dos lípidos. ....	51
Figura 37 - Cilindros de cultivo pós-fixação em sistema de downwelling e upwelling (Fonte: Hadley & Whetstone, 2007 - Hard clam hatchery and nursery production). ....	52
Figura 38 - Sistema de Upweller na sala da semente.....	53
Figura 39 - Pesagem e contagem da semente.....	54
Figura 40 - Procedimentos para a obtenção da desova. (A) e (B) indução de choque térmico; (C) e (D) adição de estímulos de fitoplâncton e esperma de machos sacrificados; (E) separação de machos e fêmeas em goblets; (F) e (G) contagem do número de ovos obtidos na câmara de Sedgwick-Rafter e (H) colocação dos ovos no tanque.....	57
Figura 41 - Exemplares de <i>V. corrugata</i> durante a indução da desova. (A) fêmea a emitir oócitos e (B) macho a emitir esperma. ....	58
Figura 42 -Montagem do sistema experimental com dois upwellers e oito crivos circulares. ...	60

Figura 43 - Representação esquemática do desenho experimental adotado no estudo. (A-D) Sistema de Upweller, composto por duas caixas principais. Header tank (Tanque central) conectado às duas caixas. Setas azuis correspondem à circulação do mix (água mais o alimento). .....	61
Figura 44 - Crivagem do lote de sementes usado nos ensaios.....	62
Figura 45 - Pesagem do lote e contagem do número de sementes vivas e mortas. ....	63
Figura 46 - Produção mensal de biomassa (em gramas) sob diferentes densidades iniciais de cultivo. Os diferentes tons de azul representam os ensaios realizados. ....	65
Figura 47 - Percentagem de ganho mensal de biomassa sob diferentes densidades iniciais de cultivo. As barras indicam a eficiência relativa da produção em função da biomassa. ....	66
Figura 48 - Correlação entre os residuais (cel/ mL) e a concentração de clorofila total ( $\mu\text{g/ L}$ ). 67	

## Índice de tabelas

Tabela I - Principais classes, géneros e espécies de microalgas utilizadas como alimento vivo nas diferentes fases de desenvolvimento de bivalves (Fonte: Brown & Blackburn (2013) - Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. Advances in aquaculture hatchery technology 117-158e.) .....	27
Tabela II - Descrição de cada nível de maturação avaliado a fresco (Escala de avaliação fornecida pela Oceano Fresco).....	44
Tabela III - Estádios embrionários e larvares de <i>V. corrugata</i> (Fonte: Cerviño, 2011 - Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa <i>Venerupis corrugata</i> (Montagu, 1803)). .....	48
Tabela IV - Peso por amostra a contar consoante o tamanho das amêijoas.....	54
Tabela V - Densidades iniciais (g/crivo) utilizadas nos quatro ensaios experimentais.....	61
Tabela VI - Resumo dos parâmetros experimentais (Ensaio 1) utilizados para caracterizar as condições de cultivo em sistema de upweller. ....	61
Tabela VII - Média e desvio-padrão da Produção de biomassa por mês em diferentes densidades iniciais de cultivo. ....	65
Tabela VIII - Média e desvio-padrão do ganho de biomassa por mês em diferentes densidades iniciais de cultivo. ....	66

## 1. Introdução

### 1.1. Aquacultura no mundo

A aquacultura é definida pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), como a produção de organismos aquáticos, tais como: peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, em condições controladas. Com a estagnação da pesca marinha, o aumento da população e, conseqüentemente, a crescente procura de produtos do mar, a produção aquícola tem registado um enorme crescimento, representando 49,2% da produção mundial total em 2020 (Samat *et al.*, 2024). Este crescimento da produção aquícola tem sido essencial para dar suporte ao aumento do consumo de produtos do mar *per capita* nas últimas décadas (Guillen *et al.*, 2025). Dada a forte tendência de crescimento do consumo alimentar global, prevê-se que a aquacultura continue a aumentar nas próximas décadas, especialmente se os produtos do mar forem desempenhar um papel significativo na resposta aos desafios da segurança alimentar global e da malnutrição. Para além de poder fornecer alimentos sustentáveis e altamente nutritivos, com impactos positivos na saúde pública, a aquacultura pode contribuir para o setor económico do país, e para a criação de emprego (Guillen *et al.*, 2025).

Nos próximos trinta anos, a humanidade enfrentará o enorme desafio de fornecer nutrição segura e adequada a uma população mundial estimada em 9,7 mil milhões até 2050 (Ferreira *et al.*, 2020). De acordo com as últimas estatísticas mundiais sobre aquacultura, compiladas pela *Food and Agriculture Organization*, a produção total da pesca e da aquacultura atingiu um recorde histórico de 223,2 milhões de toneladas em 2022, 185,4 milhões de toneladas (peso vivo equivalente) de animais aquáticos e 37,8 milhões de toneladas (peso húmido) de algas, correspondendo a um aumento de 4,4 por cento em relação a 2020. Sessenta e dois por cento dos animais aquáticos foram colhidos em áreas marinhas (69% da pesca e 31% da aquacultura) e 38% em águas interiores (84% da aquacultura e 16% da pesca de captura). Os países asiáticos produziram 70% dos animais aquáticos, seguidos pelos países da Europa e da América Latina e Caraíbas (9% cada), África (7%), América do Norte (3%) e Oceânia (1%). A China continua a ser o maior produtor (36%), seguida pela Índia (8%), Indonésia (7%), Vietname (5%) e Peru (3%) (FAO, 2024).

Em 2022, segundo a FAO a produção de espécies animais provenientes da aquacultura (51%) ultrapassou pela primeira vez a da pesca de captura, com a aquacultura interior a produzir 62,6% do total de animais aquáticos (Figura 1). O aumento global (76%) a partir de 2020 ocorreu principalmente na Ásia (87,9%), seguido pela América Latina e Caraíbas (7,3%), Europa (3,5%) e África (0,8%). Este aumento ocorreu principalmente na aquacultura de peixes (58,1%), seguida pelos crustáceos (24,6%) e moluscos (15,6%). A produção aquícola mundial atingiu um novo recorde de 130,9 milhões de toneladas em 2022, avaliada em 313 mil milhões de dólares e compreendendo 94,4 milhões de toneladas de animais aquáticos e 36,5 milhões de toneladas de algas. A Ásia contribuiu com 91,4% do total geral, seguida pela América Latina e Caraíbas (3,3%), Europa (2,7%), África (1,9%), América do Norte (0,5%) e Oceânia (0,2%). Dez países líderes (China, Indonésia, Índia, Vietname, Bangladesh, Filipinas, República da Coreia, Noruega, Egito e Chile) produziram 89,8% do total (FAO, 2024).

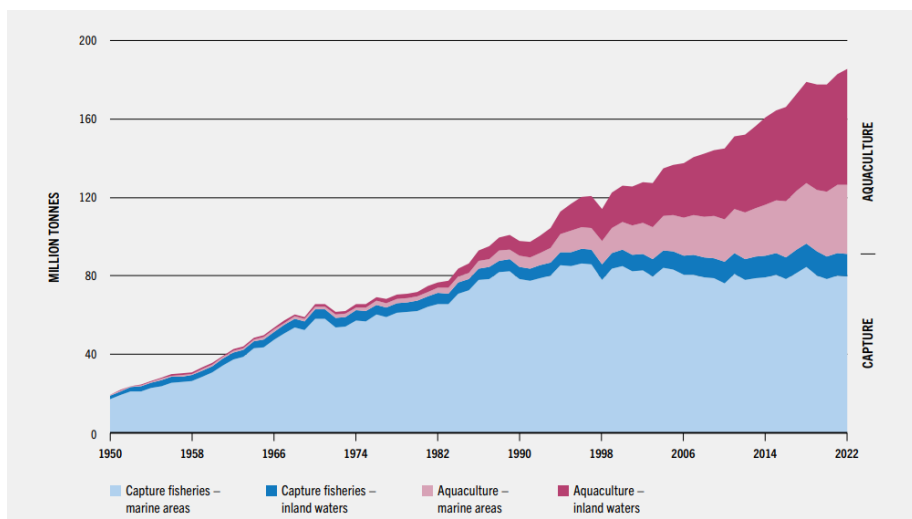


Figura 1- Produção mundial de animais aquáticos de pesca e aquacultura de animais (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024).

Recentemente, a Estratégia Nacional para o Mar 2021-2030 e o seu plano de ação – Plano Mar Portugal (PMP) – estabelecem, para a Área Programática da Aquacultura, o objetivo de fomentar a atividade em linha com o crescimento do consumo e segundo uma matriz de desenvolvimento regional, visando alinhar a produção com as necessidades de mercado. De acordo com o mesmo plano, a nível mundial verifica-se um aumento da procura de produtos da pesca e da aquacultura, assistindo-se, sobretudo desde o final do século XX, a uma substituição gradual dos produtos de captura pelos de aquacultura. Na Europa, apesar do crescimento e modernização do setor, apoiados por fundos públicos e pelo contributo técnico e científico das instituições de investigação, a aquacultura ainda não alcança volumes de produção que permitam contribuir de forma significativa para o abastecimento do mercado. No caso específico dos moluscos bivalves, o plano refere que existem poucas diferenças entre os métodos de produção convencionais e biológicos, o que facilita a transição entre sistemas. Contudo, esta mudança implica custos acrescidos e maior carga administrativa. A ausência de incentivos de mercado robustos, seja através de prémios de preço ou de maior procura por parte dos consumidores, constitui, assim, uma barreira relevante ao crescimento da produção biológica neste segmento.

A distinção entre aquacultura convencional e aquacultura biológica é fundamental para compreender as diferentes práticas de produção existentes. De acordo com Marques (2019), na aquacultura convencional, as práticas de cultivo garantem as necessidades e desenvolvimentos dos animais (bem-estar, qualidade da água, alimentação, teor de oxigénio, alimentação, etc.), enquanto que, a aquacultura biológica, consiste na produção de animais aquáticos tais como camarão, peixes, bivalves, etc. e plantas aquáticas, sem a utilização de antibióticos, químicos e fertilizantes de maneira a contribuir para a preservação do ecossistema e da biodiversidade. Mais especificamente, de acordo com o novo regulamento (EU) n.º 2018/848 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de maio de 2018, a aquacultura biológica baseia-se em diversos princípios, tais como: i) a utilização responsável da energia e dos recursos naturais, tais como a água, os solos, a matéria orgânica e o ar; ii) a produção de produtos aquícolas de elevada qualidade que respondam à procura, por parte dos consumidores, de bens produzidos por processos que não

sejam nocivos para o ambiente, saúde humana ou a saúde e bem-estar animal; iii) a conceção e gestão adequadas de processos biológicos baseados em sistemas ecológicos que utilizem recursos naturais internos ao sistema de gestão, utilizando métodos que pratiquem a aquacultura respeitando o princípio de exploração sustentável dos recursos aquáticos, excluam a utilização de produtos obtidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGM); e iv) se baseiem na avaliação dos riscos, bem como na utilização de medidas de precaução e preventivas.

## 1.2. Aquacultura em Portugal

Em Portugal, a aquacultura tem vindo a afirmar-se como um setor estratégico para o abastecimento de pescado, complementando a produção proveniente da pesca de captura (DGRM, 2024). As espécies mais cultivadas incluem a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), o linguado (*Solea senegalensis*), a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bem como moluscos bivalves como a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) e o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) (EUMOFA, 2023; Rocha *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, a produção nacional tem registado uma tendência de crescimento, acompanhando a procura global por produtos aquícolas. No entanto, a aquacultura europeia, apesar do apoio público e científico, ainda não alcançou volumes de produção suficientemente relevantes para reduzir de forma significativa a dependência das importações (Rocha *et al.*, 2022). O setor enfrenta também desafios relacionados com a disponibilidade de áreas costeiras, a concorrência com outras atividades económicas e os processos de licenciamento. A aposta em novas tecnologias de mar aberto, sobretudo na produção de peixes e moluscos bivalves, é apontada como alternativa para aliviar a pressão sobre as zonas tradicionais de cultivo próximas da costa, menos sujeitas a impactos ambientais locais (EUMOFA, 2023 & FAS/USDA, 2021).

A produção de moluscos em aquacultura (10 151 toneladas) aumentou 11,3%, tendo representado 53,9% da produção total aquícola, face a 50,8% em 2021 (INE, 2024). O ano 2022 viu crescer o volume das principais espécies, com as amêijoas a atingirem as 4 346 toneladas (+21,2%), tendo reforçado a sua posição na estrutura de produção dos moluscos (+3,5 p.p.). Seguiram-se os mexilhões, com 3 189 toneladas (+4,8% face a 2021) e em terceiro lugar as ostras (2 465 toneladas), que viram também a sua produção aumentar 7,5% face ao ano anterior (INE, 2024) (figura 2). Em 2022, a produção total aquícola em Portugal ascendeu às 18 822 toneladas, um aumento de 4,8%, face a 2021. As vendas geraram uma receita de 159,8 milhões de euros (157,1 milhões de euros em 2021), o que refletiu um acréscimo de 1,7%, tendo as quantidades vendidas registado uma redução de 8,2%. O total das vendas (16 116 toneladas) foi 14,4% inferior à produção nacional do ano em análise (figura 3).

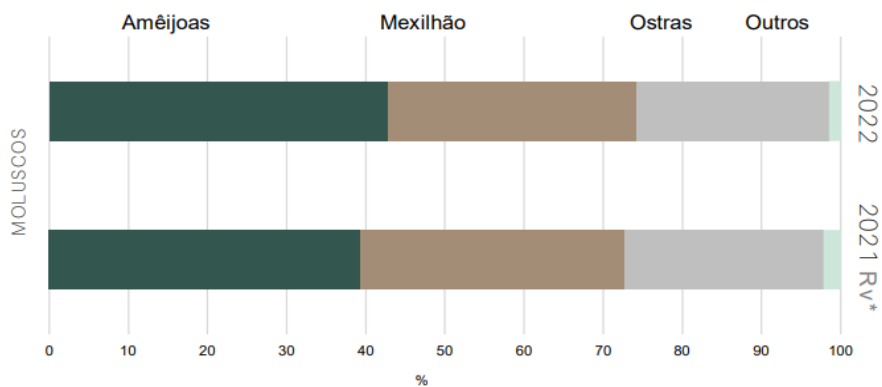


Figura 2 - Volume de produção em aquacultura, por espécie de molusco (Fonte: INE, 2024).

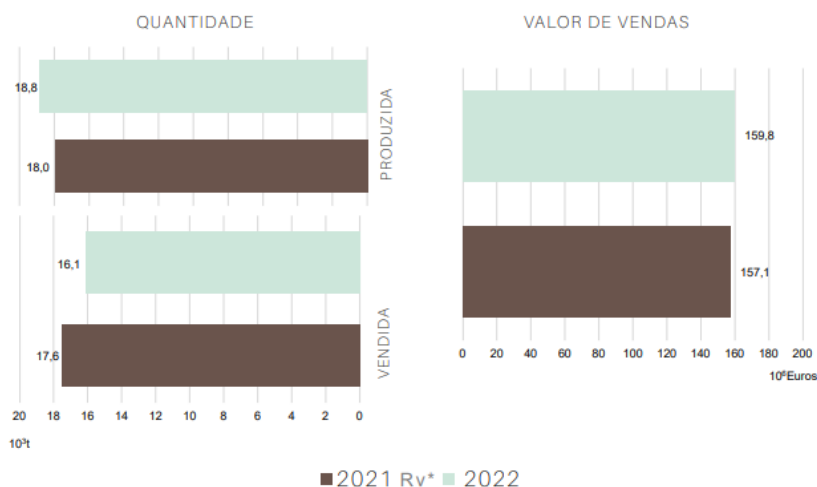


Figura 3 - Produção de Aquacultura em Portugal (Fonte: INE, 2024).

### 1.3. Sustentabilidade ambiental da aquacultura

A aquacultura desempenha um papel fundamental no que diz respeito à produção de organismos, mas inerente ao aumento e intensificação da produção, têm surgido diversos impactos negativos como o aparecimento de doenças provocadas pelo não cumprimento das regras e pelo deficiente manuseio. Tendo em conta o nível de exigência imposto por parte dos consumidores, não basta produzir de forma massiva, é também necessário produzir produtos de qualidade e seguros, seguindo técnicas de produção sustentáveis que não afetem o bem-estar animal (Pires, 2018). À medida que a produção aquícola aumenta para atender à crescente demanda em produtos do mar, estes impactos ambientais tendem a aumentar, como foi observado com muitas tecnologias de produção de alimentos. Estes impactos variam significativamente entre espécies, tecnologias de produção e sistemas de governança, e são menores do que para a maioria das outras proteínas animais (Guillen *et al.*, 2025). Em geral, as práticas de aquacultura são reconhecidas como tendo uma grande importância para a produção de proteína de elevado valor nutricional, com e um reduzido custo ambiental. No entanto, face ao aumento da produção aquícola, traduzida pela intensificação dos sistemas de produção, o impacto ambiental assumiu-se como um dos principais fatores condicionantes do desenvolvimento sustentado desta indústria, principalmente nas zonas costeiras de alguns

países (Peres, 2000). Torna-se, por isso, essencial que a aquacultura se desenvolva de forma sustentável, com respeito pelo ambiente, de forma a manter a sua viabilidade económica e assegurar a sua própria sobrevivência como atividade a longo prazo (Dinis & Rocha, 2021).

A segurança alimentar está intimamente ligada ao desenvolvimento socioeconómico e é especialmente crucial para países de baixa e média renda lidarem com a desnutrição. Entre as fontes de proteína disponíveis, os produtos aquáticos como peixes e crustáceos são considerados acessíveis e baratos. Assim, a aquacultura é um componente crítico no apoio à segurança alimentar (Mahari *et al.*, 2024). Atualmente, a aquacultura é uma indústria confrontada com o grande desafio de aumentar a produtividade sem prejudicar a qualidade do meio ambiente (Dinis & Rocha, 2021). O Plano Estratégico para a Aquicultura 2021-2030 pretende implementar boas práticas no que concerne à utilização nos estabelecimentos aquícolas de materiais recicláveis (não plástico), assim como uma adequada gestão e recolha de resíduos e subprodutos decorrentes da atividade. Os dejetos aquícolas são excretados sob a forma de sólidos suspensos e de compostos solúveis. Os sólidos suspensos resultam tanto da má gestão da alimentação (desperdício de alimento), quanto da utilização digestiva dos alimentos (perdas de origem fecal). A redução do desperdício de alimento implica uma gestão da alimentação que considere todos os fatores que influenciam a ingestão voluntária do animal, nomeadamente fatores ambientais (temperatura), fatores intrínsecos ao animal (ritmo e comportamento alimentar e velocidade do trânsito intestinal) e composição da dieta (dieta nutricionalmente equilibrada e densidade energética da dieta) (Peres, 2000).

A apanha de bivalves é fortemente condicionada pelas variáveis climáticas. As oscilações de salinidade e temperatura originam uma elevada variabilidade espacial e temporal nas capturas, resultando em perdas económicas significativas. Foram registados episódios de mortalidade acentuada em bancos naturais de bivalves. Estes episódios foram posteriormente analisados e conclui-se que as descidas de salinidade e as variações de temperatura da água foram os principais fatores responsáveis pela mortalidade. No entanto, embora a temperatura não seja o único fator ambiental que afeta os bivalves, constitui um dos principais e determinante que influenciam a fisiologia e a distribuição do habitat destes moluscos (Castro-Olivares *et al.*, 2022). Estudos realizados por Bae *et al.* (2021) corroboram que as alterações de temperatura ou salinidade, afetam o comportamento e a sobrevivência da amêijoia japonesa *Ruditapes philippinarum*, podendo refletir-se em taxas de mortalidade. A temperatura e a salinidade atuam não só como fatores de stress individuais, mas também como fatores combinados. Neste estudo, a temperatura, a salinidade e a interação entre ambas influenciaram significativamente a mortalidade e o fecho das valvas.

Dinis & Rocha (2021) referem que, para alcançar o desenvolvimento sustentável, é crucial harmonizar três elementos fundamentais: crescimento económico, inclusão social e proteção ambiental. Estes elementos estão interligados e são cruciais para o bem-estar dos indivíduos e das sociedades. O investimento em sistemas de produção sustentáveis para a aquacultura é uma alternativa que deve ser incentivada para garantir a proteção ambiental, que seja também economicamente viável e socialmente justa (Cavalli *et al.*, 2021). De acordo com Goulart (2024), olhando para os SDGs, *Sustainable Development Goals*, podemos considerar que a aquacultura, de alguma forma, consegue atingir quase todas as metas da Agenda 2030. Embora na definição dos SDGs, a ONU tenha vinculado a aquacultura ao SDG 14 - Conservar e usar de forma

sustentável os oceanos, mares e recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável, a aquacultura tem a possibilidade de contribuir para o cumprimento de vários SDGs, de acordo com a realidade atual de sua implementação, sendo o onde, o quê e como os principais gatilhos para as repercussões a serem enfrentadas. De facto, há muitas maneiras pelas quais a aquacultura pode contribuir para os SDGs da ONU, desde nutrição, erradicação da pobreza e desenvolvimento socioeconômico até sustentabilidade ambiental, já que as suas produções de baixo nível trófico têm baixa pegada ambiental e, ao mesmo tempo, podem contribuir para o sequestro de carbono. Também, Wijsman *et al.* (2019), referem que, para estimular o crescimento, a sustentabilidade das atividades de aquacultura é uma questão fundamental, isto porque, os aspetos ambientais para a aquacultura sustentável incluem a pesca em recursos de sementes, capacidade de carga, espécies invasoras e carga orgânica. Problemas de segurança alimentar devido a contaminantes ambientais e biotoxinas devem ser minimizados para aumentar a confiabilidade dos bivalves marinhos como uma fonte de alimento saudável e estimular as demandas do mercado. Programas de monitorização adequadamente projetados são ferramentas importantes para alcançar o crescimento sustentável da produção de bivalves marinhos. Por estes motivos, as estratégias de desenvolvimento da aquacultura incorporam muitas das recomendações constantes de códigos de prática de aquacultura responsável, verificando-se que no nosso País, as empresas e os profissionais deste subsector, partilham o mesmo tipo de preocupações e princípios defendidos pelos seus congéneres europeus. São evidentes os esforços de coordenação entre as autoridades, para direccionar o desenvolvimento e a aplicação de políticas, regulamentação e procedimentos, no sentido da sustentabilidade ambiental, económica e social da atividade de aquacultura (DGRM, 2024).

#### 1.4. A importância dos moluscos bivalves

Os bivalves são fundamentais para o desenvolvimento, funcionamento e sustentabilidade dos ambientes costeiros. Há muito que os moluscos são venerados pela beleza das suas conchas, pelos seus atributos culinários e por constituírem a base de diversas produções aquícolas de sucesso. Como filtradores altamente eficientes, os bivalves facilitam o acoplamento bentónico-pelágico, influenciam os processos sedimentares, fornecem estrutura e contribuem para a diversidade de hábitos e a biodiversidade. Embora o termo “serviços ecossistémicos” seja relativamente recente, o papel dos moluscos na prestação desses serviços é reconhecido há séculos. No entanto, só nas últimas décadas é que estes atributos foram estudados, quantificados, modelados e apresentados como parte integrante do desenvolvimento, manutenção e sustentabilidade dos ecossistemas (Wijsman *et al.*, 2019). Os bivalves marinhos são apreciados pelos consumidores devido aos seus benefícios nutricionais e ao seu sabor. Os bivalves são fontes saudáveis de energia e proteínas, ricos em vitaminas (A e D) e minerais essenciais (iodo, cálcio selénio), com baixo teor de gordura e uma boa fonte de ácidos gordos ómega-3 cujos benefícios para a saúde estão amplamente comprovados. Juntamente com seu efeito benéfico no meio ambiente e alto valor nutricional e teor de proteína, o cultivo de moluscos, especialmente o cultivo de bivalves (por exemplo, ostras), é considerada sustentável e uma indústria verde emergente. Além disso, devido aos métodos de cultivo mais simples em comparação com o cultivo de peixes, o cultivo comercial de moluscos é menos complexo para as comunidades iniciarem. Assim, a aquacultura de moluscos está a ser explorada como uma aquacultura comunitária que pode melhorar a segurança alimentar e os meios de subsistência costeiros (Wijsman *et al.*, 2019; Mahari *et al.*, 2024). Para além do seu valor atual nos

ecossistemas e na aquacultura, os bivalves destacam-se também pela sua trajetória evolutiva, que contribuiu significativamente para o seu domínio nos ambientes marinhos. O sucesso dos bivalves pode ser atribuído às suas taxas metabólicas, sendo estas de 3 a 10 vezes maiores do que as dos braquiópodes e a um sistema de tampão de cálcio-carbonato mais eficiente (Dame & Kenneth, 2011). Os bivalves influenciam o ciclo do carbono marinho através de três mecanismos principais. Primeiro, formam conchas de carbonato de cálcio a partir de iões de bicarbonato, processo conhecido como biocalcificação. Durante este processo pode ocorrer a libertação de CO<sub>2</sub>, mas as conchas constituem também potenciais reservatórios de carbono a longo prazo. Segundo, os bivalves realizam respiração, libertando CO<sub>2</sub> para a água e atmosfera, participando assim no ciclo do carbono inorgânico. Terceiro, ao alimentarem-se de fitoplâncton, zooplâncton e detritos orgânicos, removem carbono orgânico particulado (COP) da coluna de água e contribuem para a sua transferência e transformação ao longo da cadeia alimentar. Estes mecanismos estão associados a vários processos ecológicos e fisiológicos fundamentais — respiração, biocalcificação, alimentação, ingestão e excreção — que, em conjunto, determinam o papel dos bivalves na dinâmica do carbono (Liang *et al.*, 2024).

Os bivalves marinhos são também uma forma sustentável de produção alimentar. Por serem herbívoros, ocupam um nível trófico baixo. A posição trófica dos bivalves marinhos, como mexilhões, ostras, amêijoas e berbigões, é de 2 (herbívoros), enquanto a posição trófica média da pesca extrativa marinha é de 3,1. Em contraste com a aquacultura intensiva de peixes, a aquacultura de bivalves é uma forma extensiva, uma vez que estes se alimentam de algas que ocorrem naturalmente no ecossistema, não sendo adicionados quaisquer suplementos, como vitaminas ou antibióticos. A produção depende unicamente da produtividade natural do fitoplâncton marinho, seja sob a forma de algas vivas ou de detritos, transportados até aos bivalves pelo movimento da água, como as correntes e o fluxo das marés. Os bivalves podem ainda potenciar a produção primária através do aumento da reciclagem de nutrientes. No entanto, em densidades de cultivo elevadas, os bivalves podem provocar uma pressão excessiva sobre a produção primária, reduzindo a produção da mesma (Wijsman *et al.*, 2019). Além do fornecimento de alimentos, há um reconhecimento crescente dos benefícios ecossistémicos mais amplos da aquacultura de bivalves em águas costeiras, incluindo serviços de regulação como captura de carbono, remediação de nutrientes, defesa costeira e benefícios indiretos decorrentes de bancos de moluscos e recifes (van der Schatte Olivier *et al.*, 2020). De entre os principais motivos para a produção de bivalves, destaca-se o facto de: serem indivíduos filtradores, que se alimentam principalmente de fitoplâncton; a facilidade do seu cultivo; a sua tolerância a flutuações de vários fatores ambientais; e por serem apreciados gastronomicamente em diversos países (da Costa, 2018).

### 1.5. O potencial da Aquacultura de moluscos bivalves

A aquacultura de moluscos bivalves é uma prática antiga, que remonta, possivelmente ao início das civilizações egípcias e chinesas. Na Europa não é certo o início desta atividade, havendo relatos de que em Itália se iniciou no ano 1 a.C., ainda assim outros autores fazem referência a França no séc. XIII, mas só teve verdadeira importância económica a partir do séc. XIX. Em Portugal, a aquacultura de bivalves desenvolveu-se a partir do final desse século sobretudo com a produção extensiva tirando proveito de toda a riqueza existente na costa litoral. A partir de 1940 a moluscicultura começou a ter importância socioeconómica, principalmente pelo mercado de amêijoas-boas (*Ruditapes decussatus*) existente entre Portugal e França (Pires, 2018).

A produção global de bivalves marinhos para consumo humano é de mais de 15 milhões de toneladas por ano (período médio de 2010 a 2015), o que representa cerca de 14% da produção marinha total no mundo. A maior parte da produção de bivalves marinhos (89%) vem da aquicultura e apenas 11% vem da pesca selvagem. A Ásia, especialmente a China, é de longe o maior produtor de bivalves marinhos, respondendo por 85% da produção mundial e responsável pelo crescimento da produção (figura 4). Em outros continentes, como por exemplo, na Europa, a produção está a estabilizar ou a diminuir nas últimas décadas (Wijsman *et al.*, 2019). Em 2016, o mercado da amêijoia representava 37% do mercado mundial de bivalves (mexilhões, amêijoas, ostras e vieiras) e correspondia a 27,6 mil milhões de dólares. Em 2014, a amêijoia de Manila (*Ruditapes philippinarum*) foi a espécie economicamente mais importante pertencente à família Veneridae, representando 95% da produção mundial (capturas e aquicultura) e atingindo uma colheita de 4.264.274 toneladas. Só na Europa, a amêijoia de Manila representou 54% da produção de Veneridae em 2014. A amêijoia de Manila foi introduzida nas águas europeias entre 1972 e 1975, primeiro em França e depois em Inglaterra, Espanha e Itália. Esta espécie de amêijoia demonstrou uma elevada adaptabilidade a vários ambientes costeiros, tendo provocado a deslocação competitiva de espécies de amêijoas nativas europeias, como a amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus* (da Costa *et al.*, 2020).

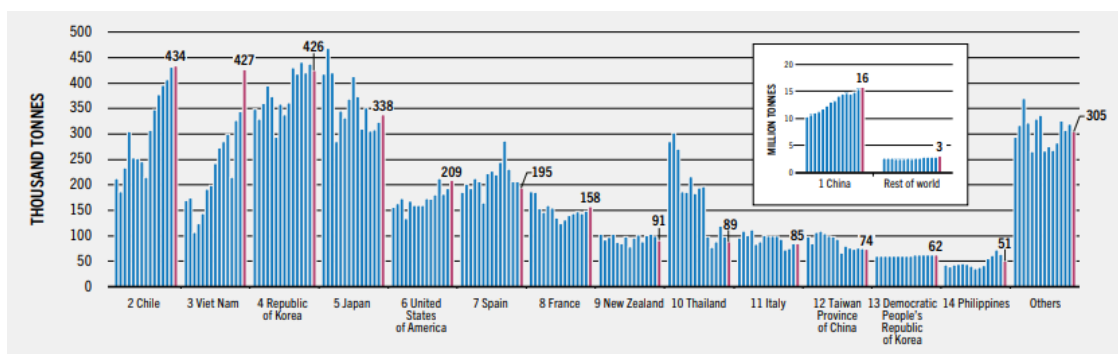


Figura 4 - Produção mundial de Aquicultura de moluscos (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization*, as espécies de moluscos bivalves mais comercializadas são as vieiras, as amêijoas e os mexilhões, a grande maioria dos quais são cultivados. Em 2022, as exportações globais de moluscos bivalves totalizaram 6,0 mil milhões de dólares, representando cerca de 3% do valor das exportações globais de produtos de animais aquáticos. A China foi de longe o maior exportador de bivalves, representando cerca de um quarto de todas as exportações de moluscos bivalves em termos de valor. A União Europeia, os Estados Unidos da América, a China e o Japão representam a maior parte da procura de importações. A exportação de moluscos bivalves registou uma quebra em 2020, principalmente como consequência do encerramento de restaurantes devido a restrições de confinamento relacionadas com a pandemia. No entanto, o setor demonstrou uma recuperação robusta em 2021 e 2022. Os preços dos bivalves estão a aumentar nos principais mercados devido à inflação e à elevada procura. No entanto, tal como observado para outros produtos, a resistência dos consumidores aos preços elevados pode surgir em resposta a condições económicas difíceis (FAO, 2024).

A percentagem de moluscos tem vindo a aumentar ao longo do tempo e, atualmente, a maioria dos crustáceos e moluscos, em particular os moluscos e, em menor grau, os crustáceos,

são cultivados. Os moluscos representavam 14% do consumo de alimentos de animais aquáticos em 1961, em comparação com 26% em 2021 (figura 5). Também a Direção-Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM) refere que, de entre as principais espécies produzidas em aquacultura no nosso País, os bivalves produzidos em regime extensivo representam uma parte significativa da produção nacional.

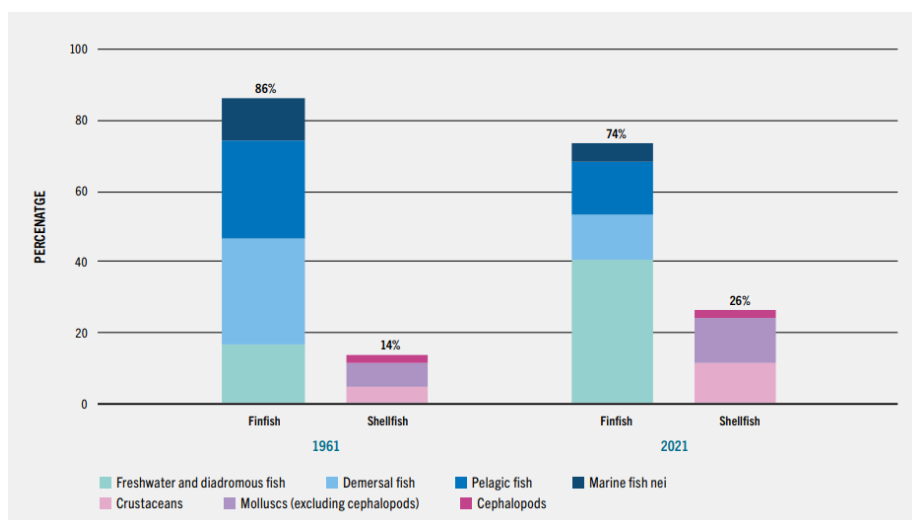


Figura 5 - Consumo aparente de alimentos de animais aquáticos por grupo de espécies principais, 1961 e 2021 (Fonte: FAO, 2024 - The State of World Fisheries and Aquaculture 2024).

As amêijoas da família *Veneridae* incluem os representantes mais importantes das espécies de bivalves no mundo. Por exemplo, a *Ruditapes philippinarum* ou amêijoa de Manila, que foi introduzida em várias partes do mundo desde o início do século XX, é de longe a espécie de amêijoa mais comumente cultivada. A amêijoa *Mercenaria mercenaria* Linnaeus, 1758 é uma importante espécie recreativa e comercial capturada nos Estados Unidos. As estatísticas da FAO registaram uma produção aquícola superior à pesca de unidades populacionais selvagens em 2009. *Meretrix lusoria* Röding, 1798 é um bivalve comercialmente importante na Coreia, Japão e China, sendo a segunda espécie de amêijoa mais cultivada no mundo em 2009 (da Costa, 2012). Entre as amêijoas autóctones da família *Veneridae*, a amêijoa listrada (*Chamelea gallina*) representou 64% da produção de amêijoas em 2014 e é predominantemente produzida em Itália, Espanha, França e Portugal. No mesmo ano, a amêijoa-boia, *Ruditapes decussatus* foi a segunda em termos de produção, com 6155 toneladas de captura em Itália, Portugal, Espanha e outros países. A restante produção é composta pela amêijoa-macha (*Venerupis corrugata*), pela ameijola (*Callista chione*), pela amêijoa-judia (*Polititapes rhomboides*), pela amêijoa pé-de-burro (*Venus verrucosa*) e pela amêijoa-cão (*Polititapes aureus*) (da Costa *et al.*, 2020).

A produção de moluscos bivalves é uma atividade estratégica, uma vez que contribui significativamente para a preservação das economias locais e gera capital e emprego nas zonas litorais. Em Portugal, a produção de bivalves é uma das atividades socioeconómicas mais importantes, com um grande potencial de crescimento como subsector das pescas, devido às condições edafo-climáticas e geográficas (Matias, 2013). O desenvolvimento de metodologias para cultivo de espécies de baixo nível trófico voltou a assumir um papel prioritário. A

identificação de espécies consumidas pelas comunidades, cujo cultivo seja exequível sem recorrer a alimentos compostos voltou assim a estar na ordem do dia, o que pode contribuir preponderantemente para o desenvolvimento desta atividade de uma forma sustentável, e acima de tudo, permitir a produção de proteína animal para autoconsumo ou para comercialização ou troca por outros bens de primeira necessidade entre as comunidades (Rocha & Dinis, 2019). Espécies de níveis tróficos inferiores, incluindo moluscos e algas, atualmente representam cerca de metade de toda a produção aquícola e oferecem potencial para contribuição significativa para o crescimento sustentável no suprimento global de alimentos aquáticos (van der Schatte Olivier *et al.*, 2020). A produção em maternidade de sementes autóctones de amêijoas é, portanto, essencial para sustentar e aumentar a aquacultura e a subsequente captura destas espécies (da Costa *et al.*, 2020).

#### 1.6. Produção de amêijoas em aquacultura

O cultivo de bivalves marinhos é a forma mais antiga de aquacultura. No entanto, foi apenas no final do século XIX que se desenvolveram as técnicas fiáveis que permitiram o rápido crescimento da indústria (Barnabé, 2018). A sobre-exploração dos stocks selvagens levou os pescadores a refletir sobre a gestão dos recursos e a considerar o repovoamento e a cultura em águas profundas com juvenis provenientes da maternidade. Assim, um novo salto foi dado, cerca de um século mais tarde: trata-se do desenvolvimento de maternidades para a produção de juvenis. As práticas ligadas ao cultivo marinho, tais como as melhorias tecnológicas, a perspetiva de novos métodos, nomeadamente no domínio das biotecnologias, fazem prever um aumento do número de problemas ligados à biologia das espécies cultivadas (Barnabé, 2018). Também, a nível mundial, o fornecimento inconsistente de sementes e as flutuações anuais drásticas do recrutamento de sementes em bancos de sementes selvagens são os principais desafios que o sector da produção de amêijoas enfrenta. A produção de amêijoas é muito afetada por ações antropogénicas e alterações climáticas, como o aumento da temperatura, baixa salinidade, acidificação dos oceanos e doenças, causadas principalmente por bactérias, vírus e protozoários. Os stocks das espécies de amêijoas nativas europeias têm diminuído nos últimos anos devido a vários fatores, como a sobrepesca e a falha de recrutamento em *C. gallina* e *V. corrugata*. A apanha e a produção aquícola de *R. decussatus* são limitadas pelo baixo recrutamento, pela mortalidade de adultos causada por *Perkinsus* spp. e pelo elevado custo de produção de juvenis em maternidades comerciais (da Costa *et al.*, 2020). O cultivo de amêijoas não apresenta grandes variações entre espécies. Este divide-se em maternidade, pré-engorda e engorda (figura 6). A reprodução artificial de bivalves requer uma manipulação dos fatores físico-químicos do meio de cultivo e abundância de alimento. Ao providenciar condições ideais à sobrevivência, crescimento e maturação sexual dos organismos, procura-se assim contornar o problema da

sazonalidade de reprodução natural das amêijoas, que limita a sua produção em cativeiro (da Costa, 2018).

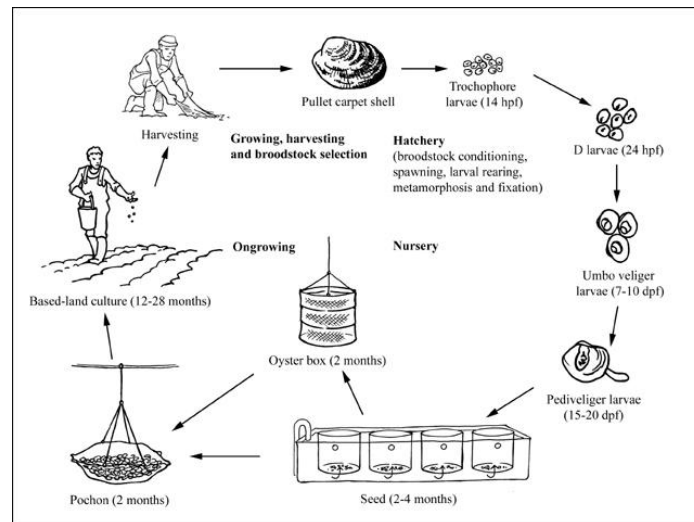


Figura 6 - Ciclo de produção de bivalves em aquacultura (fonte: FAO, 2009 - *Venerupis corrugata* (Montagu, 1803) [Veneridae]).

As vantagens da produção de sementes de bivalves em maternidade são numerosas, tais como: fornecimento de juvenis de alta qualidade, que não dependem das condições ambientais nem das flutuações dos recrutamentos das populações naturais, além de ultrapassar a dificuldade que os produtores enfrentam em encontrar, recolher e adquirir sementes (spat) selvagens. Permite também selecionar o tamanho e o peso da semente mais adequados para iniciar a fase de produção de crescimento durante todo o ano e, quando as condições zootécnicas são controladas com precisão, torna-se possível realizar um cultivo com um controle rigoroso da dieta e das condições ambientais, atingindo taxas de crescimento ótimas e juvenis saudáveis. O controle das condições zootécnicas permite a produção de juvenis com determinadas características de interesse, tais como sobrevivência, crescimento ótimo e resistência a doenças (Matias, 2013). Também a procura por espécies nativas europeias tem sido cada vez mais evidente entre produtores e consumidores devido ao seu elevado valor gastronómico, nutricional e económico (cerca de 3 vezes mais elevado no preço por kg do que as espécies invasoras) (Goes *et al.*, 2024). Neste sentido, a produção artificial de juvenis de bivalves surge como uma forma de satisfazer as necessidades da indústria da aquacultura, uma vez que permitirá obter um produto controlado. Para que as maternidades produzam sementes de forma consistente, é essencial desenvolver técnicas de acondicionamento dos reprodutores. É crucial conhecer e manipular o ciclo gonadal natural e o período de desova das amêijoas, de modo que os adultos possam ser induzidos a desovar mais cedo ou mais tarde do que no ambiente natural. Apesar do conhecimento crescente em matéria de cultivo de bivalves, alguns aspetos biológicos permanecem desconhecidos ou mal compreendidos, tais como as necessidades alimentares dos bivalves, sendo as fases larvares as fases mais críticas do ciclo de vida dos bivalves (Matias, 2013).

### 1.7. Morfologia, reprodução e ciclo de vida dos moluscos bivalves

Os moluscos bivalves pertencem ao filo Mollusca, um grupo que inclui animais tão diversos desde os quitons (conchas em cadeia), gastrópodes, cefalópodes (lulas e polvos), bem como amêijoas, ostras, mexilhões e vieiras. Este filo apresenta seis classes, das quais uma é a classe

Bivalvia (FAO, 2024). Os bivalves são caracterizados por apresentarem uma concha protetora, normalmente de origem calcária, com duas valvas, geralmente simétricas. Estas duas valvas são articuladas dorsalmente, ligadas através de um ligamento elástico e estão unidas entre si por um ligamento e articulam-se por meio de uma charneira; fecham-se com o auxílio de um ou dois músculos adutores. Na superfície interna das valvas existe uma linha paleal, que corresponde à impressão deixada pela aba do manto e que na região anterior apresenta um seio paleal ao nível dos sífões. Dentro da concha existe o pé muscular e o manto com dois lobos achatados, cuja margem posterior forma geralmente sífões - um inalante e um exalante - responsáveis pela entrada e saída de água com oxigénio e alimento (figura 7) (Cerviño-Otero, 2011; Rodrigues, *et al.*, 2023). Uma série de dentes e encaixes interligados ao longo da linha de articulação impedem que as válvulas deslizem uma contra a outra. A concha apresenta várias funções: atua como um esqueleto para a fixação dos músculos, protege contra predadores e, nas espécies que têm como hábito enterrar-se, ajuda a manter a lama e a areia fora da cavidade do manto. Relativamente à sua composição, a concha é constituída por carbonato de cálcio, formado pela deposição de cristais deste sal numa matriz orgânica, que é composta pelo polissacárido  $\beta$ -quitina, uma proteína hidrofóbica da seda e um conjunto complexo de proteínas hidrofílicas, muitas delas ricas em ácido aspártico. O componente mineral representa mais de 95% do peso da concha, enquanto 1-5% representa a matriz orgânica (Gosling, 2015).

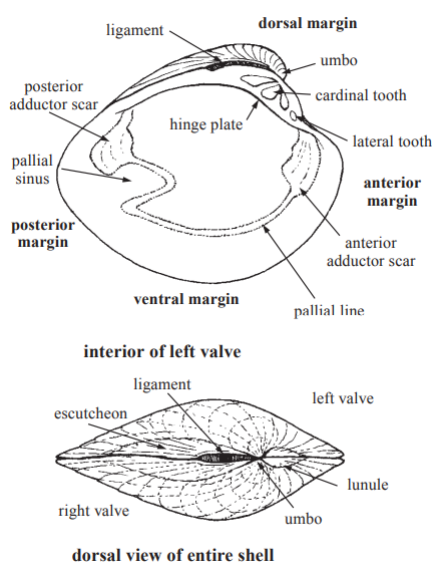


Figura 7 - Características externas e internas de um bivalve (Fonte: FAO - Bivalves—Bailey-Matthews Shell Museum, Florida, USA).

As valvas envolvem o corpo do animal, constituído principalmente pela massa visceral, brânquias, pé e manto (Figura 8). A massa visceral contém todos os órgãos, o aparelho digestivo, reprodutor, circulatório e excretor. As brânquias estão situadas de cada lado da massa visceral. O pé é constituído por uma massa muscular situada na região posterior do animal, sendo um órgão contrátil que lhe permite deslocar-se ao longo do fundo e enterrar-se no substrato. Na base do pé encontra-se a glândula *byssus*, que segrega um filamento que lhe permite fixar-se ao substrato, sendo mais funcional nas fases juvenis no caso das amêijoas (Cerviño-Otero, 2011). Na região posterior do corpo do animal, o bordo do manto une-se formando dois sífões, o exalante e o inalante, responsáveis pela circulação de água no interior da concha, necessária

para obtenção de alimento, trocas gasosas, bem como para a eliminação de fezes e produtos de excreção. Estes poderão ser mais ou menos desenvolvidos, consoante os bivalves vivam mais ou menos enterrados profundamente no sedimento. Conseqüentemente, os sifões causam uma deflexão do bordo do manto, que se reflete na impressão deixada pelo mesmo na face interna das valvas, o *sinus palial*. Internamente, junto da massa visceral, existe também o pé – um órgão muito musculado, usado para a locomoção e fixação no substrato (da Costa, 2018).

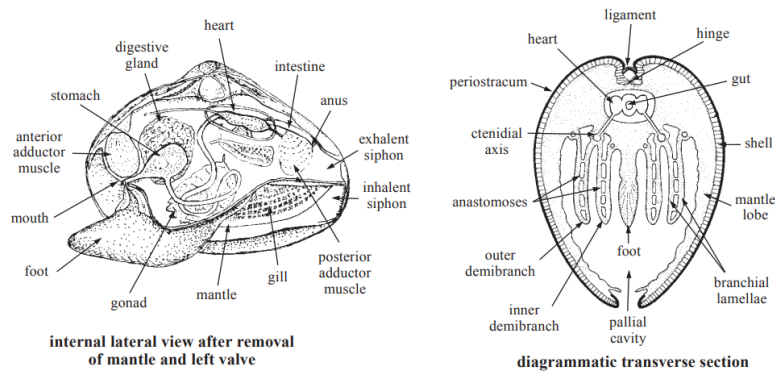


Figura 8 - Anatomia geral de um bivalve (Fonte: FAO - Bivalves—Bailey-Matthews Shell Museum, Florida, USA).

Para respirarem e se alimentarem, os bivalves filtram grande quantidade de água que entra na cavidade paleal e banha as brânquias onde fica retido o fitoplâncton, outros microrganismos e as partículas orgânicas que se encontram em suspensão. As brânquias são constituídas por dois pares de lâminas de cada lado do pé que possuem pequenos filamentos, os cílios, que conduzem a corrente de água para a cavidade do manto (IPMA, 2025). As grandes brânquias filtram os alimentos da água e dirigem-nos para os palpos labiais, que rodeiam a boca. Os alimentos são selecionados e introduzidos na boca, isto porque os bivalves têm a capacidade de selecionar os alimentos filtrados da água. Os bolos de alimento, ligados com muco, que são passados para a boca, são por vezes rejeitados pelos palpos e eliminados pelo animal sob a forma de “pseudofezes”. O esôfago curto conduz da boca ao estômago, com várias câmaras e várias aberturas. O estômago está completamente rodeado pelo divertículo digestivo (glândula), uma massa escura de tecido que é frequentemente designada por “fígado”. Uma abertura do estômago conduz ao intestino, muito enrolado, que se estende até ao pé nas amêijoas, terminando no reto e, por fim, no ânus (Helm *et al.*, 2004). O sistema digestivo é constituído pela boca, esôfago, estômago, glândula digestiva, intestino, reto e ânus. Através da boca, e passando por um curto esôfago, as partículas alimentares chegam ao estômago, onde se encontra o estilo cristalino, cuja função é triturar as partículas alimentares com as enzimas que contém. Estas partículas semi-digeridas passam para a glândula digestiva, onde sofrem uma digestão intracelular, para depois entrarem no intestino e entrarem na cavidade palatina através do ânus, muito próximo do sifão exalante (Cerviño-Otero, 2011).

O sistema circulatório tem uma estrutura simples e a circulação é aberta. O coração está situado dorsalmente, encerrado numa cavidade pericárdica, e é constituído por duas aurículas e um ventrículo. As aortas, uma anterior e outra posterior, expulsam a hemolinfa que é distribuída por todo o corpo através de artérias e arteríolas, terminando estas últimas em lacunas, de modo que a hemolinfa circule livremente em todos os tecidos (Cerviño-Otero, 2011). Este tipo de sistema favorece a exposição direta dos moluscos bivalves ao ambiente onde se inserem. Alguns autores admitem que os hematócitos desta classe de organismo estão envolvidos em processos cruciais como a regeneração e reparação da concha e a digestão e transporte de nutrientes

(Ventura, 2019). O aparelho excretor é constituído por um par de rins que purificam a hemolinfa antes de esta passar pelas brânquias para ser oxigenada e devolvida ao coração. O sistema nervoso é constituído por três pares de gânglios: cerebral, pedal e visceral, ligados entre si por um cordão neural. Os gânglios cerebrais situam-se perto da boca e atuam na região anterior, os gânglios pedonais inervam o pé e a parte posterior do manto e os gânglios viscerais atuam nas brânquias e na massa visceral (Cerviño-Otero, 2011).

O sistema reprodutor dos bivalves é extremamente simples. A gónada é constituída por gonodutos e folículos e, na maturidade, ocupa uma grande parte da massa visceral. Os gonodutos não possuem células musculares, pelo que os gâmetas são expulsos pelo movimento dos cílios que revestem estes ductos. Os folículos são estruturas acinosas, muito ramificadas, onde ocorre a gametogénese (Cerviño-Otero, 2011). Nos bivalves primitivos, o gonoduto abre-se nos rins e os óvulos e espermatozoides saem através da abertura do rim (nefridióporo) para a cavidade do manto. Na maioria dos bivalves, os gonodutos já não estão associados aos rins, mas abrem-se através de poros independentes na cavidade do manto, perto do nefridióporo. A fecundação é externa e os gâmetas são libertados através da abertura exalante do manto, exceto no caso das ostras, em que muitas espécies criam ovos no interior da cavidade do manto. A maioria dos bivalves são dióicos, ou seja, os sexos são separados, e há geralmente um número igual de machos e fêmeas, embora os sexos não possam ser diferenciados em caracteres externos. No entanto, alguns bivalves de cultivo, por exemplo, algumas vieiras, são hermafroditas com a produção de óvulos e espermatozoides em simultâneo. Outros mudam de sexo durante o desenvolvimento. Normalmente, estes são protândricos, sendo os indivíduos mais jovens machos e os mais velhos fêmeas. Alguns bivalves podem sofrer mais do que uma mudança (frequentemente anual) na sexualidade funcional e diz-se que apresentam hermafroditismo rítmico consecutivo (por exemplo, espécies de *Ostrea*). Embora as causas da mudança de sexo nos bivalves sejam pouco conhecidas, foram sugeridos componentes ativados por genes que respondem a fatores ambientais, genes determinantes do sexo e oferta de alimentos. Tal como nos peixes e nos crustáceos decápodes, a maturação dos gâmetas nos bivalves é influenciada por uma série de fatores exógenos, incluindo a temperatura da água, a disponibilidade de alimentos, a intensidade da luz e a periodicidade lunar. É também influenciada por fatores endógenos, incluindo hormonas, fatores genéticos e níveis de reservas energéticas endógenas (Gosling, 2008).

As amêijoas são espécies dióicas sem dimorfismo sexual (Cerviño-Otero, 2011). No entanto, foram reconhecidos dois tipos de padrões sexuais, para além dos sexos separados: o hermafroditismo assíncrono e o hermafroditismo simultâneo. As amêijoas da espécie *Mercenaria mercenaria* tornam-se sexualmente maduras com menos de um ano de idade, desenvolvendo-se primeiro como machos, mas mudando para uma relação sexual igual no segundo ano. Por outro lado, a amêijoia gigante, *Tridacna*, é macho e fêmea ao mesmo tempo, os espermatozoides são libertados primeiro, seguidos dos ovócitos algumas horas mais tarde (Gosling, 2008). O ciclo reprodutor dos bivalves tem sido amplamente investigado, principalmente no que diz respeito às espécies comerciais, devido à sua importância no desenvolvimento da aquacultura e na gestão das pescas. Uma vez que a reprodução nos bivalves é influenciada por fatores exógenos (principalmente a temperatura e a disponibilidade de alimento) e endógenos (de tipo endócrino e neurológico), são discutidas as investigações que tratam do efeito de ambos os fatores nas amêijoas (da Costa, 2012). Nos bivalves marinhos, o padrão de desenvolvimento larvar mais comum é a libertação de gâmetas para a água do mar, normalmente na água que rodeia os adultos e, conseqüentemente, a fertilização e o

desenvolvimento embrionário ocorrem externamente (figura 9) (Dame & Kenneth, 2011; Aranda-Burgos *et al.*, 2014). De acordo com Dame & Kenneth (2011), o ciclo de vida de um bivalve marinho pode ser separado em duas fases muito distintas: o período planctônico pré-larvar e o período pós-larvar juvenil-adulto. O período de pré-eclosão é importante para a dispersão da espécie, enquanto o período juvenil-adulto é importante para a reprodução. As duas fases estão espacial e temporalmente separadas durante a maior parte da sua existência, o que reduz as hipóteses de mortalidade induzida pelos adultos nas larvas através da alimentação por filtração dos adultos. A fecundação das amêijoas inclui-se no método externo e o desenvolvimento das larvas é indireto, passando por várias fases larvares da vida planctônica até sofrerem a metamorfose, passarem para o fundo e iniciarem a vida bentônica. Os espermatozoides e os ovócitos são expulsos para o exterior através do sifão exalante. O espermatozoide penetra no ovócito e, pouco depois, é produzida a membrana de fecundação, que impede a penetração de outros espermatozoides (Cerviño-Otero, 2011).

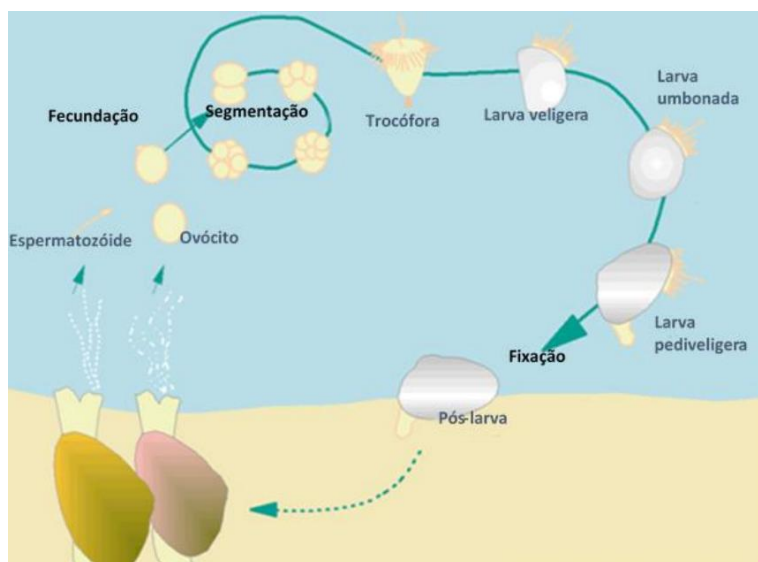


Figura 9 -Ciclo de vida de uma amêijoia (Fonte: da Costa *et al.* (2019) - Cultivo de bivalves em maternidade e critérios para a sua localização).

Após a fertilização do ovócito, este começa a dividir-se e aproximadamente 12 horas depois forma-se a larva trocófora. Esta é uma larva planctônica, de forma aproximadamente oval, com tamanho entre os 60 e os 80  $\mu\text{m}$ . Caracteriza-se por apresentar uma banda de cílios na região equatorial e tufo de flagelos apicais, responsáveis pelos movimentos de natação e suspensão na coluna de água. Nesta fase, os organismos já apresentam valvas rudimentares, de natureza calcária (da Costa, 2018). Passadas 24-48 horas depois da fertilização, a glândula da concha segrega a primeira concha larvária, que acaba envolvendo a larva trocófora para dar lugar à larva velígera ou larva D devido a forma da letra “D”, com largura máxima entre os 80 e os 100  $\mu\text{m}$  (da Costa, 2018; da Costa *et al.*, 2019)). Neste momento começa a fase velígera planctônica, aparecendo o sistema digestivo que permite a alimentação exógena de fitoplâncton. Uma das características mais importantes da larva D é a charnela em linha reta e a presença do véu, um órgão que não só serve para a alimentação, mas também permite à larva nadar e mover-se na coluna de água. A partir do momento em que a larva começa a alimentar-se ocorre um aumento considerável no tamanho, o que implica o crescimento da concha e a aparição das linhas de

crescimento (da Costa *et al.*, 2019). Entre os 100 a 150  $\mu\text{m}$ , formam-se os umbos, vagamente explicados como sendo uma grande protuberância para a extremidade anterior do lado dorsal da concha, em ambas as valvas. As larvas umbuladas dispõem ainda de velum, mas apresentam formas muito variadas e distintas, consoante a espécie (da Costa, 2018). Perto do fim do desenvolvimento larvar, que dependendo da temperatura de cultivo, ocorre entre 14 e 20 dias após a eclosão, a larva começa a desenvolver o pé enquanto o véu ainda persiste: é a chamada larva pedivelígera (da Costa *et al.*, 2019). Durante a metamorfose, o véu é reabsorvido, perdendo sua função de captura de alimento e deslocamento, e os filamentos branquiais começam a se desenvolver (Cerviño-Otero, 2011). Esta fase é classificada como um período crítico no desenvolvimento dos bivalves, durante o qual o animal passa de uma existência planctónica e nadadora para uma existência bentónica sedentária. Nesta altura, podem ocorrer mortalidades consideráveis, tanto na natureza como nas maternidades (Helm *et al.*, 2004). Após esta fase, as pós-larvas começa a adotar a forma adulta definitiva, a crescer a partir dos nutrientes do meio ambiente e a desenvolver a concha ou disconcha adulta (Cerviño-Otero, 2011). Ao terminarem todas as metamorfoses larvares e pós-larvares, os bivalves alcançam uma largura aproximada de 300  $\mu\text{m}$ . Já são organismos morfologicamente semelhantes aos adultos, tanto interna como externamente, sendo chamados de “sementes” (figura 9) (da Costa, 2018).

#### 1.7.1. Amêijoia-macha (*Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791))

A espécie *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) é um molusco bivalve da família Veneridae, vulgarmente conhecida em Portugal como amêijoia-macha (dos Santos, 2018) e, em Espanha, é denominada de amêijoia babosa, devido à libertação de um muco, principalmente no estágio juvenil (da Costa, 2018). É uma espécie atlântico-mediterrânica de clima quente que habita em fundos arenosos a lodosos, enterrando-se em fundos de areia, cascalho ou lama, geralmente desde a baixa-mar até uma profundidade de 40 m (FAO, 2009; Joaquim *et al.*, 2016). A nível morfológico externo, apresenta uma concha ovalada e ligeiramente alargada, apresentando três dentes cardinais em cada valva. A valva na região anterior é arredondada e na região posterior é quase reta. O umbo distingue-se por se localizar mais para a região anterior da concha. A superfície exterior da concha apresenta coloração desde creme a cinzenta, com bandas alternadas de cor escura. Tem numerosas estrias longitudinais, bem marcadas, e estrias radiais quase impercetíveis. Na parte interior, as valvas apresentam coloração branca brilhante (ocasionalmente púrpura), com a linha paleal bem definida, em forma de “U”, que se estende para além da linha média da concha (figura 10) (da Costa, 2018).



Figura 10 - Características externas e internas das valvas da concha de amêijoia-macha, *Venerupis corrugata* (Fonte: FAO, 2009 - *Venerupis corrugata* (Montagu, 1803) [Veneridae]).

A amêijoia *V. corrugata* apresenta os sifões muito curtos e unidos na sua totalidade, característica que distingue esta espécie da amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus* (FAO, 2009). Estes sifões estão presos ao longo de todo o comprimento, e, tal como a concha, a sua zona terminal pode variar de tonalidade, desde o branco, a castanho ou alaranjado (dos Santos, 2018). Estas amêijoas têm uma largura máxima de 5 cm, sendo comercializadas com um tamanho mínimo de 3 cm (da Costa, 2018). *V. corrugata* (Gmelin, 1791) está entre as espécies de bivalves mais comuns registadas na Produção Global de Aquacultura, com uma produção de aquicultura de 111 a 338 toneladas (2001–2013) (Velez *et al.*, 2016). É uma espécie explorada comercialmente em Portugal, Espanha, França e Itália, sendo que, em Portugal, as populações de *V. corrugata* diminuíram durante as últimas décadas devido à sobrepesca e falhas de recrutamento, mesmo em áreas onde esta espécie foi outrora abundante, como na Ria de Aveiro e na Ria Formosa. De facto, a densidade populacional da Ria Formosa diminuiu abaixo de um nível limite, de tal forma que a recuperação natural não parece ser possível. Por isso, apesar da elevada procura no mercado e do alto valor comercial desta espécie, este declínio levou a um abandono por parte dos pescadores locais (Joaquim *et al.*, 2016).

#### 1.7.2. Amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758))

A amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) é um molusco bivalve lamelibrânquio que filtra a água através dos seus dois sifões (um de entrada e outro de saída), capturando matéria orgânica (detritos) e fitoplâncton como alimento. As brânquias são dois pares de placas compostas por filamentos. Os sexos são geralmente separados e a maturidade sexual é geralmente atingida quando as amêijoas têm cerca de 20 mm. Em geral, no final do inverno/início da primavera, as gónadas do macho e da fêmea começam a amadurecer e estes espécimes podem ser condicionados artificialmente para a desova, em condições de cultivo. Quando as gónadas estão maduras, um estímulo, frequentemente um aumento rápido da temperatura ou uma maior abundância de alimento, pode desencadear a desova. No entanto, a desova também pode ser desencadeada por vários fatores ambientais, incluindo a temperatura, os estímulos químicos e físicos, as correntes de água ou uma combinação destes e de outros fatores, como já foi referido anteriormente. O período de desova nas populações naturais difere consoante a localização geográfica. A desova natural desta espécie está confinada a uma determinada época do ano (entre maio e outubro). Os ovos e os espermatozoides são libertados na água, onde ocorre a fertilização. A presença de esperma na água desencadeia

frequentemente a desova noutros animais. O esperma é descarregado num fluxo fino e constante através da abertura exalante ou do sifão exalante. A descarga de ovos é mais intermitente e estes são emitidos em nuvens pelo sifão. Durante o desenvolvimento larvar, as larvas nadam livremente, em média, 10 a 15 dias até se dar a metamorfose (transferência para semente), com cerca de 0,5 mm de comprimento, num substrato de areia ou lama (FAO, 2009; Matias *et al.*, 2013). A distribuição de *R. decussatus* estende-se desde o Mar do Norte até ao Senegal e através do Mar Mediterrâneo, onde vive enterrada ou parcialmente enterrada na areia ou na lama, a 15-20 cm de profundidade, principalmente na zona intertidal, embora também habite zonas subtidais (FAO, 2009; Aranda-Burgos *et al.*, 2014). Em Portugal, está presente na Ria de Aveiro, na Lagoa de Óbidos, nos estuários do Tejo, Sado e Arade, na Ria de Alvor e na Ria Formosa. Também está presente na ilha de São Jorge, Açores, mais precisamente na “Lagoa da Fajã de Santo Cristo” (Matias *et al.*, 2013). A nível morfológico, *R. decussatus* caracteriza-se pela sua concha ovalada irregular com numerosas estrias transversais, uma cor geralmente esbranquiçada ou amarelada, frequentemente apresentando manchas escuras irregulares, sendo também, por vezes, difícil de distinguir da sua congénere invasora *R. philippinarum* (amêijoa-japonesa) (Rodrigues, *et al.*, 2023). As linhas e estrias que são observadas na concha formam um quadriculado característico desta espécie. Apresenta a superfície externa das valvas convexa e a interna côncava que envolve o corpo do indivíduo. Possui um manto que integra os dois lobos que segregam as valvas, dois sifões separados em toda a sua extensão, branquias bastante desenvolvidas e presença de cílios (responsáveis pelos processos de respiração e alimentação). Os músculos adutores, responsáveis pela abertura e fecho das valvas, assumem uma forma ligeiramente cilíndrica (figura 11). *R. decussatus* apresenta ainda um pé, que é responsável pela locomoção. Geralmente esta espécie apresenta um comprimento médio entre 2,5 cm e 4 cm, podendo chegar aos 7,5 cm (Ventura, 2019).



Figura 11 - Características externas e internas das valvas da concha de amêijoa-boa, *Ruditapes decussatus* (Fonte: ICTIOTERM - *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)).

A *R. decussatus* é cultivada na costa atlântica da França, Espanha, Portugal e na bacia do Mediterrâneo, sendo que, a sua colheita ocorre principalmente em Espanha e em França. Em Espanha, os primeiros registos sobre a pesca e o consumo de moluscos, a partir do século XVI, referem-se principalmente à ostra plana e só raramente à amêijoa, mas mencionam a comercialização de amêijoas em Portugal e noutros locais. Em Espanha, perto de San Simon, na Ria de Vigo, os pescadores encontraram uma população natural de amêijoas e esgotaram-na em pouco tempo. Em 1935, a pesca da amêijoa foi regulamentada e a quantidade de amêijoas que cada pescador podia apanhar em cada maré baixa era de 14 kg, sendo a época fechada de maio a outubro. Nessa altura, havia 6 130 apanhadores ambulantes e 1 480 outros que utilizavam embarcações perto de San Simon (FAO, 2009). *R. decussatus* tem sido amplamente produzida em Portugal, e, o seu cultivo é de bastante importância no sector económico. Esta espécie é fundamental para as receitas da aquacultura, sendo que, em 2009, a produção anual nacional

atingiu 2 toneladas métricas (representando 27% do total de marisco cultivado em Portugal). Também constitui uma das espécies de bivalves mais importantes na aquacultura europeia de moluscos (4128,73 T e 45 milhões de €) (Dubert *et al.*, 2016). As principais zonas de produção desta espécie são a Ria de Aveiro (40°42'N; 08°W) e a Ria Formosa (37°01'N; 07°49'W). Nestas zonas de produção, as amêijoas são criadas em parcelas na zona intertidal. O cultivo de *R. decussatus* na Ria Formosa representa 90% da produção nacional e é fulcral no quadro socioeconómico, visto que, a mesma é considerada uma das espécies de bivalves economicamente mais importantes em Portugal e em outros países do sul da Europa, onde é extensivamente produzida e colhida, constituindo a maior parte das receitas da aquacultura em Portugal e representando 76% da produção anual nacional de moluscos (Matias *et al.*, 2013; De Sousa *et al.*, 2015). No entanto, durante as duas últimas décadas, a produção europeia de amêijoas sofreu um decréscimo importante devido a vários constrangimentos, nomeadamente falhas de recrutamento e excessiva pressão na captura de juvenis nos bancos naturais e graves mortalidades de amêijoas (Matias *et al.*, 2013). Para resolver esse problema, foram desenvolvidos programas artificiais de desova e criação de larvas para fornecer uma fonte alternativa de sementes. Além disso, doenças causadas por uma ampla gama de microrganismos estão associadas a grandes perdas económicas em *R. decussatus*, que é uma espécie altamente vulnerável ao estresse físico e patógenos (De Sousa *et al.*, 2015). O primeiro passo no cultivo em maternidades é o acondicionamento dos reprodutores, previamente recolhidos de áreas selvagens, em tanques onde a maturação das gonadas é induzida por meios artificiais, ou seja, manipulando a temperatura da água do mar e fornecendo a alimentação adequada. Portanto, o processo de produção pode ser estendido e o desenvolvimento dos gâmetas dos reprodutores em gametogénese acelerado (Dubert *et al.*, 2016).

### 1.8. Cultivo de alimento vivo – microalgas

A maioria dos invertebrados marinhos depende das microalgas durante todo o seu ciclo de vida, pelo que as maternidades comerciais de moluscos têm um sistema de produção de microalgas paralelamente à sua produção animal. Além disso, a necessidade de uso de alimento vivo no estágio larval pode representar aproximadamente 30% do custo da produção. Por este motivo, a produção de microalgas é um componente crítico para a aquacultura (Guedes & Malcata, 2012; Portugal, 2012). Consequentemente, o desenvolvimento dos moluscos está intimamente relacionado com a quantidade e a qualidade do fitoplâncton produzido (Muller-Feuga *et al.*, 2003). A nutrição é então um dos fatores dominantes que vão ter influência no crescimento e na sobrevivência das larvas de bivalves (Aranda-Burgos *et al.*, 2014). Devido à sua importância na produção larvar, a nutrição tem sido estudada há muitas décadas. A maior parte das reservas armazenadas nos ovos durante a gametogénese são utilizadas durante a embriogénese, pelo que existe uma necessidade particularmente elevada de fontes exógenas de nutrientes durante as fases larvares até ao assentamento. Assim sendo, o cultivo de fitoplâncton numa maternidade é necessário porque o teor natural de microalgas da água do mar utilizada é insuficiente para assegurar um crescimento ótimo das elevadas densidades de larvas e juvenis cultivados. Além disso, durante os tratamentos a que a água utilizada na maternidade é sujeita, para evitar infeções bacterianas, a água do mar utilizada é purificada, geralmente por filtração fina (0,2-1,0 µm) e/ou tratamento ultravioleta (UV). Estes processos eliminam quase todo o fitoplâncton natural, que deve então ser substituído por cultivos artificiais densos (Muller-Feuga *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2010; Cerviño-Otero, 2011).

O crescimento padrão de uma cultura, em que a adição de nutrientes é feita apenas aquando da inoculação, e em que as condições de cultivo (temperatura, salinidade, intensidade luminosa e fotoperíodo) se mantêm constantes, é caracterizada pelas seguintes fases (figura 12) (Dinis &

Rocha, 2021): A primeira é i) fase *lag* ou de latência, em que a cultura começa a crescer, muitas vezes com uma ligeira quebra no crescimento devido à adaptação das microalgas a um novo ambiente; ii) fase de crescimento exponencial, quando as células estão adaptadas ao meio de cultura e iniciam uma divisão celular mais rápida, aproximando-se de uma forma de crescimento que duplica ou triplica o número de células; iii) fase de desaceleração do crescimento, caracterizada pelo aumento do número de células em progressão geométrica, sendo ideal para a utilização de um cultivo, tanto para a alimentação de outros organismos como para a repicagem; iv) fase estacionária, em que já não se regista um aumento do número de células e a população atinge o equilíbrio, ou seja, existe um equilíbrio entre as taxas de divisão celular e de morte das células; v) fase de declínio ou morte, quando a cultura começa a diminuir em número de células. A duração das fases depende da espécie de microalga, das condições de cultura e do fornecimento de nutrientes ou de dióxido de carbono (Tenorio *et al.*, 2023).

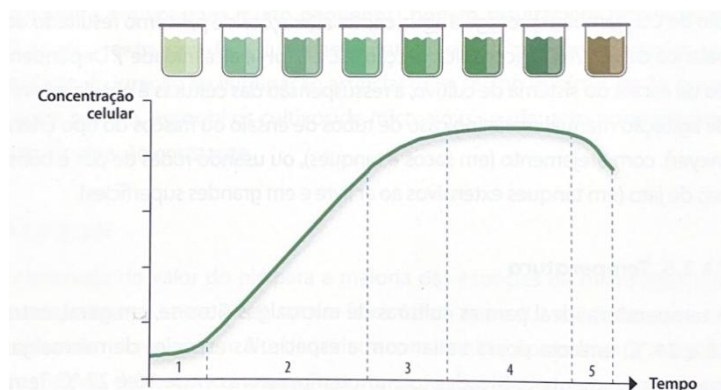


Figura 12 - Crescimento padrão de uma cultura de microalgas. 1 - fase *lag* ou de latência; 2 - fase de crescimento exponencial; 3 - fase de desaceleração no crescimento; 4 - fase estacionária; 5 - fase de morte.

Os métodos básicos de cultivo de algas pouco mudaram ao longo dos anos. As várias etapas do processo que conduzem às culturas à escala de produção são apresentadas na figura 13. O processo de *scale-up* de culturas biológicas processa-se em várias etapas sequenciais, com o objetivo de aumentar gradualmente o volume da cultura sob condições controladas. Inicialmente, utilizam-se culturas de stock com volumes de aproximadamente 250 ml, mantidas a temperaturas entre 4 °C e 12 °C, de forma a preservar a viabilidade dos organismos. Estas são posteriormente transferidas para culturas iniciais, com volumes compreendidos entre 250 ml e 4 L, incubadas a temperaturas entre 18 °C e 22 °C durante um período de 7 a 14 dias. Segue-se a fase de culturas em escala intermédia, com volumes entre 4 L e 20 L, nas mesmas condições de temperatura e duração. Por fim, as culturas são transferidas para sistemas de produção em larga escala, com volumes superiores a 50 L, adequadas para aplicações industriais ou ensaios experimentais em maior escala. Em geral, as maternidades optaram por uma cultura intensiva no interior, com iluminação artificial, geralmente externa aos recipientes de cultura, ou por uma cultura extensiva no exterior, em grandes tanques ou lagos, utilizando luz natural. As técnicas intensivas são satisfatórias em termos de fiabilidade e produtividade, mas são dispendiosas em

termos de mão de obra, enquanto que os métodos extensivos tendem a ser menos fiáveis e, por vezes, pouco produtivos (Helm *et al.*, 2004).

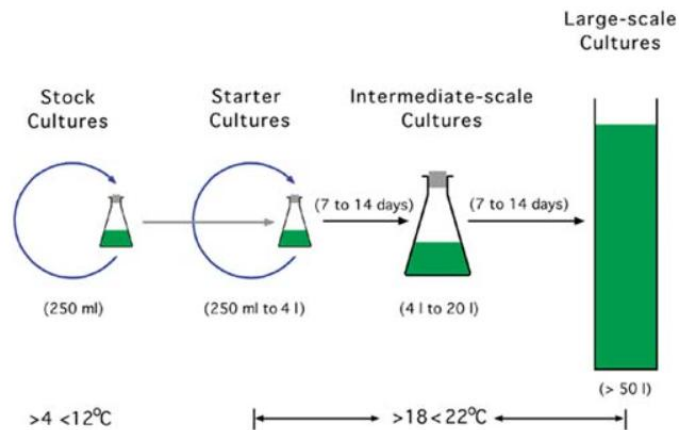


Figura 13 - Etapas da produção de microalgas (Fonte: Helm *et al.*, 2004 - The hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO).

Os cultivos de microalgas podem fazer-se, não só à escala laboratorial ou à escala piloto, mas também em sistemas fechados e em sistemas abertos (Figura 14). De uma forma geral, os inóculos iniciais de células isoladas de uma única espécie são mantidos em (a) placas de Petri em meio sólido ou em (b) tubos de ensaio em pequenos volumes de meio líquido em condições de esterilidade e em salas de temperatura controlada. Estes inóculos têm como objetivo preservar as diversas espécies de forma a garantir o abastecimento regular da produção com culturas puras. Os inóculos puros deverão ser mantidos em meios sólidos. Balões de vidro e Erlenmeyers (c) são usados para as etapas iniciais de um cultivo. Normalmente as culturas iniciam-se com volumes de 250 mL, e depois este volume pode replicar-se em 500, 1000, 2000 ou 10 000 mL quando são transferidos para recipientes de plástico (carboy, (d) na figura 14). À escala piloto, o volume de produção aumenta e de acordo com os objetivos pode optar-se por culturas em sistema fechados (E – 12 sacos, F – Colunas de acrílico e; G – sistemas laminares e (H) e (I) fotobioreatores); ou sistemas abertos (J - raceways e K – tanques de cultivo) (Pinto *et al.*, 2021).

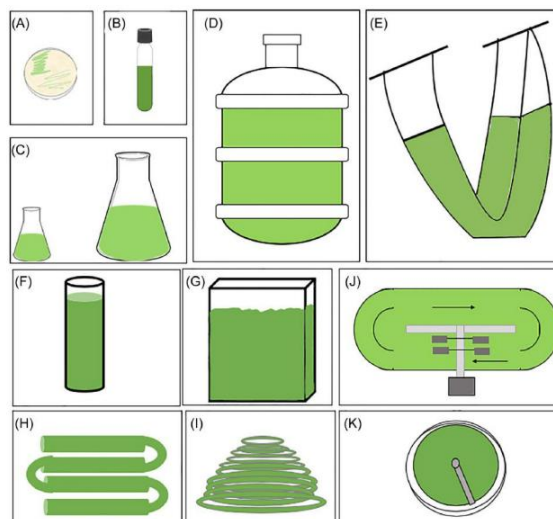


Figura 14 - Sistemas de cultivo de microalgas à escala laboratorial (A-D), em sistema fechado (E-I) e em sistema fechado (J e K) (Fonte: Pinto *et al.*, 2021 - *Microalgae – cultivation, recovery of compounds and applications*).

O fitoplâncton é cultivado em água do mar natural que é tratada e enriquecida com nutrientes adicionais, tais como nitratos, fosfatos, oligoelementos essenciais, vitaminas e dióxido de carbono como fonte de carbono. Para além disso, são adicionados silicatos ao cultivo de diatomáceas (Cerviño-Otero, 2011). Nos cultivos em pequenos volumes, a densidade celular deve ser sempre baixa para evitar autoensombramento, variações do pH e a ocorrência de fatores limitantes. Contudo, nos cultivos com concentrações celulares elevadas, além de arejamento, que promove a agitação do meio, evitando a deposição das células, deve também ser introduzido, juntamente com o ar, cerca de 1% de dióxido de carbono, como fonte de carbono e para controlo do pH, o que permite compensar o seu consumo contínuo por parte das microalgas e corrigir o aumento do pH, que pode atingir o valor limite de 9 (Dinis & Rocha, 2021), variando de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas. Pesquisas relacionadas com a interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo, pois o crescimento de microalgas deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas (Bertoldi *et al.*, 2008). A ocorrência de fatores limitantes no cultivo, resultantes do método de produção, manifesta-se, em geral, no final da fase exponencial e durante a fase estacionária. Podem ocorrer os seguintes fatores limitantes: esgotamento de nutrientes; redução da exposição solar, devido ao aumento da densidade celular (autoensombramento); autoinibição das divisões celulares, provocada por acumulação de catabolitos e aumento do pH, como consequência das altas densidades celulares e da diminuição do teor em dióxido de carbono dissolvido (Dinis & Rocha, 2021).

Em maternidade, o cultivo de microalgas pode ser realizado segundo diferentes modos operacionais, cada um com características próprias. No regime *Batch*, muito utilizado em maternidades aquícolas, efetua-se uma única inoculação de células num recipiente com meio enriquecido em nutrientes, deixando as algas crescer durante vários dias até atingirem a densidade máxima ou quase máxima; a colheita ocorre geralmente durante a fase exponencial, sendo as microalgas usadas como alimento ou como inóculo para volumes maiores (Dinis & Rocha, 2021). O modo contínuo caracteriza-se pela colheita e reposição constante do meio de cultura, o que permite manter as populações muito próximas da taxa máxima de crescimento durante períodos prolongados (Dinis & Rocha, 2021), otimizando a produtividade e estabilidade das culturas (Schädler *et al.*, 2021). Já o regime semi-contínuo baseia-se na colheita periódica de

parte da cultura, seguida de reposição do volume removido com meio fresco, possibilitando maior estabilidade do que no *Batch* e sem a complexidade técnica de um sistema contínuo (Dinis & Rocha, 2021). Estudos recentes têm mostrado que regimes semi-contínuos podem melhorar a produtividade de proteínas e lípidos em diferentes espécies de microalgas, constituindo uma alternativa eficaz para aplicações industriais (Umetani *et al.*, 2024; Oyama *et al.*, 2022).

As espécies de microalgas utilizadas na alimentação de bivalves pertencem principalmente a dois grandes grupos: diatomáceas e flagelados. As diatomáceas caracterizam-se por possuírem uma parede celular rígida (frústula) composta por sílica, apresentando formatos variados e geralmente maiores. Já os flagelados, que incluem grupos como haptófitas e clorófitas, possuem elevada mobilidade graças a um ou mais flagelos. Relativamente aos critérios de seleção de uma dieta de microalgas adequada para as larvas, estes devem basear-se na forma, mobilidade, tamanho, toxicidade e capacidade das larvas para capturar, ingerir, digerir e assimilar e composição bioquímica (Aranda-Burgos *et al.*, 2014; Dinis & Rocha, 2021). Nesse contexto, a produção de bivalves em maternidades está indubitavelmente relacionada à qualidade e à quantidade de microalgas fornecidas. A escolha das espécies de microalgas a serem usadas como alimento para as larvas é, por isso, de extrema importância (Fernández-Pardo *et al.*, 2016). A sua qualidade nutricional é determinada, sobretudo, pela composição bioquímica maioritária (proteínas, lípidos e hidratos de carbono) e pela composição em ácidos gordos. Em geral, as microalgas apresentam um elevado teor de proteínas, incluindo aminoácidos essenciais, lípidos ricos em ácidos gordos insaturados e hidratos de carbono, bem como ácidos nucleicos, vitaminas e outras moléculas como carotenoides, clorofilas e enzimas (Rey-Méndez *et al.*, 2012). De acordo com Cheng *et al.* (2020), estudos mostraram que o conteúdo lipídico total das microalgas está positivamente correlacionado com o comportamento alimentar de moluscos bivalves. Por exemplo, *Isochrysis galbana*, que é rica em maior conteúdo lipídico total, tem melhores efeitos em alguns moluscos bivalves que se alimentam por filtração. No entanto, esta composição varia em função da espécie e da fase de cultivo e, sobretudo, das condições em que este é efetuado, tais como, disponibilidade de nutrientes, luz, temperatura, pH e fonte de carbono. Por este motivo, o conhecimento aprofundado dos fatores que influenciam o desenvolvimento das microalgas é fundamental para garantir o sucesso do seu cultivo (Portugal, 2012; Rey-Méndez *et al.*, 2012).

Nas maternidades de bivalves, as microalgas são utilizadas como alimento para acondicionar os reprodutores e para produzir larvas, pós-larvas e juvenis. Após a desova e a fertilização, a alimentação das larvas começa dentro de 24-48 h após a fertilização no estágio de larva D. Por esse motivo, a adição de baixas concentrações de microalgas (por exemplo, *Chaetoceros muelleri* a  $1-2 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) aos tanques antes da alimentação pode ser benéfica, como fonte de matéria orgânica dissolvida que pode ser absorvida e utilizada pelos embriões em desenvolvimento. No caso dos reprodutores, e, dependendo da espécie, estes são alimentados com microalgas durante um a três meses, a uma taxa de alimentação diária de 2-6 % do peso seco de microalgas em relação ao peso seco da carne dos reprodutores. Normalmente, são utilizadas misturas de duas ou mais espécies, sendo os componentes comuns a *C. calcitrans* e a *Isochrysis* sp. (T.ISO). Além disso, Brown & Blackburn (2013) também referem que, foram realizados diversos estudos que identificaram as microalgas *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans* e *Skeletonema marinoi* como estirpes importantes para a alimentação dos bivalves. Num ensaio de oito experiências independentes realizadas por Marshall *et al.* (2010), foi registado que 88% da sobrevivência larvar ou mais observadas continham *C. calcitrans*, quer como dieta monoespecífica, quer em combinação com outras espécies de microalgas. Neste contexto, as

dietas mistas satisfazem melhor as necessidades nutricionais das larvas de bivalves do que as dietas unialgais. Uma dieta mista composta por duas ou mais algas pode fornecer melhor equilíbrio de nutrientes e crescimento e, maior sobrevivência. Deste modo, a combinação de microalgas com nutrientes complementares pode ser mais propícia ao crescimento dos bivalves (Cheng *et al.*, 2020).

*Isochrysis galbana* é uma espécie de microalga amplamente utilizada em todo o mundo como alimento na produção de bivalves em maternidade. Em conjunto com *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros* sp., constitui um dos grupos de microalgas mais comuns para a alimentação de larvas, juvenis e reprodutores (durante o acondicionamento em maternidade), devido às suas excelentes propriedades nutricionais (Tabela I) (Brown & Blackburn, 2013; Aranda-Burgos *et al.*, 2014).

Tabela I - Principais classes, géneros e espécies de microalgas utilizadas como alimento vivo nas diferentes fases de desenvolvimento de bivalves (Fonte: Brown & Blackburn (2013) - Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. Advances in aquaculture hatchery technology 117-158e.)

<b>Classe</b>	<b>Espécies</b>	<b>Objetivo de alimentação e frequência de utilização</b>
<b>Diatoms</b>	<i>Chaetoceros</i> ( <i>C. calcitrans</i> , <i>C. muelleri</i> )	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
	<i>Thalassiosira</i> ( <i>T. pseudonana</i> , <i>T. oceanica</i> )	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
	<i>Skeletonema</i> ( <i>S. costatum</i> , <i>S. pseudocostatum</i> )	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
<b>Prymnesiophytes</b>	<i>Isochrysis</i> ( <i>I. galbana</i> , <i>I. sp.</i> (T.ISO))	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
	<i>Pavlova</i> ( <i>P. lutheri</i> , <i>P. salina</i> , <i>P. pinguis</i> )	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
<b>Prasinophytes</b>	<i>Tetraselmis</i> ( <i>T. suecica</i> , <i>T. chuii</i> )	Fase larvar, Fase pós-larvar, Reprodutores
	<i>Pyramimonas virginica</i>	Fase larvar e Fase pós-larvar
	<i>Micromonas pusilla</i>	Fase larvar
<b>Cryptophytes</b>	<i>Rhodomonas</i> ( <i>R. lens</i> , <i>R. salina</i> )	Fase larvar e Fase pós-larvar
<b>Chlorophytes</b>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Fase pós-larvar e Reprodutores

## 2. Descrição do local de estágio

Fundada em 2015, a empresa Oceano Fresco, localizada no interior do Porto de Abrigo da Nazaré (39.5867° N, 9.0747° W; datum WGS84) desenvolve a sua atividade em aquacultura de duas espécies de amêijoas nativas, a amêijoia-boua (*Ruditapes decussatus*), a amêijoia-macha (*Venerupis corrugata*) e ostra plana (*Ostrea edulis*) (figura 15). Esta exploração está dividida em três fases, pela combinação de maternidade, berçário e viveiro em mar aberto, onde é possível o controlo do ciclo de vida total desde a fase de desova, semente e até à idade adulta. Atualmente, na maternidade são produzidas apenas estas duas espécies de amêijoia, onde os principais objetivos visam a replicação das condições ideais encontradas na natureza, respeitando a sua propensão biológica e crescendo até atingirem a fase de semente. Com esse intuito, as instalações beneficiam de acesso direto às águas de qualidade, provenientes da Nazaré, com renovação continua junto à costa. Em mar aberto (*offshore*), localizado no Oceano Atlântico a 3,5 milhas náuticas da costa de Lagos, no Algarve, e com 100 hectares, a empresa desenvolve a sua atividade através do cultivo de juvenis de amêijoia, com as condições ideais, tais como temperaturas amenas, abundância de alimento e renovação constante de água para fazer crescer amêijoas até ao tamanho comercial.

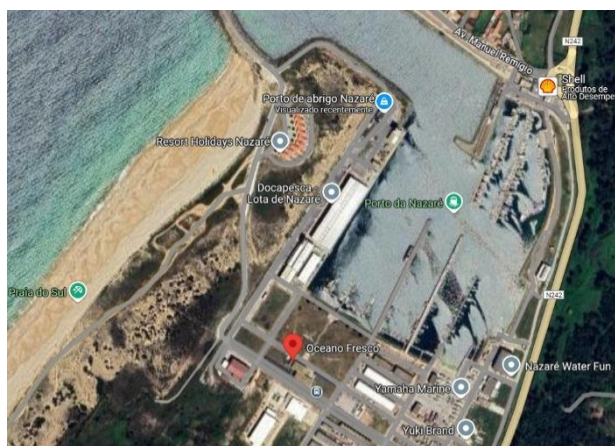


Figura 15 - Localização da empresa Oceano Fresco no Porto de Abrigo da Nazaré (Fonte: Google Maps).

A empresa Oceano Fresco surgiu da identificação de uma necessidade no mercado: diversificação das fontes de proteína e da regeneração da biodiversidade marinha. Ao contrário de outras espécies produzidas, o cultivo de bivalves não requer a utilização de água doce, ração artificial nem antibióticos. Estes organismos alimentam-se exclusivamente de microalgas e requerem baixo consumo de energia. Para além disso, pelas suas características de filtradores e ao contrário de outros animais, não deixam resíduos significativos e ainda melhoram a qualidade da água. Desta maneira, o cultivo de duas espécies de amêijoas em risco de extinção contribui para a diversificação das fontes de proteína e da regeneração da biodiversidade marinha, fornecendo um serviço inovador para o setor da aquacultura. A empresa desenvolve também, projetos de I&D nas áreas de cultivo, genética e patologias, em cooperação com várias universidades, centros de investigação e outros parceiros externos de inovação, tendo, como objetivo final, a criação de novas metodologias e tecnologias para o setor da aquacultura. Acrescenta-se ainda a criação de um programa científico de melhoramento seletivo para a espécie de amêijoia-boua (*R. decussatus*) e de amêijoia-macha (*V. corrugata*).

### 3. Desenvolvimento do programa de estágio (descrição dos trabalhos efetuados)

#### 3.1. Abastecimento, armazenamento e tratamento de água

Todas as instalações de aquacultura necessitam de um abastecimento de água. É importante dispor de uma fonte de água fiável e de boa qualidade e, equipamento para transferir a água para dentro da instalação. O volume de água necessário depende do tamanho da instalação, das espécies e do sistema de produção e, em alguns casos, pode ser muito grande, até várias centenas de metros cúbicos por minuto. Se o sistema de abastecimento ou distribuição de água falhar, pode resultar numa catástrofe para a instalação de aquacultura. Este facto também enfatiza a importância de um conhecimento adequado nesta área. A conceção e construção corretas do sistema de entrada de água é um requisito absoluto para evitar os problemas que podem surgir, por exemplo, quando o sistema de entrada é demasiado pequeno e o caudal de água para a instalação é inferior ao esperado (Lekang, 2013). Na empresa Oceano Fresco, o abastecimento de água doce é feito através de um ramal de ligação à rede geral dos serviços públicos de abastecimento de água potável da rede pública de distribuição, tendo sido desenvolvidas duas redes de água doce, fria e quente, para usos sanitários e gerais. Relativamente à captação de água salgada foram aproveitados dois furos que já existiam da antiga instalação do porto da Nazaré (Figura 16). Nesses furos foram instaladas duas bombas submersíveis em aço inoxidável. A partir deste furo saem duas tubagens subterradas até à maternidade.

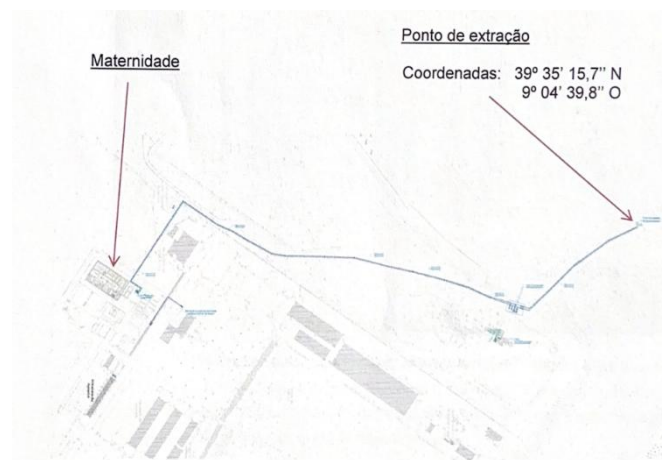


Figura 16 - Localização do ponto de extração de água salgada (Fonte: Oceano Fresco).

A qualidade da água é um dos fatores mais determinantes na escolha do local para a maternidade, pois o seu sucesso depende da manutenção de boas condições ao longo do ano. Além disso, a elevada necessidade diária de grandes volumes de água torna essencial a sua qualidade. Mesmo quando a água é de excelente qualidade, esta deve ser tratada para remover organismos indesejados, tais como o zooplâncton, fitoplâncton, bactérias e vírus. Embora o sistema de tratamento de água de cada maternidade dependa de vários fatores (qualidade inicial da água, desenho das instalações, preferências do operador...), a instalação desta maternidade segue um esquema semelhante a outras instalações. A figura 17 descreve todas as etapas e processos de tratamento aplicados à água de cultivo. A água começa por ser bombeada, através de duas bombas de captação, diretamente desde os furos até aos dois reservatórios com

capacidade de 30 m<sup>3</sup> cada (figura 17. A), onde é realizada primeiramente uma sedimentação. A partir deste reservatório, a água é sujeita a dois tipos de filtração mecânica, passando em primeiro lugar por filtros de areia (figura 17. B), onde as partículas superiores a 50 µm são retidas, e, em segundo lugar, por filtros de cartucho (figura 17. C), de modo a reter as partículas entre 10 e 1 µm. De seguida, a água é esterilizada de modo a remover todos os tipos de microrganismos através de luz ultravioleta (figura 17. D). Por fim, com o auxílio de permutadores, é possível ter várias linhas com água a diferentes temperaturas controladas. Atualmente, estão disponíveis 4 linhas de água, a ambiente, a temperada, a quente e a fria, podendo estas ser alteradas consoante as necessidades do cultivo. Para o cultivo de fitoplâncton na sala do inóculo, por segurança, a água volta a ser esterilizada com vapor a alta pressão, através de uma autoclave de grande capacidade, antes de ser utilizada.



Figura 17 - Estação de Tratamento da água no exterior da maternidade. A. Reservatórios; B. Filtros de areia; C. Filtros de cartucho e D. Luzes Ultravioleta.

### 3.2. Circulação hidráulica

O circuito hidráulico entra no edifício por um único sítio, sendo posteriormente dividido por todas as salas de produção, através de tubagens. Toda a canalização de água salgada fica à vista, sendo que todos os materiais das tubagens e todos os acessórios, tais como as válvulas, são em policloreto de vinila (PVC). A alimentação da rede é feita sob pressão pelo que foi instalado um sistema hidropressor adequado para água salgada, formado por uma central hidropneumática para água salgada, equipada com 3 eletrobombas principais de 20 m<sup>3</sup>/h de caudal. Para otimizar as condições de cultivo, a temperatura da água é controlada e, cada secção da maternidade tem acesso a água com uma determinada temperatura, que poderá ser diferente consoante a espécie e a fase do cultivo. Para esse controlo da temperatura da água nos sistemas, utiliza-se um *chiller*. Este equipamento permite manter uma temperatura constante e adequada de modo a otimizar várias funções vitais da espécie, tais como crescimento e reprodução. Além disso, a temperatura controlada reduz a mortalidade e o stress nos animais, prevenindo surtos patogénicos e também melhorando a eficiência energética do sistema (Boyd, 2017).

### 3.3. Sala do Inóculo de microalgas

Os bivalves alimentam-se por filtração, principalmente de fitoplâncton, como referido anteriormente. Desta forma, o cultivo de fitoplâncton na maternidade é fulcral de modo a garantir o acondicionamento de reprodutores e o crescimento ótimo de larvas, juvenis e semente. Na sala do inóculo, são produzidas quatro espécies de microalgas flageladas — *Isochrysis galbana* (IG), *Tisochrysis lutea* (T-iso), *Tetraselmis chuii* (Tchuii) e *Dicrateria lutheri* (DL) — e três espécies de diatomáceas — *Chaetoceros gracilis* (Chg), *Chaetoceros calcitrans* (Chc) e *Chaetoceros muelleri* (Ch. Mue) — para alimentar as amêijoas ao longo das várias fases do seu desenvolvimento. A produção das microalgas é iniciada a partir de culturas inóculo ("stock"), que representam a fase asséptica do cultivo (figura 18). O objetivo destas culturas é conservar várias estirpes de modo a garantir o abastecimento regular da produção com culturas puras e fornecer continuamente inóculos para os grandes volumes de produção. As espécies a manter e o número de replicados por espécie estão de acordo com o planeamento da produção. É possível conservar-se espécies em tubo de ensaio para utilização em outras épocas do ano. Neste caso, as culturas para inóculo são mantidas em pequenos volumes em recipientes de plástico, mais especificamente de policarbonato - *T-flask* (ou frascos em "T") – sendo ideais para o inóculo de culturas de microalgas pois são fechados com tampas ventiladas, reduzindo o risco de contaminação. Estas são armazenadas numa estante dentro da câmara climatizada a uma temperatura controlada entre 18 e 20°C, em condições de esterilidade, utilizando lâmpadas de radiação ultravioleta. Esta sala possui uma câmara de fluxo laminar onde se realizam as repicagens, sempre que necessário. Todas as culturas estão sob iluminação contínua, sendo agitadas ligeiramente todos os dias, no caso dos erlenmeyers de 500 mL que não têm arejamento contínuo. Já para os balões de 6L, é fornecido arejamento contínuo com a adição de dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>.

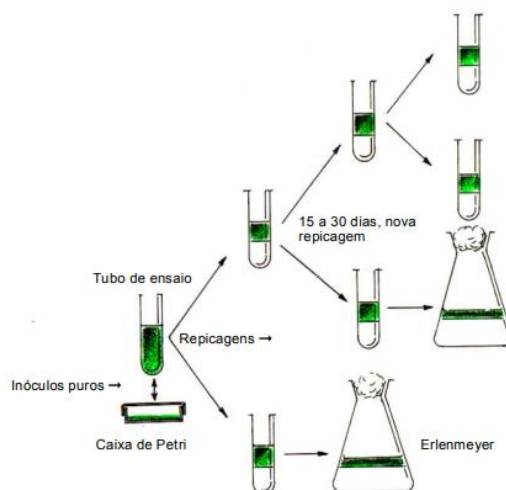


Figura 18 - Esquema da repicagem de inóculos (Fonte: Ferreira, 2009 - Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos.)

A produção de volumes sucessivamente maiores é realizada durante a fase exponencial do cultivo, tendo como objetivo cobrir as necessidades da produção. Nesta fase é fundamental o controlo da densidade e a da qualidade das culturas, pois se existir contaminações não há crescimento. Para garantir um cultivo eficiente e de alta qualidade, é fundamental seguir um conjunto de rotinas diárias que assegurem a manutenção das culturas, a sua propagação e a deteção precoce de possíveis contaminações. Deste modo, as principais atividades realizadas

nesta sala incluem a contagem e monitorização da densidade celular, a divisão das culturas, a preparação de meios de cultura estéreis, a esterilização de materiais e o controlo microbiológico de modo a prevenir o crescimento de organismos indesejados.

A monitorização da densidade celular das culturas de microalgas é fundamental para avaliar o seu crescimento e qualidade, sendo também um parâmetro essencial na formulação das dietas para as fases larvares e pós-larvares das amêijoas. A determinação da densidade celular é realizada diariamente através da recolha de amostras do mix (uma mistura de diferentes espécies de microalgas da sala dos sacos, fornecida exclusivamente a indivíduos juvenis e adultos), da sala de *Batch* e da sala dos sacos. Antes da diluição das amostras para contagem, são efetuadas observações microscópicas das culturas puras para detetar possíveis contaminações, garantindo a qualidade das dietas fornecidas aos indivíduos em desenvolvimento. Nos períodos em que há organismos em fase larvar e pós-larvar, procede-se também à quantificação celular nos sacos e balões utilizados na alimentação, assegurando um controlo rigoroso deste parâmetro. Para a recolha das amostras, utilizam-se pipetas de Pasteur esterilizadas. A contagem celular é efetuada com recurso a uma câmara de Neubauer, sob microscopia ótica. Dado que a densidade das culturas pode variar, é necessário proceder a diluições antes da contagem, ajustando a proporção de acordo com a concentração da cultura. Culturas menos densas, como o mix, são diluídas numa proporção de 1:6, o que corresponde à diluição de 100  $\mu\text{L}$  de amostra em 500 microlitros de água salgada. Já em culturas mais concentradas, como os balões de seis litros, aplica-se uma diluição de 1:27, onde 100  $\mu\text{L}$  da amostra são diluídos em 26 000  $\mu\text{L}$  de água salgada. Após a diluição, no caso das microalgas flageladas, é adicionada uma gota de formol, com o objetivo de facilitar a contagem das células.

A câmara de Neubauer deve estar devidamente limpa e seca antes da utilização para evitar contaminações e garantir medições precisas. Para a preparação da amostra, coloca-se cuidadosamente uma lamela sobre a câmara e, com o auxílio de uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, introduzem-se 10  $\mu\text{L}$  da amostra na ranhura lateral da câmara. A amostra deve espalhar-se por capilaridade, preenchendo o espaço entre a lamela e a superfície da câmara de forma homogénea, sem a formação de bolhas de ar, pois estas podem comprometer a precisão da contagem. Após a preparação, a câmara de Neubauer é colocada sob um microscópio ótico, sendo a observação realizada com objetiva de 10x ou 40x, dependendo do tamanho das células. A estrutura da câmara de Neubauer apresenta diferentes áreas de contagem, conforme ilustrado na figura 19. Existem quatro regiões periféricas, indicadas com o número 1, sendo que cada uma destas é subdividida em 16 quadrantes de igual área, identificados com o número 2. Estas regiões periféricas são recomendadas para a contagem de células de maior volume ou em baixa concentração (Soares, 2020), sendo este o método adotado para a quantificação de microalgas.

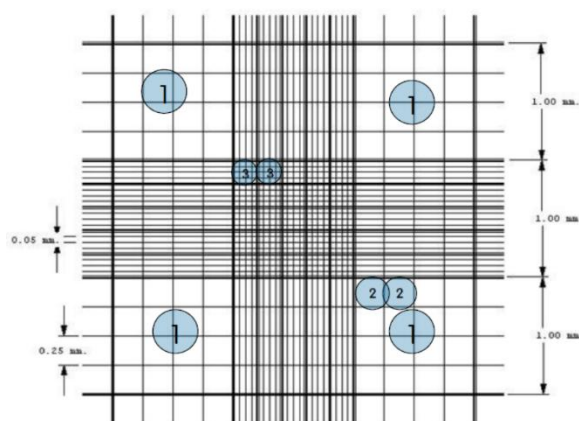


Figura 19 - Representação esquemática das áreas de contagem da câmara de Neubauer (Fonte: Soares, 2020 - Projeto e desenvolvimento de microfermentadores monitorados por sensor de fibra óptica).

O cálculo da densidade celular (DC) é realizado da seguinte forma:

$$DC = \frac{M \times D}{0,1}$$

Onde: M é a média das 4 contagens obtidas nos campos 1 e D da diluição aplicada à amostra. O valor obtido é dividido por 0,1 uma vez que o número de células num campo L corresponde a 0,1  $\mu$ l, ou seja,  $10^{-4}$  ml.

A esterilização é um passo crítico para evitar contaminações e garantir que as microalgas cresçam num ambiente livre de microrganismos. Para a esterilização de material, tais como, balões, frascos, Erlenmeyers, provetas e outros materiais de inoculação reutilizáveis, estes são submetidos a um processo de esterilização de modo a garantir que estejam livres de agentes contaminantes antes de serem utilizados novamente. Para isso, é realizada a preparação de balões de vidro de 6 litros com uma mistura de água doce e salgada necessária para o meio de cultivo das microalgas. Juntamente com os balões, o restante material é posteriormente submetido a uma esterilização em autoclave. Também na descontaminação de resíduos biológicos, antes da eliminação, os resíduos de materiais microbiológicos (placas de Petri de Marine Agar e *Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar* (TCBS)) são também submetidos a um ciclo de autoclavagem. É de ressaltar que a correta preparação e operação da autoclave é essencial para evitar falhas na esterilização, que podem comprometer toda a qualidade e a fase das culturas.

Todas as semanas são realizadas divisões das microalgas, utilizando balões e Erlenmeyers que tenham 7 dias desde a última divisão. São preparados à chama os balões de seis litros, com a mistura de água doce e água salgada previamente autoclavada, com a adição de 40 mL de nutrientes (fig. 20. A) e 4 mL de silicatos, somente às espécies de diatomáceas. Seguidamente é transferida a cultura para os balões (fig. 20. B) e os mesmos são colocados na prateleira com arejamento reduzido (fig. 20. C). A realização da divisão dos Erlenmeyers é realizada na câmara de fluxo laminar. A cada Erlenmeyer são adicionados 300 mL de meio fresco (fig. 19. D) – mistura de água doce e água salgada com adição de nutrientes – previamente preparado, e, no caso das espécies de diatomáceas, são adicionados 300  $\mu$ l de silicatos. Depois são transferidos 50 mL da

cultura antiga para o novo Erlenmeyer (fig. 20. E) e o mesmo é colocado na estante (fig. 20. F). Estes procedimentos garantem um crescimento progressivo e evitam a degradação do meio de cultura devido à acumulação de metabolitos.

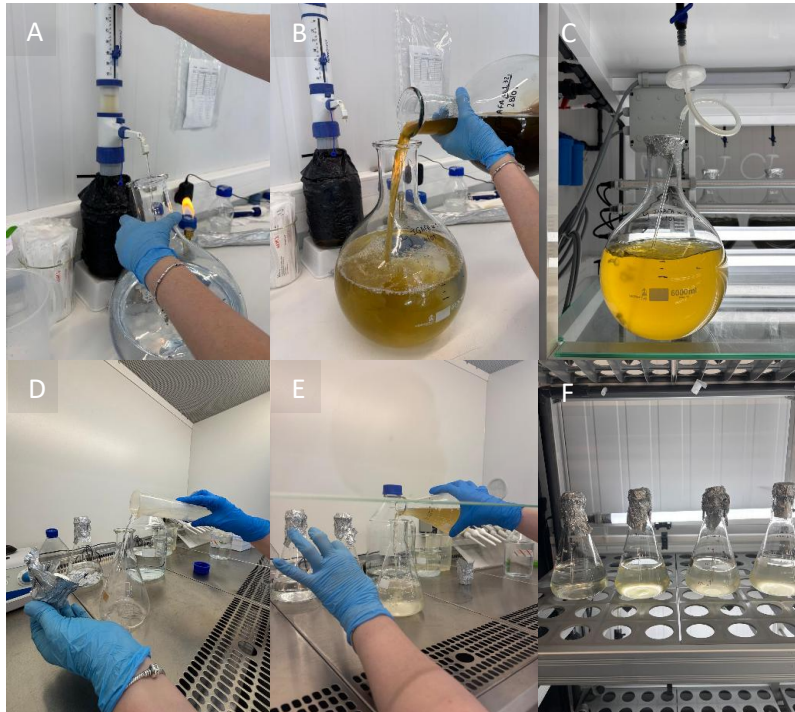


Figura 20 - Processo de divisão das culturas de microalgas. A. Adição de nutrientes; B. Transferência da cultura antiga para os novos balões; C. Colocação na prateleira para crescimento; D. Adição de meio fresco; E. Transferência da cultura antiga para os novos Erlenmeyers e F. Colocação na estante para crescimento.

Para além deste processo tradicional, otimizou-se o cultivo através da inoculação em linha, utilizando balões com *bung* (figura 21). Esta técnica consiste em conectar uma mangueira, previamente esterilizada, na zona de recolha de cultura da *bung* do balão e, com a mola de entrada do ar fechada, é criada uma pressão de ar positiva que permite a transferência direta da cultura para o novo balão. Desta forma, reduz-se significativamente o risco de contaminação, melhora-se a eficiência do processo e assegura-se uma transferência mais controlada da cultura.

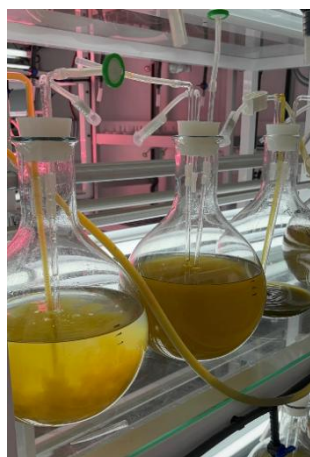


Figura 21 - Processo de divisão das culturas de microalgas: inoculação em linha.

É realizada uma monitorização constante das culturas de microalgas e da água corrente através de análises microbiológicas que permitem a deteção precoce de contaminações. Este processo envolve várias etapas: a preparação de meios de cultura para a deteção de possíveis contaminantes, onde se utilizam dois meios de cultura principais, o Marine Agar, que é utilizado para a deteção e quantificação de bactérias heterotróficas presentes nas culturas e o TCBS, um meio seletivo para a deteção de *Vibrio* spp., um género de bactérias potencialmente patogénicas para os bivalves. Estes meios são preparados, esterilizados e posteriormente vertidos em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar para garantir que permaneçam estéreis até ao momento da inoculação. As amostras de culturas de microalgas e águas correntes são inoculadas em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar. Para garantir a assepsia do procedimento, inicia-se com a preparação do material necessário, incluindo as placas de Marine Agar e TCBS, que são retiradas do frigorífico e submetidas a um ciclo de UV de 30 minutos na câmara de fluxo laminar (figura 22). Durante este período, procede-se à recolha das amostras para Falcons de 15 mL estéreis. São recolhidas seis amostras dos tanques de colheita, seis das linhas de colheita de microalgas e uma da água que passa após o pasteurizador da sala dos sacos. Adicionalmente, recolhem-se amostras da água corrente da sala da semente, das salas dos larvários (caso estejam operacionais), da sala do *Batch*, da sala dos reprodutores e da água tratada pelo UV na área técnica.

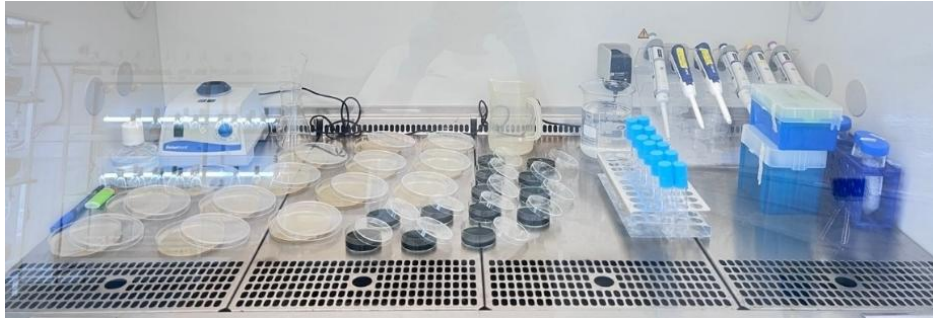


Figura 23 - Preparação do material necessário para procedimentos microbiológicos na câmara de fluxo laminar.

Para as amostras das linhas da sala dos sacos, procede-se à realização de diluições decimais seriadas, dado que estas apresentam geralmente uma maior carga microbiana (UFC). Este método permite reduzir a densidade celular para uma concentração adequada à contagem e quantificação de colónias de bactérias (figura 23). As diluições são realizadas dentro da câmara de fluxo laminar, garantindo a esterilidade do processo. Antes da utilização, são autoclavados tubos de ensaio com 4,5 mL de uma mistura de água salgada e água doce. O procedimento inicia-se com a transferência de 500  $\mu\text{L}$  da amostra pura para o primeiro tubo de ensaio, originando uma diluição de  $10^{-1}$ . Após homogeneização em vortex, 500  $\mu\text{L}$  desta diluição são retirados e adicionados a um segundo tubo, obtendo-se uma diluição de  $10^{-2}$  (figura 23). Após a preparação das diluições, procede-se à inoculação das amostras nas placas de Petri. Para as placas de Marine Agar, pipetam-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída sobre a superfície do meio sólido. De seguida, adicionam-se *beads* esterilizadas, pequenas esferas de vidro ou plástico utilizadas para dispersar uniformemente a suspensão de microrganismos – um processo conhecido como *glass bead spreading*. As placas são agitadas suavemente para garantir uma distribuição homogénea e as *beads* são descartadas num goblet contendo solução de limpeza. Para a inoculação das placas de TCBS, pipeta-se 1 mL de amostra pura e realiza-se uma agitação suave (figura 23). O excesso de amostra é então descartado para um goblet. Por fim, todas as placas são colocadas na estufa de incubação a 25°C durante 72 horas.

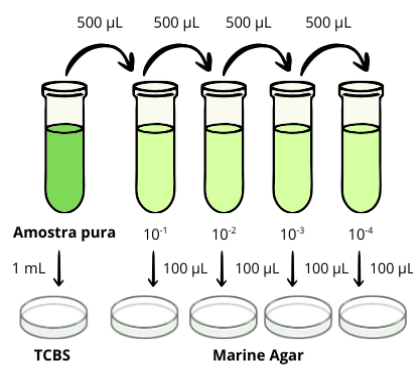


Figura 22 - Diluições decimais seriadas para inoculação de placas de Marine Agar e inoculação de placas de TCBS, através da amostra pura.

Após a incubação, as placas são analisadas para detetar possíveis contaminações. Quando presentes, realizam-se novas análises. No caso das culturas da sala dos sacos, cada saco é avaliado individualmente. Os sacos contaminados são descartados e os procedimentos de

asepsia revistos, de forma a prevenir recorrências. A aplicação rigorosa destas rotinas assegura a qualidade dos cultivos de microalgas, essenciais para a alimentação das amêijoas e para o sucesso da produção aquícola.

### 3.4. Sala dos Sacos

A sala dos sacos é a fase seguinte à sala do inóculo, onde a produção de microalgas passa para volumes maiores, permitindo a obtenção de grandes quantidades de biomassa que serão usadas na alimentação de todas as fases de desenvolvimento das amêijoas. O sistema desta sala está dividido em quatro partes: 1) tratamento da água; 2) distribuição da água pelas 6 linhas; 3) distribuição da água por cada saco e 4) colheita (figura 24). Antes de entrar na sala dos sacos, a água passa por um sistema de tratamento (figura 25). A água começa por ser filtrada através de dois filtros de cartucho, com uma capacidade de retenção de 1  $\mu\text{m}$ . Depois, segue para o permutador onde sofre um primeiro aquecimento antes de entrar no pasteurizador. Ao entrar no pasteurizador atinge os 85°C, de modo a eliminar qualquer contaminação microbológica. A água sai do pasteurizador e volta a passar pelo permutador, onde arrefece antes de entrar no sistema de distribuição para as linhas e conseqüentemente para dentro de cada saco. Após o processo de pasteurização, os nutrientes são injetados e a água é então distribuída pelas 6 linhas do sistema. À parte deste sistema são adicionados nutrientes na concentração de 2 mL por litro de água e também é adicionado dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) ao ar, de modo a favorecer o crescimento das microalgas.

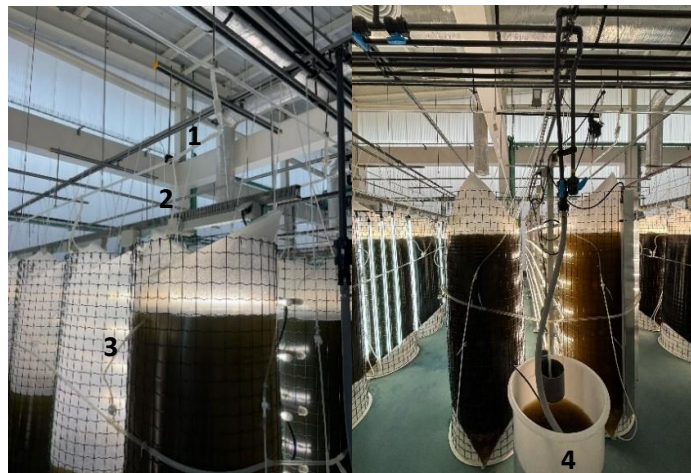


Figura 24 - Sistema de entrada de água e colheita de microalgas da sala dos sacos: 1. Distribuição da água pelas linhas; 2. Distribuição da água por cada saco; 3. Colheita de microalgas e 4. Recolha da colheita de microalgas.



Figura 25 - Estação de tratamento da água da sala dos sacos. 1. Filtros de cartucho; 2. Permutador; 3. Pasteurizador; 4. Tanque dos nutrientes; 5. Injeção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).

A sala dos sacos opera em sistema contínuo, composto por 6 linhas, cada uma com 14 sacos, fazendo um total de 84 sacos. O material dos sacos é polietileno e a sua capacidade é de 350 litros. Cada linha é dedicada a uma espécie específica de microalga, o que facilita o controlo da produção e reduz o risco de contaminação cruzada. São cultivadas 6 espécies no total: quatro espécies flageladas: *I. galbana* (IG), *Tisochrysis lutea* (T-iso), *T. chuii* (Tchuii) e *D. lutheri* (DL) e duas espécies de diatomáceas — *C. gracilis* (Chg) e *C. muelleri* (Ch. Mue). Após a inoculação, os sacos recebem continuamente água enriquecida com nutrientes, permitindo o crescimento constante das microalgas. O caudal de água é inicialmente controlado por um caudalímetro e ajustado por capilares individuais antes de entrar em cada saco, assegurando um fornecimento adequado. O sistema é ainda apoiado por um arejamento contínuo com ar enriquecido em dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, que é ajustado diariamente conforme as necessidades de cada cultura. A adição de nutrientes é controlada por um sistema informático, assegurando uma dosagem precisa e constante. No caso das diatomáceas, os silicatos são adicionados manualmente a cada saco nas respetivas linhas.

Os sacos são colhidos semanalmente, sendo selecionados com base no tempo de cultivo, dando-se prioridade aos que apresentam um tempo de cultivo mais avançado. A colheita é realizada através da perfuração do saco com uma mangueira previamente desinfetada, direcionando o conteúdo para os tanques de colheita. Após este processo, são colocados novos sacos nas respetivas linhas, que ficam a encher com água e ar, ficando prontos para a inoculação no dia seguinte. A inoculação dos sacos de cultivo no sistema em linha é realizada a partir de balões de cultura de 6 L que contêm microalgas na fase de crescimento exponencial. Cada saco é inoculado com um balão, conforme ilustrado na figura 26. A transferência do inóculo para os sacos é feita através de uma ligação direta em linha, como descrito anteriormente na sala do inóculo. A *bung* dos balões possui três orifícios: um para a entrada de ar, outro para a saída de ar e um terceiro destinado à recolha da cultura. Para efetuar a transferência, liga-se uma mangueira da entrada de ar do saco à entrada de ar do balão. De seguida, conecta-se uma mangueira de colheita do balão ao saco e, por fim, fecha-se a mola da saída de ar do balão. Este procedimento cria uma pressão interna que permite a passagem controlada da cultura para o saco (figura 26). Todo o material utilizado (tubagem de silicone) é previamente esterilizado, garantindo condições assépticas e minimizando o risco de contaminação.



Figura 26 - Inoculação em linha na sala dos sacos. A. Entrada do ar; B. Saída do ar e C. Entrada da cultura.

A gestão dos sacos é realizada em função do volume e das espécies em cultivo, garantindo uma transição gradual e controlada do cultivo. Este processo permite realizar um *scale-up* eficaz,

assegurando que as microalgas se desenvolvem em condições ótimas à medida que passam de volumes menores para maiores. A gestão destes procedimentos é acompanhada de registos diários, onde se assinala a data em que os sacos são colhidos e inoculados, bem como o momento em que um saco inicia a sua colheita. É também registado o número de sacos em colheita por dia, o que permite planear de forma eficiente o fornecimento de microalgas às diferentes salas da maternidade.

A prevenção de contaminações é uma prioridade, sendo que as práticas de controlo, já descritas anteriormente, focam-se na monitorização microbiológica regular para detetar possíveis contaminações, com a eliminação imediata de culturas comprometidas e na limpeza e desinfeção contínuas das linhas e equipamentos para evitar a propagação de microrganismos indesejados. Diariamente, é efetuada uma recirculação das bombas de colheita a 200 ppm de hipoclorito de sódio e de seguida é utilizada uma solução neutralizante, de tiosulfato de sódio, em concentração de acordo com a graduação do hipoclorito, após meia hora de recirculação. Para confirmar que não existem vestígios de lixívia, são utilizados kits de reativos líquidos.

Durante o processo de cultivo, são realizados procedimentos regulares de limpeza das tubagens e tanques de colheita, com o objetivo de prevenir contaminações microbiológicas e assegurar a qualidade do sistema. Estes procedimentos incluem a utilização de soluções desinfetantes e agentes neutralizantes, aplicados em diferentes salas (sementes, reprodutores, *Batch* e sacos), de acordo com uma periodicidade definida. A execução sistemática destas limpezas garante a manutenção das condições higiénicas necessárias ao bom desempenho das culturas. Com este sistema bem organizado e monitorizado, a sala dos sacos assegura a produção contínua e eficiente de microalgas, garantindo que as condições ideais de cultivo sejam mantidas para o sucesso da alimentação de todas as fases de desenvolvimento das amêijoas.

### 3.5. Sala do *Batch*

Para além da sala dos sacos, foi criada a sala do *Batch*, de forma a dar resposta à necessidade de aumentar a produção de microalgas. O crescimento do número de sementes nas unidades de produção levou a um aumento da procura de alimento, tornando essencial a existência de um sistema de produção adicional. Assim, a sala do *Batch* permite produzir maiores volumes de microalgas de forma contínua, garantindo a alimentação necessária para as sementes de amêijoa e os reprodutores. Nesta sala, a produção é dedicada exclusivamente a duas espécies de microalgas diatomáceas (*C. calcitrans* e *C. gracilis*), selecionadas pela sua elevada qualidade nutricional e importância no desenvolvimento dos bivalves.

Os tanques utilizados são construídos em fibra de vidro, com uma capacidade máxima de 3000 litros cada. Cada tanque está equipado com um sistema de *air-lift*, desenvolvido internamente pela empresa, utilizando tubagens e materiais de PVC. O sistema de *air-lift* foi desenvolvido através da realização de pequenos furos ao longo da tubagem central, permitindo assim a libertação de ar e uma circulação contínua da cultura dentro do tanque, assegurando a homogeneização das microalgas e promovendo a sua oxigenação. Esta circulação é fundamental para evitar a sedimentação das células e garantir condições ideais de crescimento ao longo de todo o volume de cultivo. O funcionamento do sistema de *air-lift* baseia-se na introdução de ar comprimido no fundo do tanque, através da tubagem de PVC. À medida que o ar é libertado, forma bolhas que ascendem pela coluna de água, arrastando consigo a cultura de microalgas. Este movimento cria uma circulação constante dentro do tanque, promovendo a mistura homogénea das células e assegurando uma boa oxigenação da cultura. Além disso, o movimento gerado pelo *air-lift* reduz o risco de sedimentação das microalgas no fundo do tanque, mantendo-as em suspensão e favorecendo um crescimento saudável e uniforme.

Todos os dias, são recolhidos e inoculados dois tanques da sala do *Batch*. Para a recolha dos tanques são utilizadas uma bomba e uma mangueira específicas, que transportam o conteúdo para a sala da semente, mais concretamente para os "pulmões" (tanques da sala da semente). Após a recolha estar completa, os tanques são desinfetados. É realizada uma limpeza cuidada de todas as tubagens e equipamentos de cultivo, de forma a prevenir contaminações microbiológicas e garantir a manutenção das condições adequadas para a inoculação e crescimento das culturas.

A inoculação dos tanques é uma das etapas cruciais nas rotinas diárias da sala do *Batch*, sendo responsável pela introdução das culturas iniciais de microalgas. Este processo deve ser realizado com precisão para assegurar o desenvolvimento adequado das microalgas e garantir a alimentação necessária para os bivalves. Antes do processo de inoculação, começa-se pela limpeza com água doce e posterior montagem dos sistemas de *air-lift*. De seguida, enche-se cada um dos tanques com água salgada. Após os tanques estarem com o volume de 1500 L de água salgada, adicionam-se os nutrientes e os silicatos. Antes da inoculação dos tanques, a válvula do ar é então aberta, permitindo que o ar comprimido seja introduzido no fundo do tanque. Esse processo facilita a homogeneização dos nutrientes e silicatos na água, garantindo que as microalgas recebam uma distribuição uniforme desses elementos essenciais para o seu desenvolvimento.

Na sala do *Batch*, existem três métodos principais de inoculação das microalgas, adaptados às necessidades específicas de cada cultivo. Para a espécie de *C. calcitrans*, a inoculação é feita utilizando quatro balões provenientes da sala do inóculo. A cultura é previamente preparada na sala do inóculo e os balões são vertidos diretamente para o tanque. Para a outra espécie, *C. gracilis*, a inoculação é realizada com o uso de um saco proveniente e selecionado previamente na sala dos sacos. O processo começa com a perfuração do saco, realizada com uma mangueira higienizada, dentro da própria sala. O conteúdo do saco é então transferido para um pequeno tanque e, de lá, para o tanque maior da sala do *Batch*, utilizando uma bomba e uma mangueira. Além disso, quando a densidade celular no tanque de origem está adequada, é possível realizar a inoculação de tanque para tanque, sem recorrer a balões ou sacos. Este terceiro método é utilizado para ambas as espécies de diatomáceas. O novo tanque é preenchido previamente com água salgada, nutrientes e silicatos e, apenas uma parte do conteúdo do tanque de origem é transferida para o novo tanque utilizando uma bomba e uma mangueira específicas para cada espécie (figura 27). Por fim, após a inoculação, independentemente do método utilizado, o sistema de *air-lift* é conectado à válvula do ar e é ativado de modo a garantir a oxigenação e homogeneização da cultura. Além disso, é adicionada uma pedra de arejamento à mangueira pertence à injeção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo depois aberta a válvula correspondente, o que permite a difusão do gás e promove o crescimento adequado das microalgas. O CO<sub>2</sub> é essencial para a fotossíntese das microalgas, promovendo o seu crescimento e aumentando a produtividade da cultura. Também são adicionadas luzes LED, que proporcionam o ambiente adequado para o crescimento das microalgas. O ar proveniente do sistema de *air-lift*, juntamente com a injeção de CO<sub>2</sub> e com as luzes LED, trabalham em conjunto para criar um ambiente ideal para o desenvolvimento das microalgas.



Figura 27 - Procedimentos de preparação e inoculação de tanques na sala do *Batch*.

Independentemente do método utilizado, é essencial adotar medidas rigorosas para evitar a contaminação entre as culturas. Para garantir a pureza de cada espécie de microalga, é utilizado material específico para cada processo, como bombas e mangueiras devidamente identificadas e separadas. Cada espécie possui o seu próprio conjunto de material, que é etiquetado e mantido isolado, evitando a troca de material entre cultivos e minimizando o risco de contaminação cruzada.

Com o objetivo de otimizar a produção de microalgas e avaliar o potencial de sistemas tecnológicos avançados no apoio à alimentação de bivalves, foram instalados na maternidade dois fotobiorreatores (PBR) fechados, com capacidade de 1250 litros, de funcionamento automatizado e características técnicas sofisticadas. Esta introdução teve um carácter complementar e experimental, não substituindo os métodos convencionais de cultivo, mas permitindo testar a sua eficácia em paralelo, no contexto da alimentação das duas espécies de bivalves produzidas na maternidade. Este PBR apresenta uma estrutura vertical compacta, iluminação LED regulável, sensores em tempo real e um sistema automatizado de controlo de variáveis críticas como temperatura, pH, fotoperíodo e concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Integra ainda um sistema interno de agitação por recirculação eficiente, bem como circuitos dedicados ao fornecimento de meio de cultura e à colheita (*harvest*) da biomassa. Estas funcionalidades permitem manter condições de cultivo mais estáveis, alcançar elevadas densidades celulares, reduzir o risco de contaminação e minimizar a necessidade de intervenção manual. A introdução destes equipamentos representa, assim, uma etapa importante na avaliação de soluções tecnológicas inovadoras, com vista à melhoria da eficiência, previsibilidade e qualidade da produção de microalgas destinadas à alimentação larvar em maternidades de bivalves.

O processo de inoculação do PBR é realizado com culturas previamente desenvolvidas na sala do inóculo, nomeadamente culturas com sete dias de crescimento, assegurando a pureza e viabilidade das microalgas. O volume inicial da inoculação correspondeu a aproximadamente 10 litros, ao qual é adicionado meio de cultura estéril enriquecido com nutrientes e silicatos, essenciais ao crescimento da espécie *Chaetoceros gracilis*. Após a inoculação, o cultivo é monitorizado diariamente, registando-se um aumento progressivo da densidade celular, acompanhado pela intensificação da coloração e turbidez da cultura. As condições ambientais no interior do reator mantêm-se estáveis e otimizadas para a espécie em questão, e os dados de crescimento são acompanhados através de contagens celulares com uma câmara de Neubauer. Em regime de funcionamento semi-contínuo, o PBR realiza automaticamente o reabastecimento com água do mar após cada colheita, assegurando a continuidade da cultura sem interrupção do ciclo produtivo. Diariamente, é efetuada uma colheita diretamente do PBR para um dos tanques da sala do *Batch* (figura 28), previamente preparado com sistema de *airlift*, água do mar, nutrientes e silicatos (procedimento descrito anteriormente), de forma a garantir um ambiente propício ao crescimento e manutenção da biomassa transferida. Este processo rotativo permite a utilização eficiente dos recursos e garante uma alimentação diária e estável das sementes e dos reprodutores de amêijoas, em alinhamento com os objetivos experimentais e operacionais da maternidade.



Figura 28 - Procedimento de inoculação de tanques na sala do Batch com o fotobiorreator (PBR).

### 3.6. Sala dos reprodutores

#### 3.6.1. Receção e acondicionamento dos reprodutores

O acondicionamento do stock de reprodutores, de modo a preparar os moluscos bivalves para a desova, é uma etapa crucial na operação de maternidades de bivalves. O objetivo do acondicionamento do stock de reprodutores é atingir a fecundidade máxima dos adultos, preservando a qualidade e a viabilidade dos gâmetas, bem como a saúde geral do bivalve (da Costa *et al.*, 2020). A manutenção dos reprodutores na maternidade para a obtenção de desovas controladas pode ser realizada de acordo com duas estratégias. Por um lado, pode-se tirar partido da temporada de desova natural, utilizando os reprodutores no momento da maturidade. Por outro lado, eles podem ser acondicionados na maternidade fora da sua época de desova natural. Para acondicioná-los controla-se o ambiente físico e o alimento, promovendo o desenvolvimento gonadal e a gametogénese, a fim de adiantar a maturidade sexual ou

prolongar os períodos de desova natural. Durante o acondicionamento, os principais fatores ambientais que geralmente afetam os reprodutores são a temperatura e a alimentação. As mudanças de temperatura sazonais e a abundância do fitoplâncton no ambiente natural estão muitas vezes relacionados com o desenvolvimento das gónadas e a gametogénese nos invertebrados marinhos. É por isso que, para promover a maturação dos reprodutores durante o acondicionamento, estes são submetidos a um aumento da temperatura e são administradas maiores quantidades de alimento.

Na maternidade, o acondicionamento de reprodutores realiza-se em caixas retangulares (120 L) de polietileno (Figura 29). Os reprodutores são colocados nas caixas dentro de bandejas perfuradas, de modo a permitir a passagem de fezes e detritos. Os reprodutores são mantidos em circuito aberto e com arejamento constante e, em cada uma das caixas, são colocados reprodutores de tamanho comercial (30-40 mm). É fornecido um fluxo de água de 60 L/h às caixas, e por isso o volume total da caixa será renovado a cada 3-4 horas. A alimentação dos reprodutores é feita diariamente, com uma dieta mista de todas as espécies cultivadas na maternidade, numa ração entre 3 e 6% do peso seco de microalgas em relação ao peso seco da carne dos reprodutores. O fitoplâncton é adicionado continuamente através de uma tubagem para permitir um melhor racionamento, evitando assim o seu desperdício. A temperatura de acondicionamento da água é diferente consoante a espécie, no caso da amêijoia-boia (*R. decussatus*), deve ser realizado um aumento gradual da água desde a temperatura ambiente até 20 °C (aproximadamente 0,1 °C por dia), no entanto, no caso da amêijoia-macha (*V. corrugata*), é apenas necessário colocar os reprodutores nos tanques (a uma temperatura entre 16-18 °C) até que desovem.

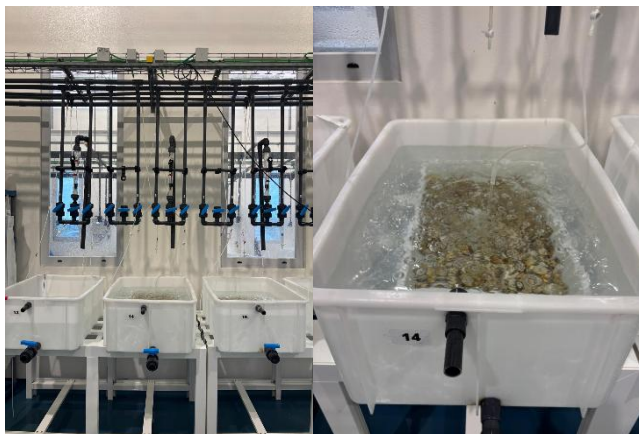


Figura 29 - Acondicionamento dos reprodutores.

O tempo necessário para acondicionar os reprodutores e obter a desova fora da época natural depende da altura em que se inicie o condicionamento, e, portanto, do estado gonadal dos reprodutores no início do mesmo. No caso da amêijoia-boia, os estudos recomendam começar o acondicionamento em finais do inverno (janeiro) quando no meio natural estão a começar a gametogénese. Como já foi mencionado anteriormente, a amêijoia-macha pode desovar durante todo o ano, pelo que o acondicionamento não é necessário. Da mesma forma, depois de se realizar a desova, estas amêijoas podem ser mantidas durante mais um mês nos tanques e é possível obter outra desova do mesmo lote, ou seja, é realizado um período de acondicionamento. Todos os dias os tanques são esvaziados para limpeza, de modo a evitar a acumulação de metabolitos e bactérias. Diariamente, a temperatura da água do tanque é controlada, os indivíduos mortos são retirados e o fluxo de alimento e de água é controlado e ajustado consoante a densidade dentro da sala.

### 3.7. Desova

Para avaliar o estado de maturação dos reprodutores, são feitas amostragens ao longo do tempo, desde a chegada dos reprodutores à maternidade, até à data definida para a desova, de forma que sejam selecionados os reprodutores mais aptos a uma desova de sucesso. A amostragem é realizada através da observação macroscópica da gónada (figura 30) e através da observação de um esfregaço da mesma, ao microscópio ótico (figura 31), avaliando a quantidade e qualidade dos gâmetas, conforme descrito na tabela II. Os lotes que apresentem uma média de reprodutores no estado 3 serão os selecionados para a desova, uma vez que estes têm maior probabilidade de sucesso na libertação de gâmetas e na fecundação, otimizando assim a produção larvar. Este procedimento é essencial para garantir que o processo de reprodução seja realizado com organismos aptos, assegurando o sucesso das fases seguintes do ciclo larvar.

Tabela II - Descrição de cada nível de maturação avaliado a fresco (Escala de avaliação fornecida pela Oceano Fresco).

Nível de Maturação		Descrição	
Estádio	Denominação	Aparência macroscópica	Esfregaço a fresco
0	Repouso	Gónada plana, esbranquiçada e transparente (observam-se os intestinos)	Ausência de gâmetas
1	Desenvolvimento precoce	Gónada continua pequena	Gâmetas começam a aparecer
2	Desenvolvimento tardio	Tamanho da gónada começa a aumentar	Gâmetas começam a ser mais abundantes
3	Maduro (pronto a desovar)	A gónada atinge o seu desenvolvimento máximo ocupa a maior parte da massa visceral	Abundância de gâmetas
4	Pós desova	Gónada em regressão e flácida	Gâmetas residuais



Figura 30 - Observação do estado de maturação de indivíduos da espécie de amêijoia-boia (*R. decussatus* ).

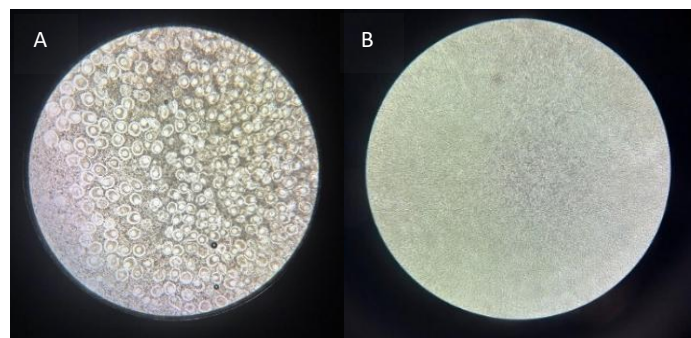


Figura 31 - Fotografias de esfregaço de gónada de amêijoia-macha ao microscópio ótico: (A) fêmea no estado 3, madura e (B) macho no estado 3, maduro.

Após a seleção dos reprodutores, estes são submetidos a um período de jejum, 48h antes da desova, com o intuito de reduzir a carga fecal e, conseqüentemente, minimizar o risco de contaminações durante o processo, bem como para evitar desovas espontâneas. 24h antes da desova, os reprodutores são cuidadosamente recolhidos das caixas e distribuídos por sacos de rede, sendo cada lote identificado com uma abraçadeira de cor distinta para garantir a rastreabilidade. Os sacos são posteriormente acondicionados numa caixa térmica fechada, forrada com cartão e com placas de gelo, de forma a evitar o contacto direto com os organismos. Adicionalmente, são colocados panos humedecidos com água salgada sobre os sacos, mantendo-se assim um ambiente frio e húmido (figura 32). Estas condições visam reduzir a atividade metabólica dos reprodutores e prepará-los fisiologicamente para o estímulo térmico de indução que ocorrerá no dia seguinte.

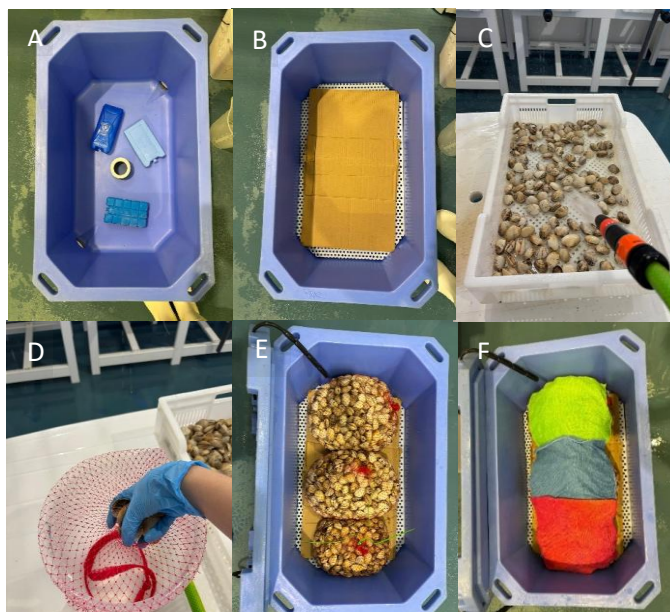


Figura 32 - Recolha e armazenamento dos reprodutores no dia anterior à desova: (A) e (B) Colocação de placas de gelo e papel cartão na caixa; (C) Limpeza dos indivíduos; (D) Recolha e separação por lotes em sacos de rede; (E) e (F) Acondicionamento dos reprodutores na caixa com panos húmidos.

No dia da desova, os reprodutores são transferidos para a sala do larvário e colocados em bandejas, inseridas dentro de tanques cilíndricos de 450 L, contendo água do mar a uma temperatura elevada, com o objetivo de promover a estimulação térmica inicial (figura 33. A e B). Embora o método clássico do choque térmico envolva ciclos alternados de água quente e fria, neste protocolo utiliza-se apenas um único aumento de temperatura, mantendo os indivíduos continuamente na água com temperatura aquecida. Esta alteração súbita simula uma flutuação ambiental típica do início da época reprodutiva e desencadeia a libertação de gâmetas. De forma a acelerar o processo de estimulação dos reprodutores, são feitas escarificações de gónadas, através do sacrifício de alguns indivíduos (figura 33. D) e adição de microalgas. Durante o processo de desova, a libertação de gâmetas é monitorizada visualmente, com o auxílio de uma lanterna e, também são realizadas amostragens microscópicas ao longo da desova, de forma a haver controlo do número de espermatozoides em cada ovo, de modo a evitar a polispermia. Os machos são geralmente os primeiros a iniciar a libertação de esperma, caracterizada por um filamento contínuo de aspeto leitoso, enquanto as fêmeas libertam um fluido de aparência mais granular (figura 33. C). As bandejas com os reprodutores são transferidas para um tanque limpo quando a água fica com uma turbidez elevada, o que significa que existe uma quantidade elevada de espermatozoides e oócitos presentes no tanque. Após 4h de fertilização nos tanques, os ovos são recolhidos através da abertura das torneiras localizadas na base dos tanques (figura 33. E). Para este procedimento, são colocados dois crivos na saída da água, com malhas de tamanhos distintos organizadas por ordem decrescente. O primeiro crivo, com malha de maior dimensão (90  $\mu\text{m}$ ), tem como função reter partículas e resíduos de maiores dimensões que possam estar presentes na água, tais como fezes. O segundo crivo, com uma malha mais fina (25  $\mu\text{m}$ ), é utilizado para reter os ovos fertilizados. Após a recolha, os ovos são cuidadosamente transferidos para um copo de 5L contendo água do mar, de forma a permitir a sua quantificação e observação (figura 33. F).



Figura 33 - Indução da desova em indivíduos de amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus* . (A) Preparação dos tanques; (B) Acondicionamento das amêijoas; (C) libertação de gametas masculinos na água; (D) Estímulo à desova; (E) Drop do tanque e (F) Recolha dos ovos.

Para a quantificação dos ovos, através de análise microscópica e com recurso a um microscópio ótico e a uma câmara de contagem de *Sedgwick-Rafter*, é determinado o número de ovos por unidade de volume presentes em um tanque de 450L. Para este procedimento, são pipetadas três gotas de 20  $\mu\text{L}$  diretamente na câmara, sendo efetuadas três contagens para obtenção de uma média (figura 34. A e B). Após a quantificação da densidade dos ovos, estes são transferidos para tanques de maior capacidade (2000 L) (figura 34. C). A densidade pretendida no dia da desova (dia 0) é de aproximadamente 30 ovos/mL, que dá um total de 60 000 000 ovos p/2000 L. Antes da transferência das larvas para os novos tanques, estes são previamente preparados com água salgada cuja qualidade é rigorosamente controlada, incluindo o ajuste do pH com a adição de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e arejamento constante.

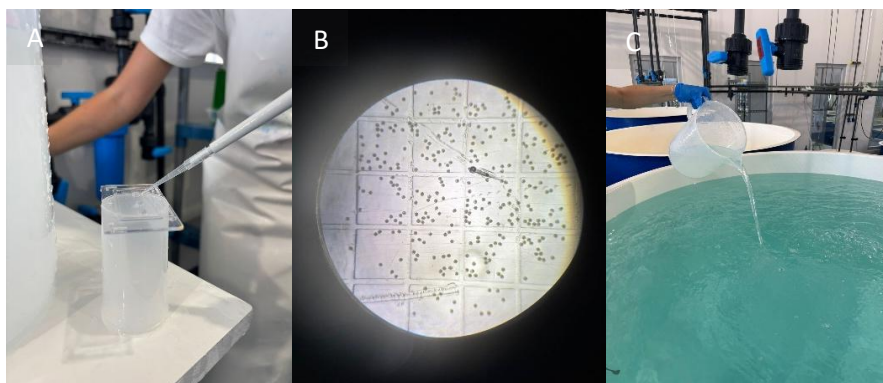


Figura 34 - Quantificação dos ovos de amêijoia-boia, *R. decussatus* . (A) e (B) Contagem na câmara de Sedgwick-Rafter e (C) Colocação dos ovos no novo tanque (2000 L).

Após a fertilização do ovócito, este inicia o processo de divisão celular (figura 35), formando aproximadamente 12 horas depois a larva trocófora, caracterizada pela presença de uma coroa de cílios que lhe permite nadar livremente na coluna de água. Nas primeiras 24 horas após a fertilização (dia 1), são realizadas observações ao microscópio para avaliar o sucesso da fecundação e o desenvolvimento larvário. Nesta fase, inicia-se o estágio planctônico da larva velígera, o momento em que surge o sistema digestivo e se inicia a alimentação exógena (tabela III). É fornecida uma dieta mista, composta por diferentes percentagens de duas espécies de microalgas flageladas (*Tisochrysis lutea* e *Dicrateria lutheri*) e duas espécies de microalgas diatomáceas (*Chaetoceros gracilis* e *Chaetoceros calcitrans*).

Tabela III - Estádios embrionários e larvares de *V. corrugata* (Fonte: Cerviño, 2011 - Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis corrugata* (Montagu, 1803)).

<b>Estádio</b>	<b>Tempo desde a fertilização</b>	<b>Tamanho (µm)</b>
<b>Ovo não fertilizado</b>	0 h	65 - 75
<b>Estado de 2 células</b>	1 h 30 min	80 - 90
<b>Estado de 4 células</b>	2 h	80 - 90
<b>Estado de 8 células</b>	2 h 30 min	80 - 90
<b>Estado de 16 células</b>	3 h 30 min	80 - 90
<b>Estado de 32-64 células</b>	4 h	80 - 90
<b>Blástula</b>	5 h 30 min	80 - 90
<b>Gástrula</b>	7 - 8 h	80 - 90
<b>Trocófora</b>	13 - 14 h	80 - 90
<b>Larva D</b>	30 - 32 h	100 - 105
<b>Larva Umbonada</b>	8 - 9 dias	140 - 150
<b>Larva Pedivelígera</b>	16 - 18 dias	220 - 240
<b>Pós larva</b>	21 - 22 dias	250 - 270

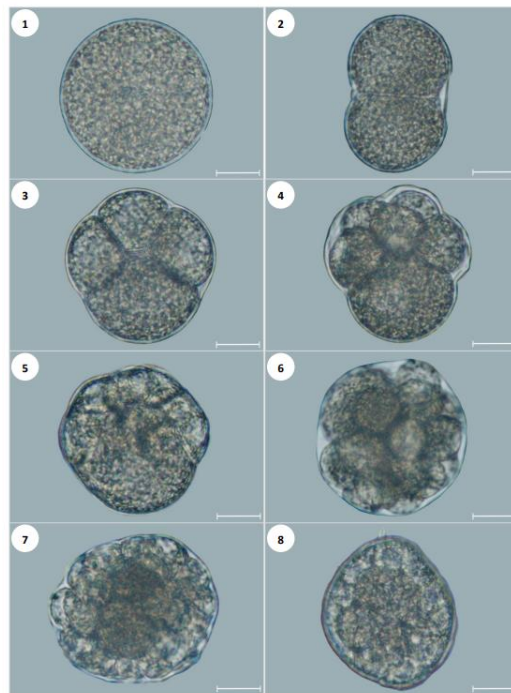


Figura 35 - Fotografias ao microscópio de luz do desenvolvimento embrionário de *V. corrugata* . 1: Oócito não fertilizado. 2: Estádio de 2 células. 3: Estádio de 4 células. 4: Estádio de 8 células. 5: Estádio de 16 células. 6: Estádio de 32 células. 7: Estádio de 64 células. 8: Blástula. Barra de escala: 20  $\mu$ m (Fonte: Cerviño, 2011 - Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis corrugata* (Montagu, 1803)).

Assegurar as condições ideais é essencial para o crescimento saudável e a viabilidade das larvas em desenvolvimento. Por esse motivo, a implementação das rotinas diárias numa sala de larvas, com foco na análise microbiológica, avaliação larvar e procedimentos de higiene, de forma a garantir a eficácia das operações e a minimização de riscos de contaminações, apresenta um papel importantíssimo no sucesso do desenvolvimento larvar e pós-larvar dos indivíduos numa maternidade. O início de cada dia é marcado por uma avaliação visual sistemática de todos os tanques. Esta inclui a verificação do funcionamento do sistema de arejamento, a confirmação do nível da água dos tanques e a observação da presença de quaisquer depósitos ou resíduos no fundo dos mesmos. Paralelamente, procede-se à análise geral das condições ambientais da sala, o que permite detetar precocemente anomalias no ambiente de cultivo. A qualidade da água constitui um dos parâmetros críticos a ser monitorizado diariamente. Assim, é realizada a medição do pH e da temperatura em todos os tanques. Estas medições asseguram a estabilidade físico-química do meio aquático, essencial para a saúde larvar. Nos dias em que ocorre a transferência de larvas (designados como *drop days*), procede-se à recolha de amostras para análise microbiológica. Utiliza-se uma pipeta Pasteur e recolhe-se 1 mL da água dos tanques para aplicar diretamente numa placa com meio TCBS, sendo o excesso descartado e a placa colocada na estufa para posterior incubação durante 72 horas. Realiza-se duas vezes ao dia a colheita de amostras para análise de residuais em todos os tanques de larvas. A leitura dos residuais é efetuada através da recolha de uma amostra de cada tanque com uma pipeta de Pasteur. A

amostra é homogeneizada e transferida para uma câmara de Neubauer, onde se realiza a contagem. Consoante o valor obtido, os dados são inseridos no Excel da dieta e, consoante as percentagens das diferentes espécies de microalgas, é possível determinar as quantidades de alimento (por mL) a fornecer a cada tanque. Estes valores são fornecidos através de um ficheiro de Excel criado pela empresa.

A observação larvar é uma etapa fundamental e deve ser conduzida diariamente em todos os tanques. Para tal, recolhe-se uma amostra de água por tanque e com o auxílio de uma câmara de *Sedgwick-Rafter*, colocam-se duas gotas bem separadas, sendo que a uma delas se adiciona uma gota de formol. A amostra não fixada permite a análise do comportamento e padrão de natação das larvas vivas, enquanto a amostra fixa viabiliza a avaliação das reservas lipídicas, outras medições morfométricas, tais como o comprimento médio, e a presença ou ausência de contaminações sob microscópio. A alimentação dos organismos é efetuada diariamente, desde o dia 1 após a fertilização. Após o *drop* dos tanques das larvas, procede-se à contagem e classificação das larvas, seguidas da sua transferência para tanques novos, de acordo com as densidades de cultivo previamente estabelecidas.

O protocolo de limpeza é outro pilar essencial nas rotinas diárias nos larvários, garantindo condições higiénicas adequadas e prevenindo contaminações que possam comprometer o cultivo. Durante o período da tarde, realiza-se a segunda ronda diária da contagem de residuais em todos os tanques. Esta contagem é realizada de modo a saber qual o número de células presentes nos tanques, mais concretamente, é para saber a quantidade de alimento que as larvas comem e quanto é que se deve fornecer aos tanques das larvas. Por fim, caso seja necessário, os tanques são preparados para o *drop* do dia seguinte, com água salgada e arejamento.

### 3.8. Sala do pós-larvário

A confirmação da metamorfose é feita através de observações diárias ao microscópio. O véu é reabsorvido, perdendo a sua função de absorção do alimento, e os filamentos branquiais começam a desenvolver-se. Após atingirem a metamorfose, aproximadamente 20 dias desde a fertilização, as larvas transformam-se em pós-larvas, com um tamanho aproximado de 250  $\mu\text{m}$ , sendo posteriormente transferidas para a sala do pós-larvário.

Esta sala está equipada com tanques cilíndricos de 450 L, semelhantes aos utilizados na fase larvar, mas com uma modificação específica: um sistema de *setting system*. No interior de cada tanque é colocado um tambor, com 50 cm de diâmetro, inicialmente com uma malha de 125  $\mu\text{m}$ , que depois vai sendo substituída durante o crescimento das pós-larvas. Este tambor funciona como suporte para a retenção das pós-larvas, facilitando a renovação da água. Cada tambor encontra-se equipado com um sistema de *air-lift*, construído com tubos de PVC, que promove a circulação da água no interior do tambor e assegura uma oxigenação adequada. Relativamente à sua alimentação, a dieta continua a ser feita com microalgas vivas, fornecidas em concentrações adaptadas ao crescimento das pós-larvas. As espécies de microalgas utilizadas são geralmente as mesmas da fase larvar, embora em quantidades progressivamente superiores. A qualidade da água é rigorosamente monitorizada, com controlo da temperatura, arejamento e pH, assegurando condições ideais para o desenvolvimento.

O cultivo é realizado em circuito fechado. Assim sendo, são realizadas trocas de água todos os dias. Os tanques são esvaziados e as pós-larvas são lavadas cuidadosamente com água salgada. De seguida, é retirada uma amostra de cada tanque para se realizar uma observação ao microscópio. Deste modo, é possível acompanhar o processo de crescimento das pós-larvas. É

realizada uma avaliação microscópica em 10 pós-larvas de cada tanque consoante uma escala de 0-4. Estes dados são anotados na folha de registo diário da sala do pós-larvário cultivado. A nível interno é avaliada a qualidade do estômago e a quantidade de lípidos. A nível externo é realizada uma medição do comprimento total da concha. Caso se verifique, também é registada a existência de mortalidade e/ou contaminação. A qualidade da pós-larva é influenciada pela cor do estômago e pela quantidade de lípidos. A presença de um estômago escuro e uma elevada quantidade de lípidos são indicadores visuais de um bom desenvolvimento fisiológico (figura 36).

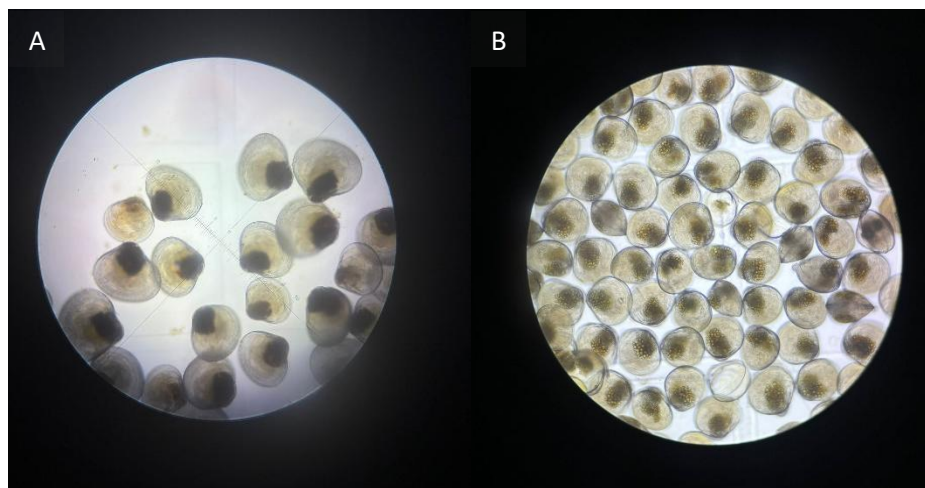


Figura 36 - Pós-larvas de amêijoia-macha (*V. corrugata*). (A) Medição do comprimento total da concha. Tamanho da concha: 310  $\mu\text{m}$ ; (B) Avaliação do estômago e dos lípidos.

Posteriormente, os tambores são colocados em novos tanques de 450 mL, preparados previamente com água salgada e pH ajustado com uma solução de carbonato de sódio. De seguida as pós-larvas são alimentadas com a dieta de microalgas vivas.

### 3.9. Sala da Semente

Após um período aproximado de duas semanas na sala do pós-larvário, as pós-larvas atingem um comprimento médio de 400 micras. A partir deste momento, as pós-larvas passam a ser designadas por sementes. Na sala da semente, os indivíduos permanecem em condições controladas de densidade e qualidade da água até atingirem o comprimento ideal para a sua saída da maternidade (1800 micras). As rotinas diárias na sala de semente incluem operações de higienização e manutenção que visam garantir a qualidade do ambiente de cultivo e o bem-estar dos animais. Estas atividades compreendem a: lavagem das sementes para remoção de resíduos orgânicos e partículas em suspensão aderidas aos indivíduos; a lavagem dos crivos e tanques para a prevenção do acúmulo de matéria orgânica e controlo do desenvolvimento de agentes patogénicos e a monitorização de parâmetros físico-químicos, como a avaliação da temperatura e pH.

As estruturas utilizadas nesta fase são iguais às aplicadas na fase do pós-larvário, nomeadamente os *setting systems* e os *air-lifts*, que permitem a manutenção de condições adequadas de circulação da água e retenção dos organismos (figura 37. A). Nesta sala, utilizam-se dois sistemas de cultivo para as sementes de amêijoas: o sistema de *downweller* e o sistema de *upweller* (Hadley & Whetstone, 2007). *Downwellers*, são cilindros abertos nas extremidades, normalmente construídos com tubo de plástico, suspensos num tanque. O fundo do cilindro é coberto com uma malha fina que sustenta as amêijoas. Antes de serem transferidas para os silos, as amêijoas devem ter um tamanho suficiente para se manterem numa malha de 150  $\mu\text{m}$ . Malhas mais finas entopem com facilidade, obstruindo o fluxo de água. A água (e o alimento) circula através dos silos por meio de sistemas de *air-lift*. Num *downweller*, o *air-lift* está posicionado fora do cilindro e move a água do reservatório para o interior do silo (figura 37. C). Os *downwellers* são usados geralmente, nas fases iniciais pós-fixação, quando as amêijoas ainda são pequenas e podem ser sugadas pelo *air-lift*. Quando as amêijoas atingem cerca de 0,5 mm de comprimento da concha, os silos podem ser convertidos em *upwellers*, movendo-se o *air-lift* para o interior do cilindro, de forma a puxar a água de baixo para cima através das amêijoas (figura 37. B) (Hadley & Whetstone, 2007). Os *upwellers* consistem numa estrutura cilíndrica construída em fibra de vidro, plástico ou PVC. Uma malha é firmemente fixada numa das extremidades do cilindro, servindo de superfície de suporte para a semente (Tarnecki *et al.*, 2023). Os silos são suspensos dentro de um tanque. O volume do tanque deve garantir pelo menos 0,5 ml de água por amêijoas. O alimento é adicionado ao tanque por doses ou através de fornecimento contínuo. Toda a água do reservatório deve ser renovada regularmente — idealmente todos os dias, mas pelo menos três vezes por semana (Hadley & Whetstone, 2007). Entre estes dois sistemas, o mais comum e utilizado em maternidades é o sistema de fluxo ascendente ou *upweller* (Gosling, 2008). Os sistemas de *upweller* são particularmente influenciados pelo fluxo de água, que regula a disponibilidade de alimento, o oxigénio e a qualidade da água, sendo que, em geral, o sistema de *upweller* apresenta uma capacidade de densidade de cultivo muito superior à de outros métodos (figura 38) (Campbell *et al.*, 2020).

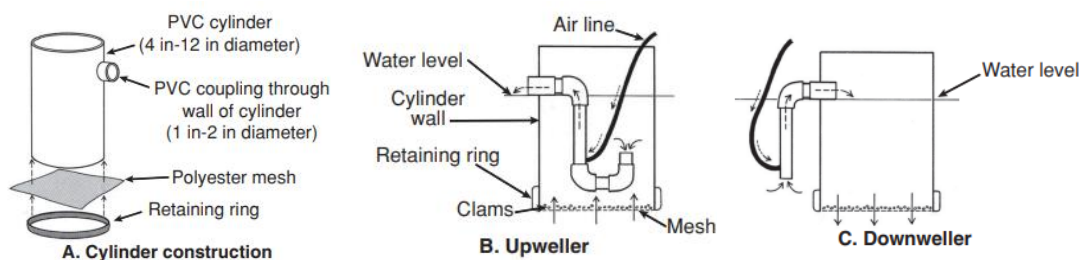


Figura 37 - Cilindros de cultivo pós-fixação em sistema de *downwelling* e *upwelling* (Fonte: Hadley & Whetstone, 2007 - Hard clam hatchery and nursery production).



Figura 38 - Sistema de *Upweller* na sala da semente.

Além das rotinas diárias, realiza-se periodicamente a crivagem das sementes. Este procedimento consiste na separação dos indivíduos por classes de tamanho, recorrendo a crivos de diferentes malhas, consoante o tamanho das sementes do lote em específico. A crivagem é um procedimento essencial para promover a homogeneidade do lote, evitando discrepâncias significativas de tamanho, reduzir a competição intraespecífica por recursos limitados, nomeadamente alimento e espaço, e remover organismos mortos ou debilitados que possam comprometer a qualidade da água e facilitar a proliferação de patógenos. Adicionalmente, este processo permite selecionar os indivíduos com melhor desempenho, que serão utilizados nas fases subsequentes do crescimento. A segregação por tamanho reveste-se de grande importância zotécnica, dado que populações com elevada variabilidade morfométrica tendem a apresentar competição assimétrica. Nestes contextos, os indivíduos de maiores dimensões beneficiam de maior eficiência na captura de alimento, apresentando taxas de crescimento superiores, enquanto que os de menor tamanho tendem a ser preteridos, acumulando défices nutricionais que culminam frequentemente na mortalidade. Os eventos de mortalidade, sobretudo quando não identificados precocemente, resultam na degradação da qualidade da água, com aumento de compostos azotados e matéria orgânica particulada. Estas alterações têm um impacto negativo no desempenho fisiológico dos indivíduos sobreviventes, comprometendo o crescimento, a robustez imunológica e a eficiência alimentar. Assim, a gestão rigorosa das rotinas de limpeza e a realização regular de crivagem constituem medidas indispensáveis ao sucesso do processo produtivo.

Após a crivagem, as sementes são colocadas em crivos pequenos e transportadas para o laboratório, onde se procede à contagem (figura 39). Para cada tamanho, pesa-se o crivo com as amêijoas e realizam-se cinco contagens, procurando ter cerca de 100 indivíduos por amostra. Com estas contagens obtém-se o número de indivíduos vivos e mortos em cada classe de tamanho. De seguida, calcula-se a média dos resultados e os valores são inseridos num ficheiro de Excel, que gera a taxa de mortalidade do lote. A tabela IV apresenta a quantidade a pesar em função do tamanho das amêijoas.

Tabela IV - Peso por amostra a contar consoante o tamanho das amêijoas.

<b>Tamanho (micras)</b>	<b>Peso por amostra a contar (g)</b>
<b>300</b>	0.005
<b>400</b>	0.008
<b>500</b>	0.015
<b>600</b>	0.03
<b>750</b>	0.077
<b>1000</b>	0.3
<b>1500</b>	0.75
<b>1800</b>	1.04
<b>2000</b>	1.5
<b>2400</b>	2.4
<b>3300</b>	5.0



Figura 39 - Pesagem e contagem da semente.

Quando a semente atinge o tamanho de 1.8 milímetros, é realizado o acondicionamento do lote pretendido em sacos de rede, numa caixa com isolamento térmico. Segue-se o transporte desde a maternidade até à unidade de pré-engorda, em Sines, e numa fase mais avançada, seguem para o viveiro em mar aberto localizado em Lagos, onde os organismos completam o seu ciclo de crescimento até atingirem o tamanho comercial de 32-40 mm (2-4 cm).

#### 4. Programas de melhoramento seletivo

No âmbito da otimização da produção aquícola, a Oceano Fresco implementa programas de melhoramento seletivo direcionados para a espécie *V. corrugata* (amêijoia-macha), com o objetivo de potenciar características genéticas desejáveis, nomeadamente o crescimento mais rápido, maior taxa de sobrevivência, resistência a doenças e melhor adaptação às condições de cultivo em maternidade e em viveiro. O ciclo de reprodução é induzido em ambiente laboratorial, com manipulação das variáveis ambientais como temperatura e fotoperíodo, de modo a sincronizar a desova e otimizar a fecundação. As desovas são monitorizadas e os cruzamentos são realizados de forma controlada, promovendo a variabilidade genética dentro das linhagens e evitando fenómenos de consanguinidade. Este esforço de melhoramento genético constitui uma estratégia a longo prazo, alinhada com os objetivos de sustentabilidade e competitividade

da produção de bivalves em ambiente aquícola, contribuindo também para a conservação da espécie e a reposição dos stocks naturais, quando aplicável.

O conhecimento dos recursos genéticos das espécies, ou seja, de todas as informações genéticas ou genômicas de um grupo de indivíduos representativos de uma espécie que constitui um recurso natural, tornou-se cada vez mais importante. Isto devido à descoberta da importância dos indicadores genéticos para a conservação das espécies, à obtenção de matéria-prima suficiente para gerar programas de melhoria bem-sucedidos, à sustentabilidade dos bancos naturais e à gestão adequada dos recursos genéticos. Os programas de melhoramento genético exigem gestão reprodutiva ao longo de todo o ciclo da espécie (Astorga, 2014). As maternidades de moluscos oferecem a oportunidade de gerir a reprodução, de modo a que características positivas possam ser introduzidas ou mantidas nos moluscos que estão a ser produzidos comercialmente. O foco desta criação pode estender-se à manutenção da diversidade genética, através de características que proporcionam uma vantagem comercial direta, como o crescimento, o rendimento e a capacidade de sobrevivência. Outras características que proporcionam a diferenciação do produto, como a forma e a cor da concha, também podem ser selecionadas (Duthie, 2010). O objetivo dos programas de melhoramento é melhorar uma ou mais características de importância comercial, como taxa de crescimento, rendimento, pigmentação da concha, tolerância à temperatura e resistência a doenças. Como a lucratividade é uma das principais medidas de sucesso dos programas de melhoramento, os programas existentes para moluscos frequentemente estabelecem metas de melhoramento com base em informações da indústria (Hollenbeck & Johnston, 2018).

Foi descrito por Newkirk (1980) que existia um potencial considerável de melhoramento genético das unidades populacionais aquícolas. No entanto, não havia evolução ao nível de melhoramento genético nas populações de moluscos, apesar de existir um controlo o ciclo de vida de todas as espécies comercialmente importantes. Newkirk (1980) também referiu a existência de vários estudos que fornecem uma indicação do potencial de reprodução seletiva, tanto através de estudos de hereditariedade como de seleções experimentais. Estes estudos indicam que existe o potencial esperado e que o que é necessário a seguir é um grande empenho no desenvolvimento de linhas selecionadas. Décadas de estudos genéticos que envolvem os moluscos bivalves revelaram uma série de características que os diferenciam de outras espécies de aquacultura. Em particular, os moluscos demonstraram exibir níveis extremamente altos de diversidade genética, desvios das proporções em populações selvagens, marcadores em cruzamentos em pares, alta incidência de alelos nulos em marcadores genéticos e correlações entre características de aptidão e níveis de heterozigidade. O encerramento do ciclo de vida das espécies em centros de incubação pode garantir a independência em relação às populações selvagens e permite o melhoramento genético a longo prazo dos reprodutores através da reprodução seletiva. As técnicas genômicas têm o potencial de revolucionar os programas de melhoramento, melhorando a compreensão das características da genética dos moluscos que podem constituir um desafio para a aquacultura intensiva e fornecendo um novo conjunto de ferramentas para o melhoramento genético. O futuro da aquacultura industrializada de moluscos passa, sem dúvida, pelo fecho do ciclo de vida de mais espécies e pelo desenvolvimento de maternidades que possam fornecer uma produção suficiente de sementes para cultivo no mar, permitindo ao mesmo tempo a reprodução seletiva para melhorar

características comercialmente importantes, como o crescimento, o rendimento da carne, a resistência às doenças e a tolerância ao stress (Hollenbeck & Johnston, 2018).

Os programas de melhoramento bem-sucedidos foram estabelecidos para bivalves em todo o mundo, incluindo abordagens baseadas em seleção em massa e seleção familiar. Na seleção em massa, os indivíduos são geralmente escolhidos com base no seu desempenho em comparação com a média da população para uma determinada característica (por exemplo, o crescimento), sem considerar totalmente a estrutura familiar. Esta estratégia pode ser eficaz, mas apresenta o risco de depressão endogâmica e é adequada apenas quando o foco está em uma ou duas características. Por outro lado, a seleção familiar baseia-se em informação genealógica, sendo escolhidos para reprodução os indivíduos provenientes das famílias com melhor desempenho. Esta abordagem permite uma manutenção mais eficaz da diversidade genética (Nascimento-Schulze *et al.*, 2021). O uso correto dos recursos genéticos permite que a espécie seja desenvolvida de forma sustentável, mantendo-a para as gerações futuras; essas informações também são a base para novos programas de melhoramento genético em espécies em estágios iniciais ou avançados da aquacultura. Níveis adequados de variabilidade devem então ser mantidos ao longo do tempo, monitorando a variabilidade genética para evitar o excesso de consanguinidade. Esses fatores — que exigem a aplicação de biotecnologias ou a elaboração de planos de melhoramento genético — foram identificados como importantes para iniciar a produção aquícola (Astorga, 2014). A falta de controlo da qualidade dos gâmetas durante a desova artificial pode resultar numa grande variabilidade na taxa de desenvolvimento dentro de um mesmo lote (Nascimento-Schulze *et al.*, 2021). Se for desejado realizar uma reprodução controlada, as amêijoas são induzidas a desovar em copos individuais, permitindo assim o controlo da fertilização. Se o objetivo for apenas produzir larvas e a parentalidade não for importante, é mais fácil realizar uma desova em massa, colocando as amêijoas num recipiente comum. O esperma libertado pelos machos na desova irá estimular outras amêijoas a desovar também, e os ovócitos serão fertilizados nesse mesmo recipiente comum (Hadley & Whetstone, 2007).

Devido à sua praticidade, a desova em massa é um procedimento comum na fertilização artificial. No entanto, esta abordagem não controla a contribuição parental e pode resultar numa redução do número efetivo de progenitores envolvidos no programa. Além disso, como os indivíduos com melhor desempenho podem ser excluídos dos cruzamentos, a desova em massa pode limitar a precisão do programa de melhoramento. Apesar disso, os bivalves apresentam níveis elevados de fecundidade e a fertilização ocorre normalmente com sucesso, sendo geralmente obtido um número suficiente de descendentes (Nascimento-Schulze *et al.*, 2021).

Na maternidade, o programa de melhoramento teve início com a escolha de reprodutores de amêijoa-macha (*V. corrugata*). Realizou-se o sacrifício de pelo menos 10 indivíduos de cada lote escolhido e observou-se uma amostra da gónada de cada indivíduo ao microscópio ótico, tal como descrito anteriormente na secção da desova. Após esta seleção, os reprodutores foram mantidos em caixas, separadamente dos restantes da produção. 24 horas antes da indução à desova, todos os indivíduos foram submetidos a um jejum. A desova foi realizada por meio de mudanças bruscas de temperatura de água (choque térmico) em intervalos de 1 a 2 horas, e, para além deste método, foram adicionados outros estímulos, tais como, fitoplâncton e esperma de algum macho sacrificado (figura 40. C e D). A desova foi realizada em caixas retangulares com

uma abertura (figura 40. A), de modo a facilitar a troca de água (figura 40. B). Durante o choque térmico, observou-se o comportamento das amêijoas, com o auxílio de uma lanterna. Quando as amêijoas começaram a desovar, foram separadas das restantes em recipientes individualizados para a realização da fertilização controlada (figura 40. E). Através da figura 41, é possível visualizar a diferença entre o filamento contínuo de aspeto leitoso produzido pelos machos e, no caso das fêmeas, a emissão um fluido de aparência mais granular. Após a fertilização controlada, realizou-se a contagem do número de ovos fertilizados (figura 40. F e G), com a auxílio de uma câmara de *Sedgwick-Rafter*, e os mesmos foram colocados em tanques com um volume de 100 L (figura 40. H), preparados previamente com água salgada, arejamento constante e pH ajustado com bicarbonato de sódio. Cada tanque foi identificado com o número pertencente a cada macho e fêmea, com o número da família e com a quantidade de ovos, de modo a manter a rastreabilidade de cada família.



Figura 40 - Procedimentos para a obtenção da desova. (A) e (B) indução de choque térmico; (C) e (D) adição de estímulos de fitoplâncton e esperma de machos sacrificados; (E) separação de machos e fêmeas em goblets; (F) e (G) contagem do número de ovos obtidos na câmara de Sedgwick-Rafter e (H) colocação dos ovos no tanque.

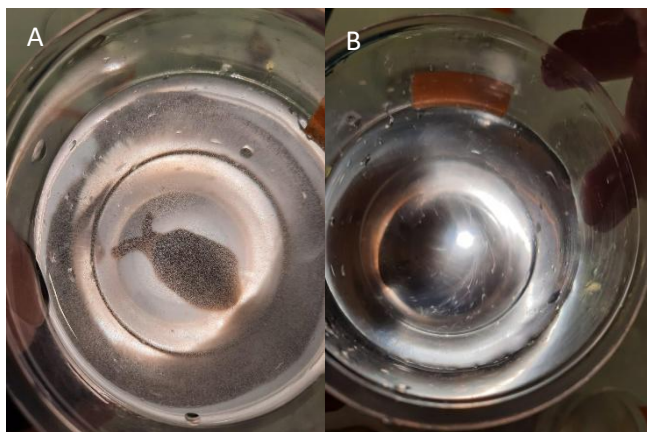


Figura 41 - Exemplos de *V. corrugata* durante a indução da desova. (A) fêmea a emitir oócitos e (B) macho a emitir esperma.

## 5. Otimização da produtividade do cultivo de sementes de amêijoia no sistema *Upweller*

O presente projeto foi concebido e desenvolvido no âmbito do estágio curricular realizado na Oceano Fresco, tendo a sua execução resultado de uma solicitação expressa por parte da entidade de acolhimento. A definição do tema e dos objetivos decorreu das necessidades identificadas pela empresa, assegurando a relevância prática do estudo e, simultaneamente, permitindo a articulação entre a aplicação profissional e a consolidação da formação académica.

### Resumo

A densidade de povoamento é um dos principais fatores que influenciam o crescimento de sementes de bivalves em maternidades. Este estudo avaliou o impacto de diferentes densidades iniciais de cultivo no desempenho da amêijoia-macha (*Venerupis corrugata*) em sistema *upweller*, utilizando sementes com tamanho inicial de aproximadamente 1,5 mm. Foram conduzidos quatro ensaios de 15 dias, testando densidades entre 75 g e 650 g por crivo. Os resultados mostraram que densidades baixas (75–185 g) promoveram maiores ganhos percentuais de biomassa (até  $148 \pm 30$  %), embora com produção absoluta limitada. Densidades elevadas ( $\geq 500$  g) resultaram em crescimento e sobrevivência reduzidos, evidenciando os efeitos negativos do sobrepopoamento. A densidade de 280 g destacou-se como a mais eficiente, apresentando simultaneamente a maior produção absoluta ( $305 \pm 71$  g) e um ganho relativo ( $109 \pm 25$  %). Estes resultados sugerem que densidades intermédias representam a estratégia mais adequada para otimizar a produção de sementes em maternidade, conciliando produtividade, uniformidade e eficiência no uso de recursos.

**Palavras-chave:** *Venerupis corrugata*, aquacultura, juvenis de bivalves, densidade de cultivo, *upweller*.

### Abstract

Stocking density is a key factor influencing the growth of bivalve seeds in hatcheries. This study evaluated the effect of different initial stocking densities on the performance of the carpet shell clam (*Venerupis corrugata*) in an *upweller* system. Four 15-day trials were carried out, testing densities ranging from 75 g to 650 g per sieve. Results showed that low densities (75–185 g)

promoted higher relative biomass gains (up to  $148 \pm 30 \%$ ), although with limited absolute production. High densities ( $\geq 500$  g) led to reduced growth and survival, highlighting the negative effects of overcrowding. The 280 g density was identified as the most efficient, combining the highest absolute production ( $305 \pm 71$  g) with a relative gain ( $109 \pm 25 \%$ ). These findings suggest that intermediate densities represent the most suitable strategy to optimize seed production in hatcheries, balancing productivity, uniformity, and resource efficiency.

**Keywords:** *Venerupis corrugata*, aquaculture, bivalve juveniles, stocking density, *upweller*.

### 5.1. Introdução

A produção sustentável de sementes de bivalves, como é o caso da amêijoia-macha (*V. corrugata*), assume uma importância económica e ecológica significativa em várias regiões costeiras. A implementação de sistemas de cultivo eficientes é essencial para garantir o fornecimento contínuo de juvenis para as fases subsequentes de engorda, assegurando simultaneamente taxas de crescimento elevadas e uma produção de qualidade. As maternidades comerciais fornecem, geralmente, sementes de bivalves com tamanhos consideravelmente reduzidos (entre 1,5 a 5 mm), sendo necessário um sistema intermédio para o crescimento destas sementes até atingirem um tamanho adequado para a sua transferência para sistema de cultivo de maior escala. As condições de cultivo controladas proporcionadas pelas maternidades favorecem uma maior taxa de sobrevivência e um crescimento mais rápido das sementes. Tradicionalmente, as maternidades de bivalves utilizavam canais longos com fluxo lento de água do mar sobre os juvenis, aumentando gradualmente esse fluxo à medida que os organismos cresciam. Este método foi progressivamente substituído pelas tecnologias *upweller* e *downweller*. Nos sistemas *upweller*, a água atravessa a massa de sementes de amêijoia, podendo ser movimentada de forma passiva (utilizando ar) ou ativa (por fluxo forçado). Já nos sistemas *downweller*, a água é movimentada por gravidade através das unidades de cultivo que contêm os juvenis (Pfeiffer & Rusch, 2001). Os sistemas *upweller* são amplamente utilizados na produção de sementes de bivalves, dada a sua eficiência em promover o crescimento através de um fluxo contínuo de água rica em nutrientes. Este tipo de sistema consiste em tanques nos quais as sementes são mantidas em compartimentos perfurados ou redes, permitindo a passagem constante de água de baixo para cima, assegurando uma renovação contínua da água e uma distribuição uniforme das partículas alimentares disponíveis (Acquafredda *et al.*, 2022). Este fluxo também favorece a remoção eficiente de resíduos metabólicos e a manutenção de condições ambientais adequadas para o crescimento saudável das sementes. Segundo Bacher & Baud (1992), os principais fatores a considerar para um crescimento otimizado de bivalves num sistema *upweller* incluem a temperatura, a disponibilidade de alimento, a densidade de cultivo e o fluxo de água. A densidade é um fator crítico, pois densidades elevadas podem gerar competição por recursos e espaço, levando a crescimentos desiguais e a um maior risco de doenças. Por outro lado, densidades demasiado baixas podem comprometer a viabilidade económica da produção. Assim, é essencial encontrar um equilíbrio entre o desempenho biológico e a eficiência produtiva.

Este estudo foi realizado no decorrer do estágio com a empresa Oceano Fresco, com o objetivo de obter dados relevantes para a otimização da produção de sementes na maternidade. Entre os parâmetros de cultivo, a densidade destaca-se como um dos fatores que mais influenciam o crescimento e a mortalidade dos indivíduos, uma vez que a taxa de crescimento tende a diminuir com o aumento da densidade. Por isso, é fundamental determinar a densidade

ideal, ou seja, o peso de indivíduos por cm<sup>2</sup>, a ser alocado em cada crivo. Assim, será possível alcançar uma população mais homogênea, com menor taxa de mortalidade e maior eficiência no consumo de recursos, reduzindo também o tempo necessário para o cultivo de sementes. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes densidades de cultivo no crescimento de sementes de amêijoas-macha num sistema *upweller*, com base no crescimento, ganho de biomassa e eficiência na utilização de recursos num contexto de produção em maternidade.

## 5.2. Metodologia

### 5.2.1. Sistema de cultivo e montagem experimental

O presente estudo avaliou o impacto de diferentes densidades iniciais sobre o crescimento ao longo de um período experimental de 15 dias. Os ensaios foram conduzidos num sistema *upweller* constituído por duas caixas plásticas retangulares, cada uma equipada com quatro crivos circulares em PVC, totalizando oito unidades experimentais por ensaio. Estes crivos foram dispostos sobre uma estrutura metálica elevada, permitindo a circulação ascendente de água do mar previamente filtrada, assegurando a distribuição uniforme do fluxo e a adequada oxigenação dos juvenis.

Cada crivo apresentava uma área útil de 452 cm<sup>2</sup> e uma malha com abertura de 600 µm, apropriada para o cultivo de sementes com tamanho inicial médio de 1500 µm (1,5 mm). A configuração do sistema encontra-se ilustrada na figura 42.



Figura 42 -Montagem do sistema experimental com dois *upwellers* e oito crivos circulares.

O sistema operava com circulação contínua de água do mar previamente filtrada, assegurando a renovação permanente do meio e a estabilidade dos parâmetros físico-químicos ao longo dos ensaios. O sistema encontrava-se ligado ao circuito de produção da sala da semente, assegurando o fornecimento contínuo de água do mar e mantendo as condições reais de cultivo utilizadas em ambiente produtivo.

### 5.2.2. Desenho experimental

O estudo seguiu um desenho experimental com quatro ensaios consecutivos, cada um com a duração de 15 dias (figura 43). Em cada ensaio foram testadas quatro densidades iniciais diferentes de sementes (em gramas por crivo), conforme apresentado na tabela V. Cada densidade foi testada em duplicado (dois crivos por densidade), perfazendo um total de oito unidades experimentais por ensaio e 32 unidades no total. Na tabela VI apresentam-se os

parâmetros experimentais referentes ao Ensaio 1. Os restantes ensaios seguiram a mesma estrutura experimental, variando apenas nas datas, no lote e na densidade.

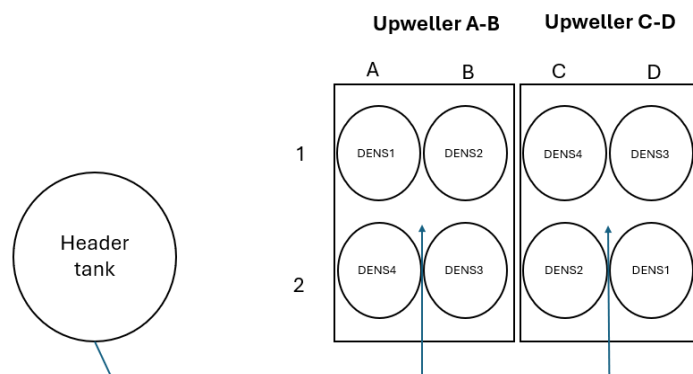


Figura 43 - Representação esquemática do desenho experimental adotado no estudo. (A-D) Sistema de *Upweller*, composto por duas caixas principais. *Header tank* (Tanque central) conectado às duas caixas. Setas azuis correspondem à circulação do mix (água mais o alimento).

Tabela V - Densidades iniciais (g/crivo) utilizadas nos quatro ensaios experimentais.

Ensaio	Densidade 1 (g/crivo)	Densidade 2 (g/crivo)	Densidade 3 (g/crivo)	Densidade 4 (g/crivo)
1	75	185	280	500
2	650	185	280	500
3	215	280	-	-
4	280	300	350	400

Tabela VI - Resumo dos parâmetros experimentais (Ensaio 1) utilizados para caracterizar as condições de cultivo em sistema de *upweller*.

<b>Número do ensaio</b>	<b>1</b>
<b>Data de início</b>	12/11/2024
<b>Data de fim</b>	26/11/2024
<b>Fluxo por tanque (L/h)</b>	640
<b>Fluxo por crivos (L/h)</b>	160
<b>Fluxo por crivos (LPM)</b>	2,67
<b>Fluxo por crivos (mL/10s)</b>	444
<b>Alimentação</b>	Igual à produção
<b>Tamanho inicial</b>	> 1500
<b>Lote</b>	VC2407
<b>Data da desova</b>	13/08/2024

Densidade de cultivo 1 (g/ crivo pequeno)	75
Densidade de cultivo 2 (g/ crivo pequeno)	185
Densidade de cultivo 3 (g/ crivo pequeno)	280
Densidade de cultivo 4 (g/ crivo pequeno)	500
Área do crivo (cm <sup>2</sup> )	452
Tamanho da malha do crivo (micras)	600
Biomassa total necessária (g)	2080

As densidades foram ajustadas entre ensaios com base nos resultados previamente obtidos, com o objetivo de alcançar a gama ideal para o crescimento das sementes em ambiente controlado, mas também de maximizar a produção de sementes por unidade. Antes do início de cada ensaio, as sementes foram submetidas a um processo de crivagem, de modo a garantir a homogeneização do tamanho e a distribuição equitativa por densidade (figura 44).



Figura 44 - Crivagem do lote de sementes usado nos ensaios.

No final de cada ensaio foi considerada a possibilidade de avaliação da sobrevivência das sementes, através da contagem de indivíduos vivos e mortos (figura 45). Esta análise foi realizada apenas nos dois últimos ensaios, uma vez que inicialmente o foco incidiu exclusivamente nos parâmetros de biomassa. Assim, os dados de sobrevivência apresentados referem-se unicamente ao Ensaio 3 e ao Ensaio 4.

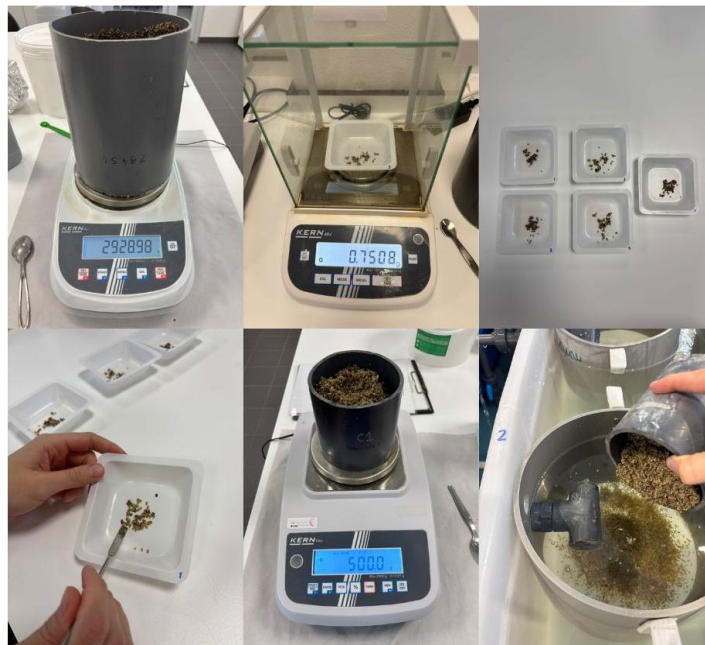


Figura 45 - Pesagem do lote e contagem do número de sementes vivas e mortas.

Durante a realização dos ensaios, foram monitorizados diariamente os seguintes parâmetros ambientais, de forma a garantir a estabilidade das condições de cultivo:

- Temperatura da água (°C) e pH, avaliados com uma sonda portátil (*GroLine*, HI98118, *Hanna Instruments*) previamente calibrada;
- Clorofila total ( $\mu\text{g/L}$ ), estimada por um Fluorímetro (*AquaFlash*, *Handheld Active Fluorometer*, *Turner Designs*);
- Contagem de microalgas residuais (células/mL), realizada por contagem direta em câmara de Neubauer.

Todos os dados foram registados em ficheiro de Excel, permitindo o controlo diário e a deteção de eventuais variações ambientais que pudessem influenciar os resultados.

### 5.2.3. Recolha e análise dos dados

No final de cada ensaio, as sementes foram recolhidas cuidadosamente, lavadas com água do mar e ligeiramente secas com papel absorvente para remover o excesso de humidade.

A biomassa final (g/crivo) foi determinada com recurso a uma balança de precisão.

Com base nestes dados, foram feitos os seguintes cálculos:

- Crescimento médio diário (g/dia), e

- Crescimento relativo (%).

Estes indicadores permitiram comparar o desempenho entre as diferentes densidades testadas e avaliar a eficiência do sistema de cultivo.

Para avaliar a relação entre a concentração de clorofila total ( $\mu\text{g/L}$ ) e os residuais de microalgas ( $\text{cel/mL}$ ), foi realizada uma análise de regressão linear simples. Determinou-se a equação da reta de ajuste e o respetivo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), de forma a quantificar a proporção da variabilidade da clorofila total explicada pela concentração residual de células de microalgas.

Adicionalmente, nos dois últimos ensaios foi realizada a avaliação da sobrevivência, recorrendo à contagem dos indivíduos vivos e mortos após o término do período experimental. Este parâmetro permitiu complementar a análise do crescimento, fornecendo informação adicional sobre o impacto das densidades iniciais na viabilidade das sementes.

### 5.3. Resultados

A produção de biomassa apresentou variações em função da biomassa inicial de povoamento (figura 46). Na tabela VII está apresentada média e o desvio-padrão referente à produção de biomassa por mês nas diferentes densidades iniciais de cultivo. As densidades mais baixas resultaram em produções absolutas relativamente reduzidas, com médias de  $107 \pm 23$  g para 75 g iniciais e  $166 \pm 74$  g para 185 g iniciais. Em densidades intermédias, os valores de produção aumentaram, com destaque para as biomassas iniciais de 215 g ( $142 \pm 14$  g) e 280 g ( $305 \pm 71$  g), esta última representando o valor máximo registado. Para densidades mais elevadas, a produção de biomassa tendeu a diminuir, com médias de  $198 \pm 44$  g (300 g),  $239 \pm 31$  g (350 g),  $262 \pm 14$  g (400 g) e  $241 \pm 50$  g (500 g). A densidade mais elevada, de 650 g, apresentou a menor produção absoluta ( $85 \pm 48$  g), refletindo uma quebra acentuada em relação às restantes condições testadas.

O ganho percentual de biomassa revelou uma tendência inversa à produção absoluta, diminuindo progressivamente com o aumento da biomassa inicial (figura 47).

Na tabela VIII está apresentada média e o desvio-padrão referentes ao ganho de biomassa por mês nas diferentes densidades iniciais de cultivo. O valor mais elevado foi obtido para a densidade de 75 g, com um ganho médio de  $143 \pm 30$  %, seguido pela densidade de 280 g, com  $109 \pm 25$  %. Densidades intermédias (185–350 g) apresentaram ganhos percentuais entre 52–75%, enquanto as densidades mais elevadas resultaram em ganhos reduzidos, nomeadamente 36–48% para 500 g e apenas  $13 \pm 7$  % para 650 g.

De forma geral, as biomassas iniciais mais baixas (75–185 g) e intermédias (215–300 g) promoveram os maiores ganhos relativos, ainda que as produções absolutas mais elevadas tenham sido registadas nas densidades de 280–400 g. Em contraste, densidades mais elevadas ( $\geq 500$  g) resultaram simultaneamente em produções absolutas mais baixas e em ganhos percentuais reduzidos, sugerindo que o aumento da densidade inicial exerceu um efeito limitante na acumulação de biomassa.

Tabela VII - Média e desvio-padrão da Produção de biomassa por mês em diferentes densidades iniciais de cultivo.

<b>Média – Produção de biomassa por mês</b>									
<b>Biomassa inicial de cultivo (g)</b>									
<b>Ensaio</b>	<b>75 g</b>	<b>185 g</b>	<b>215 g</b>	<b>280 g</b>	<b>300 g</b>	<b>350 g</b>	<b>400 g</b>	<b>500 g</b>	<b>650 g</b>
<b>1 (A-D)</b>	107 g	166 g		209 g				241 g	
<b>2 (A-D)</b>		97 g		133 g				177 g	85 g
<b>3 (A-D)</b>			142 g	186 g					
<b>4 (A-D)</b>				305 g	198 g	239 g	262 g		

<b>DP – Biomassa de produção por mês</b>									
<b>Biomassa inicial de cultivo (g)</b>									
<b>Ensaio</b>	<b>75 g</b>	<b>185 g</b>	<b>215 g</b>	<b>280 g</b>	<b>300 g</b>	<b>350 g</b>	<b>400 g</b>	<b>500 g</b>	<b>650 g</b>
<b>1 (A-D)</b>	23 g	74 g		12 g				50 g	
<b>2 (A-D)</b>		13 g		22 g				11 g	48 g
<b>3 (A-D)</b>			14 g	62 g					
<b>4 (A-D)</b>				71 g	44 g	31 g	14 g		

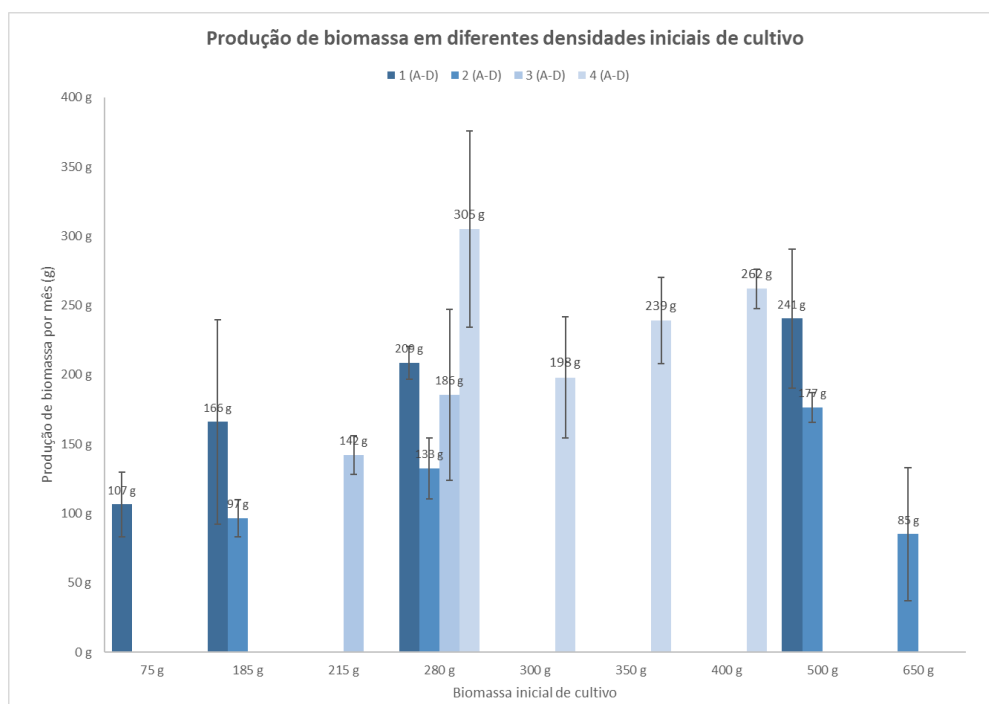


Figura 46 - Produção mensal de biomassa (em gramas) sob diferentes densidades iniciais de cultivo. Os diferentes tons de azul representam os ensaios realizados.

Tabela VIII - Média e desvio-padrão do ganho de biomassa por mês em diferentes densidades iniciais de cultivo.

Média - Ganho de biomassa por mês (%)									
Ensaio	75 g	185 g	215 g	280 g	300 g	350 g	400 g	500 g	650 g
1 (A-D)	143 %	90 %		75 %				48 %	
2 (A-D)		52 %		48 %				36 %	13 %
3 (A-D)			67 %	67 %					
4 (A-D)				109 %	66 %	69 %	66 %		
DP - Ganho de biomassa por mês (%)									
Ensaio	75 g	185 g	215 g	280 g	300 g	350 g	400 g	500 g	650 g
1 (A-D)	30 %	40 %		5 %				10 %	
2 (A-D)		7 %		8 %				2 %	7 %
3 (A-D)			6 %	22 %					
4 (A-D)				25 %	14 %	9 %	4 %		

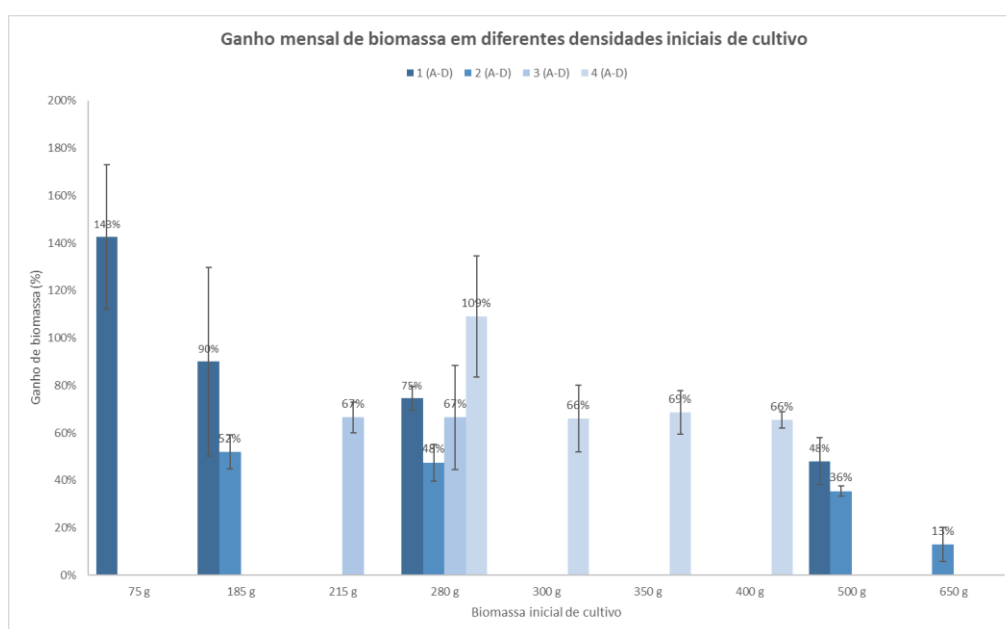


Figura 47 - Percentagem de ganho mensal de biomassa sob diferentes densidades iniciais de cultivo. As barras indicam a eficiência relativa da produção em função da biomassa.

A relação entre a concentração de clorofila total ( $\mu\text{g/L}$ ) e os residuais de microalgas ( $\text{cel/mL}$ ) revelou uma associação positiva forte (figura 48). O ajuste linear apresentou um coeficiente de determinação elevado ( $R^2 = 0,9672$ ), indicando que aproximadamente 97% da variação da clorofila total pode ser explicada pela variação na concentração residual de células de microalgas. A equação da reta obtida foi  $y = 1,7537x$ , evidenciando que, para cada unidade de aumento em residuais ( $\text{cel/mL}$ ), há um acréscimo proporcional de cerca de  $1,75 \mu\text{g/L}$  na concentração de clorofila total.

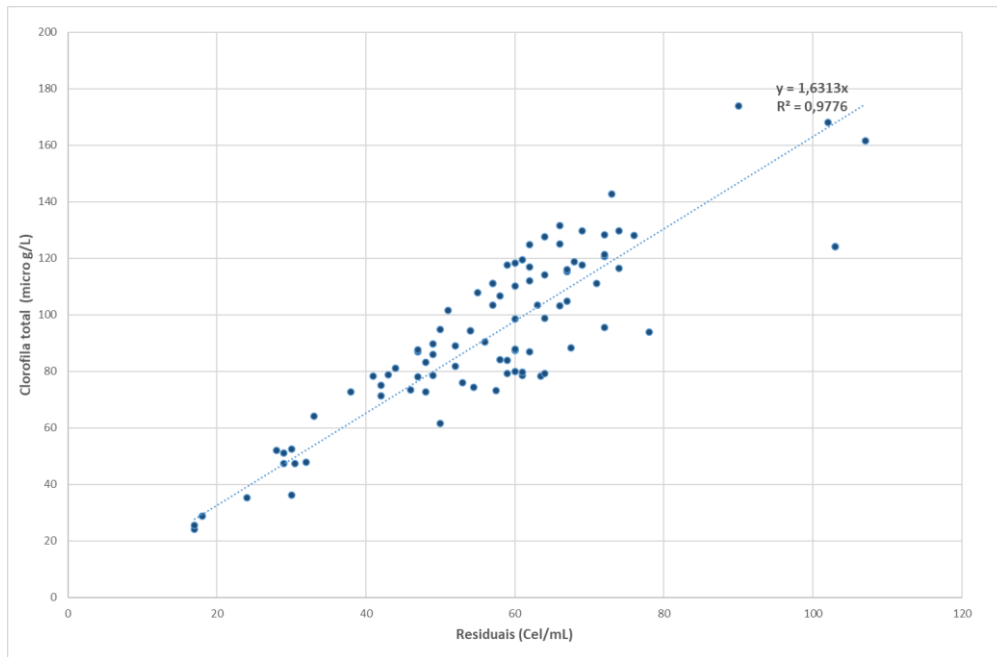


Figura 48 - Correlação entre os residuais (cel/ mL) e a concentração de clorofila total ( $\mu\text{g/L}$ ).

#### 5.4. Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que a biomassa inicial condicionou a produção e o ganho percentual de biomassa. Verificou-se que densidades baixas e intermédias proporcionaram maiores ganhos relativos, ao passo que densidades mais elevadas não produziram reduções, mas sim aumentos mais modestos, quer em termos absolutos quer percentuais. Em particular, a densidade de 75 g apresentou o maior ganho percentual ( $148 \pm 30\%$ ), enquanto a densidade de 280 g registou a maior produção absoluta ( $305 \pm 71\text{ g}$ ). Por outro lado, a densidade mais elevada (650 g) conduziu simultaneamente à menor produção e ao menor ganho percentual, evidenciando o efeito negativo do sobrepovoamento.

Tendências semelhantes foram observadas em estudos anteriores com bivalves, onde densidades reduzidas favoreceram o crescimento individual e a taxa de sobrevivência, ao passo que densidades excessivas comprometeram o desempenho produtivo (Liu *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2019; Zorita *et al.*, 2021). Trabalhos realizados com outras espécies, como *Crassostrea gigas*, *Chlamys nobilis* e *Mytilus galloprovincialis*, reforçam esta tendência, associando densidades elevadas a crescimento reduzido, maior mortalidade e maior vulnerabilidade fisiológica (Beadman *et al.*, 2004; Ren & Ross, 2005; Marshall *et al.*, 2014). Também um estudo efetuado por Joaquim *et al.*, (2016), refere que as condições de densidade podem prejudicar o desenvolvimento de indivíduos de *V. corrugata* em fase larvar, sendo que a eficiência da utilização dos alimentos pode diminuir devido ao stress criado pelo cultivo em alta densidade. Tal situação poderá estar associada não apenas à menor disponibilidade de alimento, mas também à restrição do espaço de confinamento, a qual compromete a circulação e conduz à degradação da qualidade da água (Oliveira *et al.*, 2019).

Os efeitos negativos de densidades elevadas podem estar associados a diferentes fatores. Em primeiro lugar, a maior biomassa inicial aumenta a competição intraespecífica pela disponibilidade de microalgas, reduzindo a ingestão individual e, conseqüentemente, o crescimento. Em segundo lugar, a limitação de espaço físico pode comprometer a circulação da

água nos crivos e a eficiência de filtração. Adicionalmente, o aumento do contacto entre indivíduos e as condições de sobrepovoamento podem induzir stress fisiológico, aumentando os custos energéticos de manutenção e reduzindo a energia canalizada para o crescimento (Newell, 2004; Liu *et al.*, 2019).

Do ponto de vista da produção aquícola, os resultados sugerem a existência de um compromisso entre a maximização da produção absoluta e a otimização do ganho percentual. Densidades muito baixas, embora proporcionem elevados ganhos relativos, representam uma perda para a empresa, pois implicam menor produção total, maior consumo de microalgas e maior tempo de trabalho. Por outro lado, densidades demasiado elevadas penalizam ambos os parâmetros. Assim, densidades intermédias, em particular a de 280 g, revelaram-se mais vantajosas, permitindo alcançar uma elevada produção absoluta sem comprometer de forma acentuada o ganho percentual.

De acordo com Oliveira *et al.*, (2019), a alimentação é um fator limitante do crescimento de moluscos bivalves cultivados em altas densidades. Para estudar o efeito da densidade populacional numa espécie-alvo, deve-se garantir que a alimentação não exceda uma concentração máxima e mínima desejável. Deste modo, um outro aspeto a ter em conta na realização deste estudo é a alimentação fornecida ao longo do ensaio. Este sistema utilizava um mix de microalgas produzido na maternidade, fornecido através do regime de alimentação estabelecido para a produção. No entanto, não foi possível determinar a densidade celular fornecida em cada alimentação, o que limita a avaliação precisa da quantidade de alimento efetivamente disponível para as sementes de *V. corrugata* em cada densidade. Esta falta de quantificação pode ter introduzido variabilidade adicional, dificultando a distinção entre os efeitos da densidade inicial e os da disponibilidade alimentar. Seria, por isso, interessante desenvolver no futuro um sistema que permitisse monitorizar de forma contínua os residuais de microalgas na água de saída, de modo a avaliar melhor a fração de alimento efetivamente ingerida, sobretudo em condições de densidade muito elevada.

Do ponto de vista científico, a ausência de um controlo rigoroso da densidade celular representa uma limitação metodológica, uma vez que diversos autores demonstraram que a concentração de microalgas fornecida influencia diretamente as taxas de crescimento e de sobrevivência dos bivalves (Walne, 1970; Helm *et al.*, 2004; Rico-Villa *et al.*, 2006). Contudo, em contexto produtivo, a utilização de misturas de microalgas produzidas localmente representa uma prática benéfica e eficiente, não só pela redução de custos, como também pela flexibilidade e adequação às necessidades globais do sistema de produção (Brown *et al.*, 1997). Assim, ainda que a alimentação utilizada limite a precisão científica do ensaio, ela reflete as práticas reais da maternidade e garante a aplicabilidade prática dos resultados obtidos.

Durante os ensaios, as algas residuais foram verificadas diariamente, para manter a mesma concentração em cada tratamento alimentar e garantir que não faltasse alimento, especialmente na densidade mais elevada. Assim, presume-se que o alimento não foi um fator limitante. O elevado valor de  $R^2$  indica uma correlação muito forte entre a concentração residual de células de microalgas e a concentração de clorofila total, sugerindo que a clorofila é um bom indicador da biomassa fitoplanctónica presente no sistema. Esta relação é consistente com estudos prévios que reportam a utilização da concentração de pigmentos fotossintéticos, em particular a clorofila a, como proxy da biomassa algal (Lorenzen, 1967; Strickland & Parsons, 1972).

A inclinação da reta (1,7537) reforça que mesmo pequenas variações na densidade celular residual resultam em aumentos substanciais na concentração de clorofila, evidenciando que a

acumulação de pigmentos está diretamente associada ao crescimento e disponibilidade de microalgas na coluna de água. Este padrão pode refletir não apenas a densidade celular, mas também diferenças fisiológicas das microalgas, como o teor de pigmentos por célula, o qual pode variar em função de condições ambientais e nutricionais (MacIntyre, Kana, & Geider, 2000).

No contexto da maternidade de bivalves, esta forte correlação sugere que a monitorização da clorofila total pode constituir uma ferramenta prática para avaliar a disponibilidade de alimento no sistema, servindo como indicador indireto da concentração de microalgas residuais fornecidas às sementes. Tal abordagem tem sido defendida como alternativa em sistemas de produção onde a monitorização celular contínua é limitada ou difícil de implementar (Coutteau & Sorgeloos, 1992; Helm *et al.*, 2004). Deste modo, como a contagem direta de células residuais é um processo moroso e limita a frequência de recolha de dados, seria interessante avaliar em estudos futuros se a utilização exclusiva da clorofila pode fornecer estimativas fiáveis da concentração de células por mililitro, permitindo recolher um volume muito maior de informação.

Em síntese, os resultados confirmam que a densidade de cultivo é um fator determinante para o sucesso na produção de sementes de bivalves. A adoção de estratégias de gestão que privilegiem as densidades intermédias poderá representar a melhor solução para otimizar simultaneamente a produtividade do sistema e o desempenho individual, garantindo maior eficiência no processo de cultivo de sementes de amêijoas.

### 5.5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a densidade inicial de cultivo influencia diretamente o crescimento e a sobrevivência de sementes de amêijoas-macha (*V. corrugata*) em sistema *upweller*. Os resultados evidenciaram que densidades baixas promoveram maiores ganhos percentuais de biomassa, mas resultaram em produções absolutas reduzidas. Por outro lado, densidades elevadas ( $\geq 500$  g) comprometeram ambos os parâmetros, conduzindo a menores valores de produção e ganho relativo. A densidade intermédia de 280 g destacou-se como a mais vantajosa, combinando elevada produção absoluta com ganhos percentuais satisfatórios. Este valor passou a ser adotado como referência pela Oceano Fresco, tendo resultado num aumento significativo da produtividade da maternidade. Em síntese, este trabalho reforça que a densidade de cultivo é um dos principais fatores a considerar na produção de sementes de bivalves em sistemas *upweller*. A definição de valores ótimos contribui não só para aumentar o rendimento imediato, mas também para gerar conhecimento científico aplicável à gestão sustentável da espécie *V. corrugata*.

## 6. Referências bibliográficas

- Aranda-Burgos, J. A., da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J., & Martínez-Patiño, D. (2014). Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*, 420, 38-48.
- Aranda-Burgos, J.A., da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J., Martínez-Patiño, D. 2014a. Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): a study of the shell differentiation process. *Journal of Molluscan Studies* 80: 8 – 16.
- Astorga, M. P. (2014). Genetic considerations for mollusk production in aquaculture: current state of knowledge. *Frontiers in genetics*, 5, 435.
- Bae, H., Im, J., Joo, S., Cho, B., & Kim, T. (2021). The effects of temperature and salinity stressors on the survival, condition and valve closure of the Manila clam, *Venerupis philippinarum* in a holding facility. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(7), 754.
- Barnabé, G. (2018). *Aquaculture: biology and ecology of cultured species*. CRC Press.
- Beadman, H. A., Kaiser, M. J., Galanidi, M., Shucksmith, R., & Willows, R. I. (2004). Changes in species richness with stocking density of marine bivalves. *Journal of Applied Ecology*, 41(3), 464–475. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8901.2004.00906.x>
- Bertoldi, F. C., Sant'anna, E. R. N. A. N. I., & Oliveira, J. L. B. (2008). Revisão: Biotecnologia de microalgas. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 26(1), 9-20.
- Boyd, C. E. (2017). General relationship between water quality and aquaculture performance in ponds. In *Fish diseases* (pp. 147-166). Academic Press.
- Brown, M. R., & Blackburn, S. I. (2013). Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. *Advances in aquaculture hatchery technology*, 117-158e.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4), 315-331.
- Campbell, M. D., Hall, S. G., & Obenour, D. R. (2020). Application of packed bed reactor theory and Bayesian inference to *upweller* culture of juvenile oysters. *Aquacultural Engineering*, 90, 102098.
- Castro-Olivares, A., Des, M., Olabarria, C., DeCastro, M., Vázquez, E., Sousa, M. C., & Gómez-Gesteira, M. (2022). Does global warming threaten small-scale bivalve fisheries in NW Spain?. *Marine Environmental Research*, 180, 105707.
- Cavalli, L. S., da Rocha, A. F., de Brito, B. G., de Brito, K. C. T., & Rotta, M. A. (2021). Major sustainable development goals applied to aquaculture. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 27(1), 110-126.
- Cerviño Otero, A. (2011). *Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa Venerupis corrugata (Montagu, 1803)*.
- Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., ... & Yan, X. (2020). Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal Research*, 51, 102076.

- Coutteau, P., & Sorgeloos, P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11, 467-467.
- da Costa, D. P. (2018). *Ensaio para cultivo de amêijoia-macha Venerupis corrugata (Gmelin, 1791) e amêijoia-cão Politapes aureus (Gmelin, 1791) em aquacultura* (Master's thesis, Instituto Politecnico de Leiria (Portugal)).
- da Costa, F. (2012). Introduction to the biology of clams. *Clam Fisheries and Aquaculture*, 1.
- Da Costa, F., Aranda-Burgos, J. A., Cerviño-Otero, A., Fernandez-Pardo, A., Louzán, A., Nóvoa, S., ... & Martínez-Patiño, D. (2013). Clam reproduction. *Clam Fisheries and Aquaculture*. New York: Nova Science Publisher, 45-71.
- da Costa, F., Cerviño-Otero, A., Iglesias, Ó., & Cruz, A. (2019). Cultivo de bivalves em maternidade e critérios para a sua localização. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, 8(2), 13-27.
- da Costa, F., Cerviño-Otero, A., Iglesias, Ó., Cruz, A., & Guévelou, E. (2020). Hatchery culture of European clam species (family Veneridae). *Aquaculture International*, 28(4), 1675-1708.
- Dame, R. F., & Kennen, M. J. (2011). *Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach* (p. 284). Taylor & Francis.
- De Sousa, J. T., Milan, M., Pauletto, M., Bargelloni, L., Joaquim, S., Matias, D., ... & Huvet, A. (2015). A microarray-based analysis of oocyte quality in the European clam *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, 446, 17-24.
- Dinis, M. T., & Rocha, R. M. (2021). *Introdução à Aquacultura (1ª edição)*. Lisboa: Lidel
- Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. (2024). Aquacultura. DGRM. <https://www.dgrm.mm.gov.pt/>
- dos Santos, A. C. (2018). *Mortalidade de juvenis de Venerupis corrugata (Gmelin, 1791) por stresse salino e térmico* (Master's thesis, Universidade de Aveiro (Portugal)).
- Duthie, I. (2010). Global Perspective of Bivalve Hatchery Processes. In *Project No 1017*. Nuffield Australia.
- European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. (2023). Aquaculture in the EU. European Commission. [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Aquaculture\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Aquaculture_statistics)
- FAO. 2009. *Ruditapes decussatus*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Figueras, A. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. CD-ROM (multilingual).
- FAO. 2009. *Venerupis corrugata*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Figueras, A. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. CD-ROM (multilingual).
- FAO. 2024. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action*. Rome.
- Fernández-Pardo, A., da Costa, F., Rial, D., Nóvoa, S., Martínez-Patiño, D., & Vázquez, J. A. (2016). Use of response surface methodology to determine optimum diets for *Venerupis corrugata* larvae: effects of ration and microalgal assemblages. *Aquaculture*, 452, 283-290.

Ferreira, P. M. P. (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos.

Ferreira, R. G., Ferreira, J. G., Boogert, F. J., Corner, R. A., Nunes, J. P., Grant, J., ... & Dewey, W. F. (2020). A multimetric investor index for aquaculture: Application to the European Union and Norway. *Aquaculture*, 516, 734600.

Food and Agriculture Service/United States Department of Agriculture. (2021). The Portuguese seafood sector. USDA Foreign Agricultural Service. <https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=The+Portuguese+Seafood+Sector+ Madrid Portugal 03-11-2021>

Goes, C. B. B., Teixeira, S., Mena, C., Silva, F., Cruz, A., Basílio, I., ... & Poças, F. Extending Shelf Life of Live *Venerupis corrugata* Clams-Important Aspects of Current Packaging and Advances in Modified Atmosphere Packaging. Available at SSRN 5022589.

Gosling, E. (2008). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons.

Gosling, E. (2015). *Marine bivalve molluscs*. John Wiley & Sons.

Goulart, S. M. G. (2024). The Ocean Feeding Life-The Role of Aquaculture (Master's thesis, Universidade NOVA de Lisboa (Portugal)).

Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2012). Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. *Aquaculture*, 10(1516), 59-78.

Guillen, J., Asche, F., Borriello, A., Carvalho, N., Druon, J. N., Garlock, T., ... & Macias, D. (2025). What is happening to the European Union aquaculture production? Investigating its stagnation and sustainability. *Aquaculture*, 596, 741793.

Hadley, N. H., & Whetstone, J. M. (2007). Hard clam hatchery and nursery production. *Southern Regional Aquaculture Center, Publication, 4301*.

Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Hollenbeck, C. M., & Johnston, I. A. (2018). Genomic tools and selective breeding in molluscs. *Frontiers in genetics*, 9, 253.

Instituto Nacional de Estatística - Estatísticas da Pesca : 2023. Lisboa : INE, 2024. Disponível na [www: <url:https://www.ine.pt/xurl/pub/439542305>](https://www.ine.pt/xurl/pub/439542305). ISSN 0377-225-X. ISBN 978-989-25-0679-1

Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Morfologia, biologia e ecologia dos moluscos bivalves.[cited 2025 Jan 26]. Available from: <http://www.ipma.pt/pt/enciclopedia/pecas/index.html>

Joaquim, S., Matias, D., Matias, A. M., Leitão, A., Soares, F., Cabral, M., ... & Gaspar, M. B. (2016). The effect of density in larval rearing of the pullet carpet shell *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 47(4), 1055-1066.

Lekang, O. I. (2013). *Aquaculture engineering*. Chichester: Wiley-Blackwell.

- Liang, S., Li, H., Liang, J., Liu, H., Wang, X., Chen, L., ... & Guo, Y. (2024). Synergistic effects of bivalve and microalgae co-cultivation on carbon dynamics and water quality. *Marine Environmental Research*, 201, 106672.
- Liu, H., Ye, T., Soon, T. K., Zhang, H., Cheng, D., Li, S., ... & Zheng, H. (2019). Effects of stocking density on the growth performance, bacterial load and antioxidant response systems of noble scallop *Chlamys nobilis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 40-44.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M., & Geider, R. J. (2000). The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends in plant science*, 5(1), 12-17.
- Mahari, W. A. W., Waiho, K., Fazhan, H., Azwar, E., Shu-Chien, A. C., Hersi, M. A., ... & Lam, S. S. (2024). Emerging paradigms in sustainable shellfish aquaculture: Microalgae and biofloc technologies for wastewater treatment. *Aquaculture*, 740835.
- Marques, A. I. C. (2019). *Conversão de uma unidade de dourada para modo de produção biológica* (Master's thesis, Universidade de Lisboa (Portugal)).
- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1), 33-55.
- Marshall, R., Pearce, C. M., & McKinley, R. S. (2014). Interactive effects of stocking density and algal feed ration on growth, survival, and ingestion rate of larval geoduck clams. *North American Journal of Aquaculture*, 76(3), 265–274. <https://doi.org/10.1080/15222055.2014.902546>
- Matias, D. C. C. (2013). Bases Biológicas e Ambientes para a Optimização da Produção de Amêijoabo *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) (Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa). Repositório RUN Universidade NOVA de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10362/9371>
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A. M., Moura, P., de Sousa, J. T., Sobral, P., & Leitão, A. (2013). The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*, 406, 52-61.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., & Divanach, P. (2003). Uses of microalgae in aquaculture. *Live feeds in marine aquaculture*, 1, 253-299.
- Nascimento-Schulze, J. C., Bean, T. P., Houston, R. D., Santos, E. M., Sanders, M. B., Lewis, C., & Ellis, R. P. (2021). Optimizing hatchery practices for genetic improvement of marine bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2289-2304.
- Newell, R. I. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *Journal of Shellfish research*, 23(1), 51-62.
- Newkirk, G. F. (1980). Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, 19(3), 209-228.
- Oliveira, I. B. D., Lavander, H. D., Lima, P. C. M. D., Oliveira, C. Y. B. D., Dantas, D. M. D. M., & Gálvez, A. O. (2019). Effect of stocking density on the growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791)(Bivalvia: Veneridae) post-larvae. *Ciência Rural*, 49(12), e20190420.
- Oyama, T., Kato, Y., Hidese, R., Matsuda, M., Matsutani, M., Watanabe, S., ... & Hasunuma, T. (2022). Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous

Chlamydomonas sp. mutant using multi-omics profiling. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 95.

Pinto, L. F. R., Ferreira, G. F., Tasic, M., (2021). Cultivation techniques. In Galakanis, C. M., (2021). *Microalgae – cultivation, recovery of compounds and applications*. 1-33.

Pires, D. S. (2018). *Produção de Moluscos Bivalves e Fatores de Risco Associados* (Master's thesis, Universidade de Lisboa (Portugal)).

Portugal, I. C. (2012). Avaliação do crescimento de microalgas importantes para aquicultura cultivadas com diferentes concentrações de nutrientes.

Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C., Guerra A. (eds.) 2012. Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal. 14, 412 pp. Edit. Asoc. Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. Santiago de Compostela, A Coruña, España.

Rico-Villa, B., Pouvreau, S., & Robert, R. (2009). Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 287(3-4), 395-401.

Rocha, C. P., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. (2022). A global overview of aquaculture food production with a focus on the activity's development in transitional systems— The case study of a South European Country (Portugal). *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(3), 417.

Rocha, R. J., & Dinis, M. T. (2019). Aquicultura Sustentável: da subsistência à produção comercial. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, 8(1), 40-50.

Rodrigues, NV; Maranhão, P; Oliveira, P; Alberto, J (2023). Espécies Marinhas de Portugal. Instituto Politécnico de Leiria. Peniche.

Samat, N., Goh, K. H., & See, K. F. (2024). Review of the application of cost–benefit analysis to the development of production systems in aquaculture. *Aquaculture*, 740816.

Schädler, T., Thurn, A. L., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2021). Continuous production of lipids with microchloropsis salina in open thin-layer cascade photobioreactors on a pilot scale. *Energies*, 14(2), 500.

Soares, M. C. P. (2020). *Projeto e desenvolvimento de microfermentadores monitorados por sensor de fibra óptica* (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2020. In: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/349957>).

Strategic Plan for Portuguese Aquaculture 2021-2030. (2021). European Commission / Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries. [https://aquaculture.ec.europa.eu/system/files/2023-03/AAM\\_MNSP\\_PORTUGAL\\_0.pdf](https://aquaculture.ec.europa.eu/system/files/2023-03/AAM_MNSP_PORTUGAL_0.pdf)

Tarnecki, A. M., Landry, K., & Rikard, S. (2023). Nursery *upweller* type has minimal impact on subsequent grow-out of Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Frontiers in Aquaculture*, 2, 1236346.

Tenorio, C., Hernández, H. E., Aguirre Obregón, M. A., & Aguilar Samanamud, C. (2023). Actualización del Manual para obtención de cepas de microalgas.

- Umetani, I., Sposób, M., & Tiron, O. (2024). Semi-continuous cultivation for enhanced protein production using indigenous green microalgae and synthetic municipal wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 36(3), 1105-1116.
- van der Schatte Olivier, A., Jones, L., Vay, L. L., Christie, M., Wilson, J., & Malham, S. K. (2020). A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 3-25.
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M., & Freitas, R. (2016). Accumulation and sub-cellular partitioning of metals and As in the clam *Venerupis corrugata* : different strategies towards different elements. *Chemosphere*, 156, 128-134.
- Ventura, C. F. P. (2019). *Moluscos Bivalves e Impacte Ambiental: Cafeína e Biomarcadores de Efeito* (Master's thesis, Universidade de Lisboa (Portugal)).
- 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*. Fisheries Investigation, Series II, Vol. 26. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Wijsman, J. W. M., Troost, K., Fang, J., & Roncarati, A. (2019). Global production of marine bivalves. Trends and challenges. *Goods and services of marine bivalves*, 7-26.
- Zorita, I., Juez, A., Solaun, O., Muxika, I., & Rodríguez, J. G. (2021). Stocking density effect on the growth and mortality of juvenile European flat oyster (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758). *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 1(1), 60-65.