

*Aplicação de dietas piloto de microalgas em nutrição  
de reprodutores de amêijoia (*Ruditapes philippinarum*)*

João Ribeiro Pinto



*Aplicação de dietas piloto de microalgas em nutrição  
de reprodutores de amêijoas (*Ruditapes philippinarum*)*

João Ribeiro Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Baptista e  
da Doutora Patrícia Diogo

2024



Título: Aplicação de dietas piloto de microalgas em nutrição de reprodutores de amêijoas (*Ruditapes philippinarum*)

Copyright© João Ribeiro Pinto

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Resumo

A amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) tem sido uma das espécies mais amplamente introduzidas para fins de aquacultura na Europa devido ao seu elevado crescimento, resistência e facilidade de captura e forte procura no mercado. A obtenção de sementes de amêijoia para aquacultura dependia, até recentemente, da recolha em meio selvagem, no entanto, durante as últimas duas décadas, foi observado um grave declínio nas populações de bivalves refletindo-se diretamente na disponibilidade de sementes. Estas limitações levaram a um aumento da necessidade de reprodução controlada em maternidades e por consequente da necessidade de uma dieta equilibrada e formulada para a nutrição de bivalves que esteja disponível comercialmente e que permita o fornecimento contínuo de alimento.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de cinco dietas no acondicionamento de reprodutores de *R. philippinarum* das quais três foram selecionadas para avaliar o seu impacto a nível do desenvolvimento gonadal, sendo utilizada uma dieta controlo a base de microalgas vivas (dieta A), um concentrado líquido à base de microalgas inertes (dieta B) e um pó piloto à base de microalgas inertes combinadas com probióticos (dieta E). No final do acondicionamento a dieta E revelou ter efeitos positivos no desenvolvimento gonadal dos reprodutores apresentando a maior proporção de animais maduros (IG=4,07) em comparação com a dieta A (IG=3,20). Em termos nutricionais a dieta A apresentou um teor lípido significativamente mais elevado ( $73,92 \pm 41,79 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) enquanto a dieta E se destacou pelo teor proteico ( $846,65 \pm 289,99 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC). Adicionalmente os dados sugerem que o decréscimo no índice de condição dos reprodutores esteja associado à ocorrência de uma desova no início do acondicionamento uma vez que quando estes foram adquiridos já se encontravam maduros.

**Palavras-chave:** *Ruditapes philippinarum*; acondicionamento de reprodutores; dietas de microalgas; concentrado de microalgas; alimento inerte;



## ***Abstract***

The Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*) has been one of the most widely introduced species for aquaculture purposes in Europe due to its high density, ease of capture, and strong market demand. Obtaining clam seeds for aquaculture depended, until recently, on wild collection. However, over the last two decades, a severe decline in bivalve populations has been observed, directly affecting seed availability. These limitations have led to an increased need for controlled reproduction in hatcheries and consequently to the necessity of a balanced, commercially available formulated diet for bivalve nutrition, allowing for continuous food supply.

The aim of this study was to evaluate the effect of five diets on the conditioning of *R. philippinarum* broodstock, of which three were selected to assess their impact on gonadal development. A control diet based on live microalgae (diet A), a liquid concentrate based on inert microalgae (diet B), and a pilot powder based on inert microalgae combined with probiotics (diet E) were used. At the end of conditioning, diet E showed positive effects on gonadal development of broodstock, exhibiting the highest proportion of mature animals (IG=4.07) compared to diet A (IG=3.20). Nutritionally, diet A had a significantly higher lipid content ( $73.92 \pm 41.79 \mu\text{g mg}^{-1}$  AFDW), while diet E stood out for its protein content ( $846.65 \pm 289.99 \mu\text{g mg}^{-1}$  AFDW). Additionally, the data suggest that the decrease in the condition index of the broodstock is associated with spawning at the beginning of conditioning, as they were acquired already mature.

**Keywords:** *Ruditapes philippinarum*; broodstock conditioning; microalgae diets; microalgae concentrate; inert food.



## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	16
<b>1.1. <i>Ruditapes philippinarum</i></b> .....	18
<b>1.1.1. Aquacultura de amêijoia japonesa</b> .....	19
<b>1.1.2. Alimentação</b> .....	22
<b>1.1.3. Reprodução</b> .....	23
<b>1.1.4. Acondicionamento de reprodutores</b> .....	24
<b>1.2. Objetivos</b> .....	24
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	26
<b>2.1. Cultivo de microalgas</b> .....	26
<b>2.2. Análise microbiológica</b> .....	26
<b>2.3. Desenho experimental</b> .....	26
<b>2.6. Rotinas diárias</b> .....	29
<b>2.7. Procedimentos analíticos</b> .....	30
<b>2.7.2. Biometria</b> .....	30
<b>2.7.3. Determinação do índice de condição</b> .....	30
<b>2.7.4. Análises bioquímicas</b> .....	31
<b>2.7.5. Análise histológica</b> .....	33
<b>2.7.6. Análise estatística</b> .....	37
<b>3. Resultados</b> .....	38
<b>3.1. Análise microbiológica</b> .....	38
<b>3.2. Ensaio 1</b> .....	40
<b>3.3. Ensaio 2</b> .....	42
<b>3.3. Ensaio 3</b> .....	44
<b>3.4.1. Biometria</b> .....	46
<b>3.4.2. Índice de condição</b> .....	47
<b>3.4.3. Análise bioquímica</b> .....	47

<b>3.4.4. Análise histológica</b> .....	50
<b>4. Discussão</b> .....	52
<b>5. Conclusão</b> .....	59
<b>6. Referências</b> .....	61
<b>7. Anexos</b> .....	68

## Índice de figuras

**Figura 1-** Capturas mundiais da pesca e produção mundial aquacultura (FAO, 2022);

**Figura 2 -** Produção mundial de aquacultura de animais aquáticos e algas desde 1990 até 2018 (FAO, 2022).

**Figura 3-** Plano de amostragens (biometria, análise bioquímica e histologia) nos três momentos de amostragem (T0, T1 e T2) e número de indivíduos amostrados (n) por dieta.

**Figura 4-** Microfotografias representativas dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas femininas de *Ruditapes philippinarum* (A-F) A - Repouso sexual; B – Gametogénese inicial; C - Gametogénese avançada; D – Maturação; E – Desova; F – Pós-desova.

**Figura 5-** Microfotografias representativas dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas masculinas de *Ruditapes philippinarum* (A-F) A - Repouso sexual; B – Gametogénese inicial; C - Gametogénese avançada; D – Maturação; E – Desova; F – Pós-desova.

**Figura 6–** Valores das contagens microbiológicas (média±DP, n=3) em meio TSA com 1,5% de NaCl e densidade celular (média, n=3) observadas nas culturas *stock* ao longo de 5 semanas: A) *Tetraselmis chui*; B) *Tisochrysis lutea* e C) *Skeletonema costatum*. Os resultados das contagens microbiológicas foram expressos em unidades formadoras de colónias por ml (UFC/ml) e os resultados da densidade expressos em densidade de células por ml (cel/ml).

**Figura 7–** Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e C (concentrado líquido piloto) durante 12 dias.

**Figura 8-** Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido), C (concentrado líquido piloto) e D (microalgas vivas em iguais proporções) durante 33 dias.

**Figura 9-** Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto combinado com probióticos) durante 55 dias.

**Figura 10-** Valores do peso em gramas (g) (média±DP, n=15) observados em indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio). As diferentes letras representam as diferenças significativas entre dietas ao longo do ensaio (One way ANOVA, post hoc Tuckey,  $P<0,05$ ).

**Figura 11-** Valores do índice de condição (média±DP, n=15) observados em indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio). Os resultados foram expressos em média. As diferentes letras representam as diferenças significativas entre dietas ao longo do ensaio (One way ANOVA, post hoc Tuckey,  $P<0,05$ ).

**Figura 12**– Análise bioquímica de indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio): A) Teor de proteína (média±DP, n=15), B) Teor de lípidos totais (média±DP, n=15), C) Teor de glicogénio (média±DP, n=15). Os resultados foram expressos em média ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC). As diferentes letras representam as diferenças significativas (One way ANOVA, post hoc Tuckey,  $P<0,05$ ).

**Figura 13**- Variações do desenvolvimento das gónadas dos machos e fêmeas de *R. philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio) onde 0- Repouso sexual; I – Gametogénese inicial; II - Gametogénese avançada e III – Maturação.

## Índice de tabelas

**Tabela 1** - Escala reprodutiva segundo Gaspar (1996) e Maia et al. (2021) para indivíduos da espécie *Ruditapes philippinarum*.

**Tabela 2** – Valores do índice gonadal (IG) observados em indivíduos de *R. philippinarum* (n=15) acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio).

## **Lista de abreviaturas**

**SOFIA:** The State of World Fisheries and Aquaculture

**DGRM:** Direção Geral dos Recursos Marinhos

**FAO:** Food and agriculture organization

**BRD:** Brown ring disease

**DHA:** ácido docosaheptaenóico

**EPA:** ácido eicosapentaenóico

**PUFA:** ácidos gordos polinsaturados

**AA:** ácido araquidónico

**LC-PUFA:** ácidos gordos de cadeia longa

**EDTA:** sacarose ácido etilendiamino tetra-acético

**NaOH:** hidróxido de sódio

**KOH:** hidróxido de potássio

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** sulfato de sódio

**NaCl:** cloreto de sódio

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico

**IC:** índice de condição

**IG:** índice gonadal

**DP:** desvio padrão

**ANOVA:** Analysis of variance between groups method

**UFC:** unidades formadoras de colónia

**TSA:** Tryptic soy agar

**TCBS:** Thiosulfate-citrate-Bile salts-sucrose

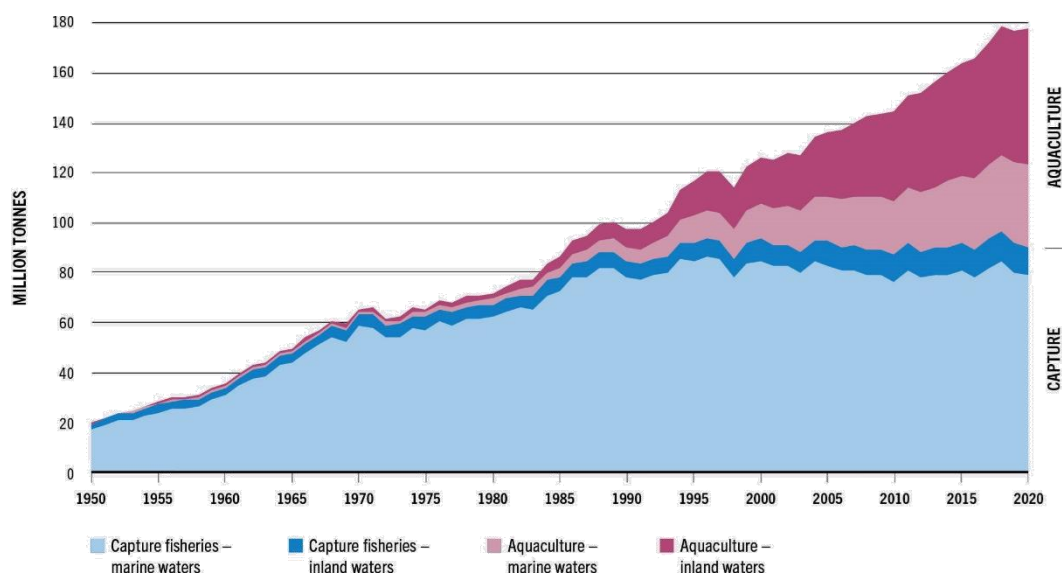
**AFDW:** Ash free dry weight



## 1. Introdução

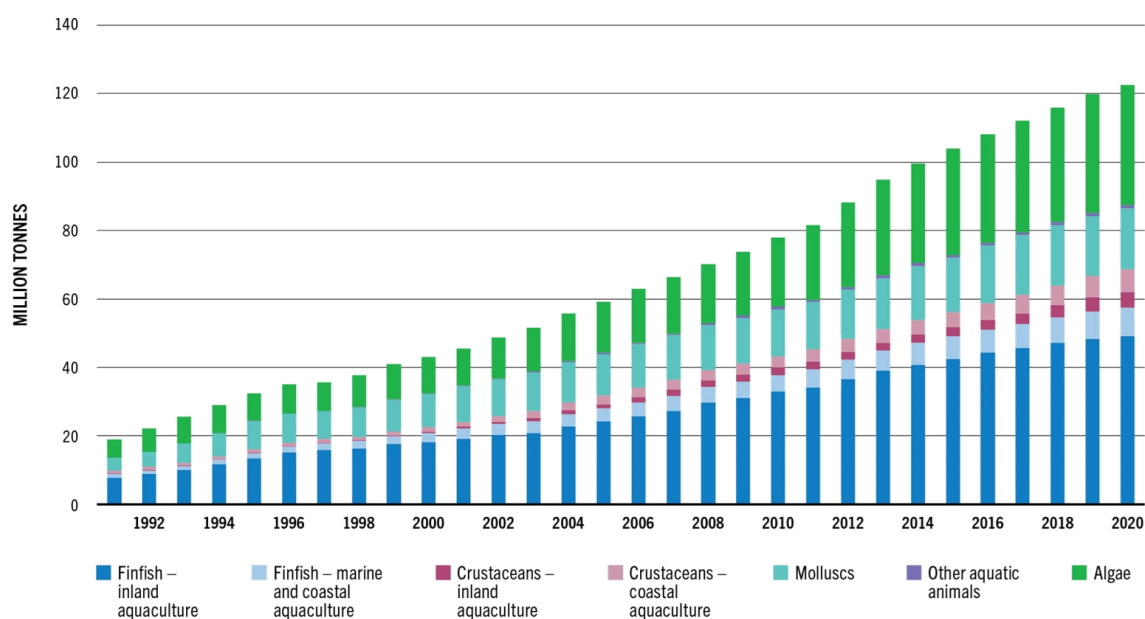
O aumento exponencial da população global resulta na necessidade da produção de alimentos, especialmente provenientes do mar. Desta forma a aquacultura constitui um elemento essencial no futuro da indústria alimentar e contribui ativamente para a redução do défice existente entre a demanda de alimentos de origem marinha e reabilitação de stocks selvagens para uma exploração pesqueira sustentável (FAO, 2022).

Segundo o último relatório *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)* (FAO, 2022), em 2020 a produção total de pesca e captura de recursos registou 90,3 milhões de toneladas apresentando um decréscimo de 4,0% face à média dos três anos anteriores (Figura 1). Esta diminuição compreende a pesca de captura marinha e em águas interiores (3,9% e 4,3%, respetivamente). Estima-se que esta queda esteja relacionada com as interrupções nas operações pesqueiras devido à pandemia de COVID-19 e à redução de capturas na China (10% menor em 2020). O pico registado nos três anos anteriores, em 2018, compreendeu uma produção total de capturas de 96,5 milhões de toneladas devido às elevadas capturas de anchoveta (*Engraulis ringens*) (FAO, 2022).



**Figura 1-** Capturas mundiais da pesca e produção mundial aquacultura (FAO, 2022).

Em 2020, a produção mundial no setor da aquacultura manteve-se estável, compreendendo 87,5 milhões de toneladas de animais aquáticos, para fins alimentares, 35,1 milhões de toneladas de algas como recurso alimentar e não alimentar e 700 toneladas de conchas e pérolas para uso ornamental, atingindo um total de 122,6 milhões de toneladas em peso vivo em 2020 (FAO, 2022). Em 2022 a produção de outras espécies de animais aquáticos de criação atingiu 17,7 milhões de toneladas de moluscos, principalmente bivalves e 11,2 milhões de toneladas de crustáceos (Figura 2) (FAO, 2022).



**Figura 2** - Produção mundial de aquacultura de animais aquáticos e algas desde 1990 até 2018 (FAO, 2022).

Em Portugal a produção de moluscos em aquacultura registou em 2020 um total de 9 863 toneladas correspondendo a 47,5% da produção, observando-se assim um aumento face a 2019 (46,6%) que representou 58% da produção aquícola total. Em 2020 as ostras foram a espécie mais relevante, registando-se uma produção de 3 838 toneladas, mais de 50% da produção de 2019, seguidas das amêijoas que no mesmo ano registaram uma produção de 3 659 toneladas, com um aumento de 11,7% e dos mexilhões (*Mytilus* sp.) registando uma produção de 2 007 toneladas, com um aumento de 37,7%. (DGRM, 2022). Neste momento a apanha excessiva e a produção irregular de amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*) levaram a grandes importações de amêijoa-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), assim como ao desenvolvimento do cultivo desta espécie, apesar de não ser permitida em Portugal a sua cultura ou transposição, uma vez que se trata de uma

espécie exótica invasora (IPMA, 2022), o que contribuiu para o decréscimo da amêijoa-boia (FAO, 2022).

Atualmente os bancos naturais de sementes de amêijoa apresentam pouca produtividade, condicionando a obtenção de reprodutores utilizados em aquacultura (Martini et al., 2023). A utilização de espécies invasoras representa uma vantagem devido à sua capacidade adaptativa e performance reprodutiva. À parte das vantagens económicas do cultivo da amêijoa japonesa, é inegável que a introdução e adaptação de espécies exóticas invasoras numa dada região pode comprometer o ecossistema onde esta prolifere (Maia et al., 2021). O impacto negativo de espécies exóticas gera problemas às comunidades existentes a nível da competição interespecífica por espaço e alimento (Czech et al., 1997; Wilcove et al., 1998; Solidoro et al., 2000), predação (Cohen et al., 1995; Levings et al., 2002) ou como vetor de transmissão de agentes patogénicos ou parasitas (Crowl et al., 2008). Os efeitos das espécies invasoras sobre as espécies nativas são imprevisíveis e podem causar um declínio populacional ou até mesmo a sua extinção, com graves consequências económicas e sociais por vezes de carácter irreversível e de difícil contabilização (Maia et al., 2021).

### **1.1. *Ruditapes philippinarum***

*Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) ou amêijoa japonesa é um molusco bivalve pertencente à família Veneridae. Encontra-se amplamente distribuída nas costas ocidentais do Oceano Pacífico, desde as Filipinas até a Rússia e é caracterizada por elevadas taxas de crescimento e elevada tolerância a uma ampla gama de condições ambientais (Coelho et al., 2021). A espécie foi acidentalmente introduzida nas costas californianas durante a década de 1930 devido à importação de sementes de ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* do Japão, espalhando-se por toda a costa do Pacífico até o Alasca (Moura et al., 2017). Externamente, a amêijoa japonesa dispõe de uma concha espessa, inequilateral e com bicos na metade anterior, apresentando estrias radiais bem evidenciadas (FAO, 2022). O seio paleal é profundo e arredondado, sem chegar ao centro da valva e apresentam um bordo liso (Garulet, 2011). Na região média as estrias longitudinais são menos evidentes e podem apresentar uma coloração castanha ou amarela (Garulet, 2011; FAO, 2022) formando diversos desenhos geralmente com manchas ou bandas escuras concêntricas ou irregulares. O interior da concha apresenta uma coloração esbranquiçada podendo alguns indivíduos exibir uma cor púrpura na região próxima ao umbo. Pode atingir até 8 cm de comprimento (Garulet, 2011).

Relativamente à sua morfologia interna observam-se dois sifões fundidos na maior parte do seu comprimento, sendo separados apenas nas pontas (Nerlović et al., 2016), um manto, brânquias, palpos labiais, músculo adutor e massa visceral e massa visceral dividida em, pé, que permite a sua locomoção e massa visceral contendo os também se divide em duas partes, o pé, que permite a locomoção e a própria massa visceral, onde se encontram os sistemas reprodutivo, digestivo, nervoso e circulatório (FAO, 2022).

Esta espécie nativa da região do Indo-Pacífico e foi intencionalmente importada pela primeira vez para a lagoa de Veneza, na Itália, em 1983, para fins experimentais de cultivo e encontra-se distribuída no Mar Mediterrâneo e na costa Atlântica (Martini et al., 2023).

Devido às suas características de fácil adaptação e reprodução esta tornou-se a espécie preferida para a indústria de produção de amêijoas, o que impulsionou a sua introdução em todo o mundo (Coelho et al., 2021). O sucesso da colonização e adaptação da amêijoa japonesa no meio natural deve-se a características particulares desta espécie tal como rápida taxa de crescimento, época reprodutiva longa e elevada capacidade de reprodução (Moura et al., 2017; Moura et al., 2018). Além disso, esta espécie tem uma elevada capacidade de filtração ( $0,96 \text{ dm}^3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ ) (Sorokin & Giovanardi, 1995) quando comparada com *Ruditapes decussatus* ( $0,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ ) (Abidli et al., 2023) com a qual compete no mesmo nicho ecológico (Francisco et al., 2021). Morfologicamente é difícil distinguir *R. philippinarum* de *R. decussatus* devido às suas semelhanças morfológicas, por esta razão, *R. philippinarum* é frequentemente submetida a fraudes alimentares, sendo erroneamente identificada como *R. decussatus* que possui um valor comercial mais elevado (Nerlović et al., 2016).

### **1.1.1. Aquacultura de amêijoa japonesa**

A Itália ocupa a posição de segundo maior produtor global de amêijoa japonesa e destaca-se como o principal produtor na Europa, contribuindo com 95% do rendimento total e a sua produção anual de amêijoas atinge 33 500 toneladas (Bordignon et al., 2021). A produção italiana tem origem predominantemente no Mar Adriático do Norte, especialmente nas lagoas costeiras de Veneza e em áreas como Marano, Scardovari e Goro, onde a maior parcela da produção resulta de atividades aquícolas (Chiesa et al., 2011). Atualmente, a produção de amêijoa japonesa na Europa deriva principalmente da pesca de populações selvagens, estabelecidas após introduções mediadas pelo homem (Chiesa et al., 2011). É o caso de França, especificamente da Baía de Arcachon, onde toda

a produção provém de populações originalmente antropogenicamente introduzidas entre 1972 e 1975 (Bald et al., 2009; Bidegain & Juanes, 2013; Robert et al., 2013), assim como Espanha (Bidegain & Juanes, 2013) e Portugal (Dias et al., 2019; Carvalho et al., 2020; Martini et al., 2023).

A amêijoia japonesa ocorre em Portugal há mais de duas décadas e apesar do seu cultivo não ser permitido, existem registos da sua ocorrência em águas portuguesas desde o início da década de 80 sendo encontradas em diversos estuários (Rio Tejo e Rio Sado), sistemas lagunares (Ria Formosa e Ria de Aveiro) e lagoas costeiras (Lagoa de Albufeira e Lagoa de Óbidos) (Carvalho et al., 2020). Contudo, a exploração comercial intensiva da amêijoia japonesa é permitida ao abrigo da legislação em vigor (Pires, 2018). Atualmente, a capturas podem ser realizadas na Ria de Aveiro com limites de peso e tamanho mínimo, sendo permitida a captura de 30 kg de amêijoia japonesa, por mariscador, com um tamanho mínimo de 3,5cm. Este valor é muito superior ao permitido para a amêijoia boa, que está estipulado um limite de 2 kg sem tamanho mínimo de captura (DGRM, 2022). A legislação atual aplicada à captura da amêijoia japonesa permite controlar a sua abundância e expansão na Ria de Aveiro proporcionando, simultaneamente, um rendimento suplementar aos mariscadores e a preservação das populações de moluscos bivalves nativas de maior valor económico como a amêijoia boa (Pires, 2018). A exploração comercial da amêijoia japonesa na Ria de Aveiro foi iniciada em 2010, registando uma média de desembarques de aproximadamente 3 toneladas, com um volume de vendas estimado em cerca de 5000€ (Francisco et al., 2021). Verificou-se um aumento significativo das capturas num curto espaço de tempo, sendo que em 2012 os desembarques excediam as 437 toneladas anuais gerando um lucro de 840 000 € (Maia et al., 2021). Estes valores justificam o impacto da introdução de uma espécie invasiva e a sua respetiva importância comercial para as comunidades piscatórias da região. O declínio das populações selvagens da sua congénere nativa *R. decussatus*, e consequentemente os poucos rendimentos da pesca, contribuíram para a introdução desta espécie em diversas zonas de produção de moluscos bivalves do país. Além disso, as populações de amêijoia japonesa são, geralmente, extremamente abundantes, fáceis de capturar e possuem forte procura no mercado (Coelho et al., 2021; FAO, 2022).

A obtenção de sementes de amêijoia para aquacultura dependia, da recolha em meio selvagem (Parisi et al., 2012; Robert et al., 2013), em lagoas costeiras, onde se registava maior abundância. No entanto, durante as últimas duas décadas, foi observado um sério

declínio nas populações de bivalves refletindo-se diretamente na disponibilidade de sementes (Martini et al., 2023). As causas deste declínio residem em fenómenos que atuam sinergicamente, como a apanha excessiva, aumento da temperatura da água do mar, redução da salinidade em sistemas lagunares onde ocorre a produção e ameijoas, anoxia, eutrofização, degradação da qualidade ambiental e doenças. As alterações climáticas representam um potencial fator limitante, interferindo diretamente na sobrevivência e no comportamento dos bivalves (Rato et al., 2022) e apesar da temperatura não ser o único fator ambiental, é um dos determinantes e que mais influencia a fisiologia e a distribuição do habitat (Castro-Olivares et al., 2022; Matozzo et al., 2013; Sobral & Widdows, 1997). No contexto das flutuações na salinidade, o agravamento do ciclo global de precipitação e evaporação, associado ao aumento do fluxo de água doce proveniente de rios e ao degelo glacial nos oceanos, influencia áreas estuarinas e costeiras, provocando alterações substanciais nos níveis de salinidade promovendo stress nos bivalves (Coughlan et al., 2009; Matozzo et al., 2013) que resultam em alterações nas respostas fisiológicas e comportamentais e, em casos extremos, levar a mortalidade elevada (Coughlan et al., 2009; Martini et al., 2023).

Os fatores patológicos têm também um impacto nas populações de bivalves, muitas espécies de bactérias do género *Vibrio* estão envolvidas em doenças que resultam em mortalidade elevada, quer em bancos naturais ou maternidades (Travers et al., 2015). *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996) é o agente etiológico responsável pela doença do anel castanho (BRD) (Paillard et al., 2014; Rahmani et al., 2021) e ocorre principalmente na ameijoas japonesa (Rahmani et al., 2021). Estes fatores afetam as populações de reprodutores selvagens na Europa (Martini et al., 2023), incluindo Portugal (Carvalho et al., 2020), levantando a dificuldades na obtenção de sementes para aquacultura. Consequentemente levou a um aumento da necessidade de reprodução controlada em maternidades para suprir as necessidades de apanha de sementes em meio selvagem (Robert et al., 2013). Desta forma a produção de sementes em aquacultura torna-se imperativa para conservar os stocks naturais e mitigar a sobre exploração das populações de bivalves. Em contrapartida, a gestão e manutenção de reprodutores representa um desafio, uma vez que devem ser garantidas as condições ótimas para o sucesso da produção das sementes, com principal destaque na alimentação. Dado que a produção de microalgas implica uma exigência significativa de recursos humanos e custos de produção (Soudant et al., 2000; Brown & Robert, 2002;) e está suscetível a colapsos,

torna-se imperativo recorrer à utilização de outras dietas específicas para a alimentação de reprodutores. É fundamental o desenvolvimento de uma dieta equilibrada focada na nutrição, a fim de assegurar uma elevada capacidade reprodutiva e qualidade da das larvas.

### **1.1.2. Alimentação**

Os bivalves obtêm nutrientes a partir de uma ampla variedade de matéria orgânica, nomeadamente fitoplâncton, microalgas bentónicas em suspensão, detritos e bactérias. Em culturas de moluscos, as microalgas vivas são tradicionalmente utilizadas como alimento para bivalves (Robert & Trintignac, 1997). É crucial ter em conta a facilidade de cultivo de uma espécie de microalga numa maternidade (Robert & Trintignac, 1997) uma vez que custo do cultivo de microalgas é elevado, equivalente a cerca de 30 a 50% dos custos totais de produção (Willer & Aldridge, 2017). Além da produção de microalgas requerer elevada mão de obra é passível de ocorrerem quebras dos cultivos, então a utilização de dietas desenvolvidas para a nutrição de reprodutores de bivalves torna-se um fator fundamental. O desenvolvimento de uma dieta equilibrada e formulada para a nutrição de bivalves, e que esteja disponível no mercado, permite o fornecimento contínuo de alimento que é indispensável para a maturação das gónadas e qualidade da progénie. A quantidade e qualidade do alimento são parâmetros importantes para o êxito das diferentes fases do cultivo. Para além de terem de ser necessário terem uma dimensão adequada para que sejam ingeridas, entre 2 e 10µm, o valor nutricional das microalgas e a digestibilidade das mesmas também são aspetos determinantes na escolha das espécies que devem ser incluídas na dieta. Os ácidos gordos polinsaturados como EPA (ácido eicosapentanóico) e ácido araquidónico (AA) são considerados essenciais em nutrição e processos fisiológicos de bivalves e devem ser fornecidos através da dieta. Estes ácidos gordos estão presentes principalmente no fitoplâncton e algas marinhas, sendo posteriormente transferidos para consumidores nos níveis tróficos superiores das cadeias alimentares marinhas (Zhukova, 2019). As diatomáceas são os principais contribuintes para as redes alimentares marinhas e são conhecidas como o principal fornecedor de ácidos gordos de cadeia longa (LC-PUFA). A elevada concentração de EPA e DHA (ácido docosahexaenóico) nas diatomáceas justificam a importância da sua presença nas dietas de bivalves. (Zhukova, 2019). Normalmente, as espécies de fitoplâncton utilizadas são flageladas como *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* e *Tetraselmis suecica* ou *Platymonas sp.* e combinações de flagelados com diatomáceas como *Skeletonema*

*costatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* e *Thalassiosira pseudonana* que são ricas em ácidos gordos, como DHA, EPA, vitaminas e aminoácidos, constituem um elemento fundamental nas dietas dos bivalves. Estas dietas balanceadas, facilitam a gametogénese e desenvolvimento larvar (Joaquim et al., 2008; FAO, 2022). Considerando características como o tamanho celular, a composição bioquímica (lípidos, proteínas, hidratos de carbono) e a facilidade de cultivo, as espécies de microalgas mais frequentemente utilizadas para o cultivo de bivalves são *Isochrysis spp.*, *Pavlova spp.* (primnesiófitas), *Skeletonema sp.*, *Thalassiosira spp.* (diatomáceas), *Tetraselmis spp.* (clorófitas), *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella sp.* (Albentosa et al., 2002; Cheng et al., 2020; Saucedo et al., 2013), (Spolaore et al., 2006). Em aquacultura, os flagelados e diatomáceas, principalmente *Isochrysis spp.* e *Chaetoceros spp.*, são utilizados para produção de *R. philippinarum* (Albentosa et al., 2002, 2007). Dietas constituídas por microalgas como *Tisochrysis lutea*, *Diacronema lutheri* e *Tetraselmis suecica* são exemplos de combinações que reúnem os valores nutricionais adequados ao desenvolvimento dos bivalves (Gui et al., 2016) cuja composição bioquímica se traduz num teor aproximado de 30,0% de proteína, 6,7% de lípidos e 0,6% de hidratos de carbono (Gui et al., 2016; Supono et al., 2023).

Nas últimas cinco décadas muitos estudos investigaram diferentes tipos de dietas como alternativa ou complemento a microalgas vivas incluindo bactérias, fermento, farinha, bioencapsulados contendo ácidos gordos polinsaturados (PUFA), concentrados de algas, pó de algas, micropartículas e microcápsulas para os cultivos bivalves (Robert & Trintignac, 1997; Martinez et al., 2000); Hendriks et al., 2003; Marshall et al., 2010; Parwadani Aji, 2011; López-Carvallo et al., 2017; Supono et al., 2023). A substituição parcial de microalgas vivas por diferentes tipos de dietas formuladas tem vindo a facilitar o cultivo de diversas espécies de bivalves. Alguns exemplos são, dietas à base de leveduras (Loor et al., 2021), emulsão lipídica (Soudant et al., 2000), micro encapsulados (Zhu et al., 2022), bactérias (Camacho et al., 2004) e pastas de microalgas (Brown & Robert, 2002; Hassan et al., 2021).

### **1.1.3. Reprodução**

A amêijoia japonesa é uma espécie gonocórica e as suas gónadas são representadas por um tecido difuso ligado ao sistema digestivo (Sladonja et al., 2011). Em populações naturais, a amêijoia japonesa atinge a primeira maturação sexual aos 20 mm, entre o

primeiro e terceiro ano de vida (Sladonja et al., 2011; Maia et al., 2021). Nos bivalves, a reprodução ocorre através da libertação de gâmetas masculinos (espermatozoides) e femininos (oócitos) diretamente para a água sendo a sua fecundação externa (Joaquim et al., 2008). A formação dos gâmetas nas gónadas, a oogénese nas fêmeas, e nos machos a espermatogénese, ocorrem nos folículos gonadais levando à produção de oócitos e espermatozoides maduros que são emitidos na época de desova. O estado de desenvolvimento das gónadas pode ser observado através de análises histológicas. A observação dos tecidos corados permitem classificar o estado de maturação dos indivíduos.

Na natureza a reprodução das amêijoas varia consoante as reservas energéticas, a temperatura e a localização geográfica (Delgado & Pérez-Camacho, 2007; Matias, 2013). Nas primeiras desovas o número de gâmetas pode ser reduzido e não terem viabilidade, sendo que a fecundidade e a fertilidade aumentam ao longo das posturas seguintes (Matias, 2013; Joaquim et al., 2018).

#### **1.1.4. Acondicionamento de reprodutores**

O acondicionamento de reprodutores é realizado com o objetivo manipular a maturação de indivíduos para obtenção de gâmetas de elevada qualidade e uma elevada viabilidade larvar. Durante este período, as condições de cultivo e a nutrição dos indivíduos são manipuladas para promover a gametogénese, a desova, o desenvolvimento larvar para a produção de juvenis de posterior transporte para os viveiros ou diretamente no mar (Joaquim et al., 2008; Matias, 2013). O acondicionamento de reprodutores tem a duração média de 30 a 40 dias a uma temperatura de 20 °C (Laing & Lopez-Alvarado, 1994). Ao atingirem a maturação, a desova em maternidades pode ser induzida por choque térmico, em alternativa recolhe-se os gâmetas por escarificação para realização de reprodução artificial através de protocolos de fertilização estabelecidos (Laing & Lopez-Alvarado, 1994; López-Alvarado, 2015). A condição ótima necessária para induzir uma reprodução artificial bem-sucedida em bivalves depende de fatores-chave endógenos e exógenos como a temperatura e a alimentação (Abbas et al., 2018).

#### **1.2. Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de cinco dietas (microalgas vivas e concentrados de microalgas) no acondicionamento de reprodutores de *R.*

*philippinarum* através da evolução da composição química (proteínas, glicogénio e lípidos) durante a maturação sexual.

## 2. Materiais e métodos

O trabalho laboratorial do presente estudo foi realizado no laboratório de Aquacultura do Edifício Cetemares do Politécnico de Leiria, em Peniche. As dietas a administrar às amêijoas, os inóculos de microalgas para a dieta de microalgas vivas assim como o meio de cultivo para microalgas foram cedidos pela Necton S.A.

### 2.1. Cultivo de microalgas

Realizou-se o cultivo de microalgas em regime semi-contínuo das espécies *Tetraselmis chui*, *Tisochrysis lutea* e *Skeletonema costatum* para a produção de alimento vivo, a fornecer aos reprodutores. Os cultivos foram iniciados em balões de 500 ml e procedeu-se a um *scale-up* até ao volume final em balões de 6 litros, para *T. chui* e *T. lutea* em carboys de 10 litros para *S. costatum*. De cada espécie de microalga foi feita uma cultura-mãe (*stock*). Os cultivos foram mantidos com meio Nutribloom<sup>®</sup> (Necton S.A., Olhão, Portugal) nas quantidades, indicadas pelo fornecedor, adequadas às necessidades de cada espécie. As densidades dos cultivos foram determinadas semanalmente através da contagem do número de células por mililitro com recurso a uma câmara de Neubauer e de um microscópio ótico (Zeiss, Axio Lab.A1). Os cultivos de *T. chui* e *T. lutea* tiveram início 6 semanas antes do cultivo de *S. costatum*.

### 2.2. Análise microbiológica

Realizaram-se análises microbiológicas semanais às culturas *stock* dos cultivos de microalgas durante as suas fases exponenciais, antes de efetuar a renovação de meio. As amostras foram inoculadas em placas de TSA Tryptic soy agar (Ph. Eur., USP, JP) suplementado com 1,5% de NaCl (TSA 1,5) e em TCBS Thiosulfate-Citrate-Bile-Salt Sucrose Agar (VWR CHEMICALS), em triplicado, numa câmara de fluxo laminar (Telstar, Bio II Advance 4) e incubadas numa estufa a 21 °C (MEMMERT, IPP 110) durante 48 horas.

### 2.3. Desenho experimental

Com a finalidade de observar a adaptação dos bivalves às dietas foram realizados dois ensaios preliminares (ensaio 1 e 2). As dietas testadas ao longo do trabalho foram:

**Dieta A:** microalgas vivas (*Tetraselmis chui*, *Tisochrysis lutea* e *Skeletonema costatum*) em proporções semelhantes às do produto comercial PhytoBloom<sup>®</sup> SHELLbreed administrada a 4% do peso seco dos animais;

**Dieta B:** dieta de bivalves em concentrado líquido Phytobloom® SHELLbreed (Necton S.A., Olhão, Portugal) administrada a 4% do peso seco dos animais;

**Dieta C:** dieta de bivalves em concentrado líquido piloto Phytobloom® SHELLbreed (Necton S.A., Olhão, Portugal) administrada a 4% do peso seco dos animais;

**Dieta D:** microalgas vivas (*Tetraselmis chui*, *Tisochrysis lutea* e *Skeletonema costatum*) em proporções iguais administrada a 4% do peso seco dos animais;

**Dieta E:** dieta piloto, em pó combinando microalgas e probióticos (Necton S.A., Olhão, Portugal).

O ensaio 1, com a duração de 12 dias, incluiu 3 dietas (A, B e C) sendo a dieta A, a dieta controlo. Este ensaio teve como objetivo avaliar a adaptação das amêijoas às dietas em concentrado líquido (dietas B e C) assim como estabelecer as dosagens das mesmas.

O ensaio 2, com a duração de 33 dias, incluiu 4 dietas (A, B, C e D) Este ensaio teve como objetivo avaliar a adaptação das amêijoas às dietas assim como estabelecer as dosagens das dietas em concentrado líquido (dietas B e C) e da nova dieta com diferente mistura de microalgas vivas (D).

Com base nos resultados obtidos nos ensaios 1 e 2 realizou-se o ensaio 3, com duração de 55 dias, onde foram incluídas 3 dietas (dietas A, B e E) cuja dieta A foi a dieta controlo com microalgas vivas, a dieta B um concentrado líquido comercial e a dieta E uma formulação piloto, em pó, combinando microalgas e probióticos.

### **Ensaio 1**

Foram distribuídos 14 indivíduos da espécie *R. philippinarum* em cada um dos 3 tanques cinzentos de PVC de 50 L, com arejamento, contendo no seu interior um cesto de rede (30x45 cm) com área de 1350 cm<sup>2</sup> e identificados como A1 (alimentados com a dieta A), A2 (alimentados com a dieta B) e A3 (alimentados com a dieta C). Durante este ensaio registaram-se diariamente parâmetros de água com recurso a uma sonda multiparamétrica (YSI, Professional Plus): temperatura (18,0±0,5°C), salinidade (33), pH (8,1±0,3), e percentagem de oxigénio dissolvido (78,21±3,9%). Eram observadas e registadas diariamente, a mortalidade e realizadas trocas de água de dois em dois dias e sempre que se verificou mortalidade. As fezes foram observadas diariamente e serviram como principal indicador de digestibilidade do alimento fornecido. Para tal, era feita

diariamente a recolha de dejetos do fundo do tanque e observação dos mesmos analisando visualmente a proporção de fezes e de pseudofezes em cada tanque.

### **Ensaio 2**

Foram distribuídos 160 indivíduos por 4 tanques cinzentos de PVC de 50 L, com arejamento, contendo no seu interior um cesto de rede (30x45 cm) com área de 1350 cm<sup>2</sup>. Os tanques foram identificados como A1 (alimentados com a dieta A), A2 (alimentados com a dieta B), A3 (alimentados com dieta C) e A4 (alimentados com dieta D). Durante este ensaio foram registados diariamente os parâmetros de água com recurso a uma sonda multiparamétrica (YSI, Professional Plus): temperatura ( $18,5 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ), salinidade (33), pH ( $7,8 \pm 0,2$ ) e percentagem de oxigénio dissolvido ( $78,5 \pm 4,7\%$ ). Foram observadas e registadas diariamente as fezes dos indivíduos e a mortalidade e realizadas trocas de água de dois em dois dias e sempre que se verificou mortalidade. As fezes foram observadas diariamente e serviram como principal indicador de digestibilidade do alimento fornecido e consistiu na recolha de dejetos do fundo do tanque e observação dos mesmos analisando visualmente a proporção de fezes e de pseudofezes em cada tanque.

Após a realização dos ensaios 1 e 2, com base nas observações da adaptação dos bivalves às dietas testadas, assim como à quantidade administrada, foram selecionadas as dietas A (microalgas vivas) e B (concentrado líquido) para realizar o ensaio 3. Tendo em conta o número de animais por tanque e de maneira a evitar a degradação da qualidade da água, no ensaio 3 as trocas de água foram realizadas diariamente.

### **Ensaio 3**

Antes de iniciar o ensaio, os indivíduos originários da Lagoa de Albufeira, Setúbal ( $38^\circ 33' 28'' \text{ N}$ ,  $9^\circ 08' 29'' \text{ O}$ ) foram submetidos a 7 dias de aclimatização. A aquisição dos reprodutores foi complicada devido à pouca disponibilidade no mercado. Este ensaio teve a duração de 55 dias, os 371 indivíduos da espécie *R. philippinarum* foram acondicionados em 9 tanques de PVC de 50 L com arejamento, contendo no seu interior um cesto de rede (30x45 cm) com área de 1350 cm<sup>2</sup>. Os três tratamentos foram realizados em triplicado, sob as condições de um sistema fechado com renovação de água diária, a uma temperatura de  $21,2 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidade de 32, pH de  $7,5 \pm 0,2$  e percentagem de oxigénio dissolvido de  $77,5 \pm 5,7\%$ .

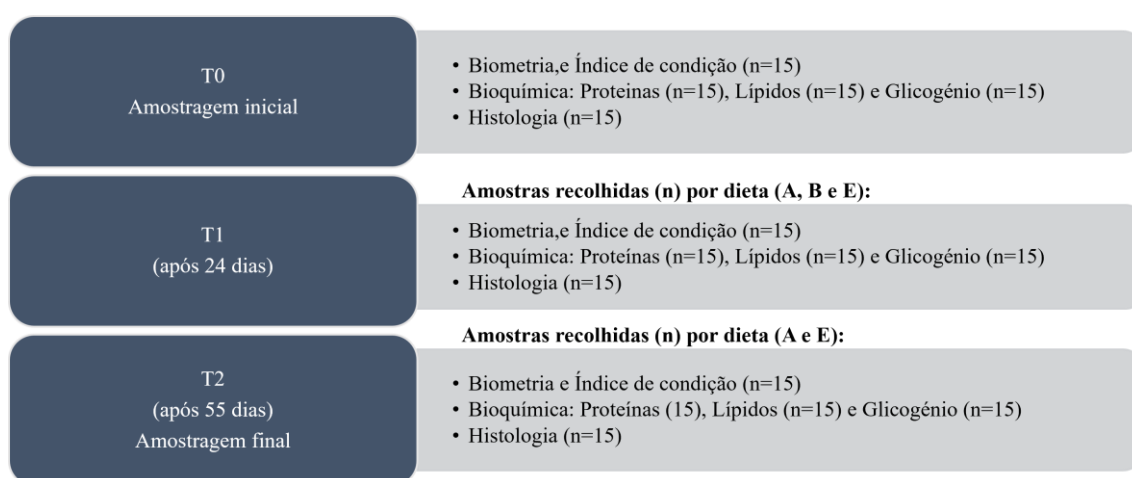
## **2.6. Rotinas diárias**

As rotinas diárias eram iniciadas com a verificação da ocorrência de mortalidade sendo retirados e feito o registo dos indivíduos mortos. De seguida era feita a análise visual da presença de fezes, pseudofezes e desperdício de alimento. Para tal, foi estabelecida uma escala quantitativa de 0 a 3, onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade. Depois era feita a limpeza dos tanques com água doce e uma esponja limpa de modo a remover totalmente os resíduos, de seguida eram enxaguados com água salgada e era feita a troca total da água. Com recurso a uma sonda multiparamétrica (YSI, Professional Plus) era medida e registada a temperatura, o pH, a salinidade e a percentagem de oxigénio dissolvido. Depois era preparado o alimento, sendo que para a preparação da dieta A (microalgas vivas), era colocada num copo de 5 L que se mantinha no Laboratório de Aquacultura com arejamento à temperatura ambiente. Para preparar a dieta B, com uma proveta, era medida a quantidade indicada pelo fabricante (0,30 ml por indivíduo) do concentrado líquido e filtrado com um crivo de 180  $\mu\text{m}$ . De seguida era diluído num volume de 2 L e reservado em câmara frigorífica a 4°C. Para a dieta C era pesada a quantidade indicada pelo fabricante (0,25g por indivíduo) numa balança analítica (Sartorius, TE124S), e depois diluída num gobelet de 1 L e deixada a hidratar por quinze minutos. Após o tempo de hidratação, o alimento era homogeneizado numa liquidificadora, filtrado através de um crivo de 150  $\mu\text{m}$  e mantido em câmara frigorífica a 4°C. A alimentação para as três dietas era fornecida duas vezes ao dia, de manhã 10:00h, após as rotinas e à tarde, às 18:00h.

## 2.7. Procedimentos analíticos

### 2.7.1. Plano de amostragem

Na figura 3 está representado o plano de amostragem. Para a amostragem T0, antes de se iniciar o ensaio, recolheram-se aleatoriamente 60 bivalves: 15 indivíduos para análise biométrica (peso, altura, largura e comprimento) e determinação do índice de condição, 15 indivíduos para análises bioquímicas (teor de proteína, glicogénio e lípidos) e 15 indivíduos para análise histológica. Após 24 dias foram retirados 15 bivalves de cada tratamento para o momento de amostragem T1 e após 55 dias foram retirados 15 bivalves de cada tratamento para o momento de amostragem T2.



**Figura 3** - Plano de amostragens (biometria, análise bioquímica e histologia) nos três momentos de amostragem (T0, T1 e T2) e número de indivíduos amostrados (n) por dieta.

### 2.7.2. Biometria

Com recurso a uma craveira, foi medida e registada a altura (A), a largura (L) e o comprimento (C) em centímetros de cada indivíduo. Depois, com uma balança analítica (Sartorius, TE124S) foram pesados e registado o peso individual.

### 2.7.3. Determinação do índice de condição

Os bivalves utilizados para recolha de dados biométricos foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação do índice de condição. Para calcular o índice de condição bivalves foram abertos, e colocados individualmente em estufa (Binder, FD115) a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Depois, foram pesados e registado o peso seco das valvas e da parte edível, separadamente. Depois, a parte edível de cada indivíduo foi colocada na mufla

(Nabertherm, B170) a 450 °C durante 24 horas. Depois de pesar e registrar o peso das cinzas foi calculado o índice de condição (IC) de acordo com Walne & Mann (1975):

$$IC = \frac{\text{Peso seco da carne (g)} - \text{Peso cinzas (g)}}{\text{Peso seco da concha (g)}} \times 100$$

#### **2.7.4. Análises bioquímicas**

A parte edível dos bivalves foi retirada e individualmente colocada em microtubos Eppendorf de 2 ml que se mantiveram a -20°C até ao seu processamento. Para este, foram homogeneizados com o homogeneizador de tecidos (IKA T18 Digital ultra-turrax, Scansci). Para cada indivíduo de cada tratamento, foi determinado, em duplicado: o teor de proteína, através do método de Lowry (1994), o teor de glicogénio, pelo homogeneizado seco (80°C durante 24 horas) usando a antrona como reagente (Viles & Silverman, 1949) e os lípidos totais extraíndo-se do material homogeneizado fresco com clorofórmio/metanol (Folch et al., 1957), e estimados por espectrofotometria após a adição de ácido sulfúrico concentrado (Marsh & Weinstein, 1966).

Para determinar o teor de proteína foi pesado entre 0,1900 e 0,2100g de homogeneizado para tubos de vidro de 8 ml com tampa. Para realizar a extração foi adicionado 500 µl de solução de sacarose ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e agitado 5 minutos em Stomacher (Stuart SIS00, Barloword Scientific, UK) a 130 rpm. Depois foi adicionado 4,5 ml de NaOH numa diluição de 1:100 (NaOH N/100) até perfazer um total de 5 ml e agitando cuidadosamente por inversão, foi deixado a repousar no frigorífico durante 30 minutos e depois filtrado através de um filtro de papel. Foi medido 200 µl do filtrado para um tubo de vidro, adicionado 4,8 ml NaOH N/100 para perfazer um total de 5 ml e agitado por inversão. Para a determinação da proteína foi retirado 300 µl para microtubos Eppendorf (em duplicado), preparados dois brancos com 300 µL de NaOH N/100 e cinco padrões com 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL e 50 µL de solução de albumina bovina (VWR). A solução de Sulfato de cobre alcalina (Merck) foi preparada e adicionado 1 ml às amostras, aos brancos e aos padrões. Depois foram agitados no vórtex durante 15 segundos e incubados a 37°C na estufa (Memmert UF110, Germany) durante 3 minutos. Foram adicionados 100 µl da solução de Folin-Ciocalteu (Merck) e agitados no vórtex durante 15 segundos. Foram incubados a 37°C durante 3 minutos e lida a absorvância a 750 nm contra o branco no espectrofotómetro (Thermo Scientific, Evolution 201).

Para determinar o teor de glicogénio foi pesado entre 0,8 e 1,1 mg do homogeneizado seco para um Eppendorf com tampa de rosca em duplicado cada amostra e foi adicionado 500 µL de KOH (VWR) a 33% a cada tubo. Os tubos foram colocados, tapados, num banho de água (Memmert, OB14) em ebulição a 100°C durante 15 minutos sendo agitados duas vezes durante o tempo do banho. Depois foram deixados a arrefecer e foram adicionados 25 µl de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR) saturado e foram ao vórtex. Foi adicionado 1 ml de etanol (Aga) e foram agitados cuidadosamente. Ficaram a repousar no frigorífico a 4°C durante 30 minutos até precipitar e depois centrifugados na centrífuga (5810R Eppendorf, Germany) durante 10 minutos a 3000 rpm. Foi decantado o sobrenadante e os tubos invertidos sobre papel. De seguida o precipitado foi dissolvido em 250 µL de água destilada, agitado no vórtex, e adicionado 500 µL de etanol e novamente agitado no vórtex. Foi deixado a precipitar durante 30 minutos no frigorífico a 4°C. Foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm e deixado a decantar o sobrenadante. Foi redissolvido o precipitado em 200 µL de água e depois agitado no vórtex.

Para a determinação do glicogénio foi realizada uma curva de calibração com sete padrões com 5, 10, 15, 20, 50, 100 e 200 µL de uma solução glicogénio (Fisher Scientific - Acros) (1mg/ml) e dois brancos com 200 µL de água destilada aos quais foi adicionado 1,5 ml de solução de antrona (Merck) e depois foram agitados no vórtex. as amostras foram colocadas em banho de água a 90°C durante 20 minutos e agitadas ao fim de 10 minutos. Foram deixadas a arrefecer à temperatura ambiente e foi feita a leitura no espectrofotómetro (Thermo Scientific, Evolution 201) a 620 nm.

Para determinar o teor de lípidos foram pesados 2 a 3 mg de homogeneizado, num papel de alumínio, numa balança de precisão (CPA225D Sartorius, Germany). Foram colocados num tubo com o auxílio de uma espátula ao qual foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio/metanol (2:1) e reservado durante 30 min no escuro à temperatura ambiente (20°C). Foi adicionado a cada amostra e padrões 200 µL da solução de NaCl a 0,7% e ficaram em repouso durante 15 minutos. Foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos e registado o volume da fase solvente. Foram retirados 500 µL da fase solvente, que se colocaram num tubo de ensaio de vidro Pyrex e depois num banho de água a 80°C, para remover o solvente, durante 30 minutos. Foram deixados a arrefecer sendo depois adicionado 1 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (CHEM-LAB) concentrado. Foram a incubar em estufa (Memmert UF110) a 200°C durante 15 minutos sendo depois deixados a arrefecer à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Foi adicionado cuidadosamente

1,5 ml de água destilada e de seguida agitados no vórtex. Foram novamente mantidos à temperatura ambiente durante 10 minutos e feita a leitura no espectrofotómetro (Thermo Scientific, Evolution 201) a 375 nm.

### 2.7.5. Análise histológica

A glândula digestiva de cada bivalve foi retirada e colocada em frascos com 10 ml de solução de Davidson durante 48 horas. Depois deste período foi substituída a solução, por álcool a 70%, mantendo as amostras desta forma até ao seu processamento. Os tecidos dos indivíduos foram colocados no processador de tecidos (Leica-TP 1020) e submetidos a um processo de desidratação com uma série de passagens em álcool de concentrações crescentes de modo a remover a água dos tecidos, de seguida foram imersos em xilol, para remoção do álcool, e por fim incorporados na parafina. Os cortes histológicos foram realizados no micrótomo (Sakura® AccuCut® SRM™ 200), com uma espessura de 7 µm. As lâminas com os cortes foram colocadas na estufa (Binder) a 35°C durante 24 horas. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas e fotografadas ao microscópico com câmara fotográfica (Leica DM 2000 LED; Leica MC 170 HD). As preparações histológicas foram observadas com uma objetiva de 10x e a cada indivíduo foi atribuído um estágio consoante a área predominante de tecido observado.

Segundo Gaspar (1996) e Maia et al. (2021), podem ser descritas as seguintes fases do desenvolvimento gonadal em *R. philippinarum*:

**Tabela 1** - Escala reprodutiva segundo Gaspar (1996) e Maia et al. (2021) para indivíduos da espécie *Ruditapes philippinarum*.

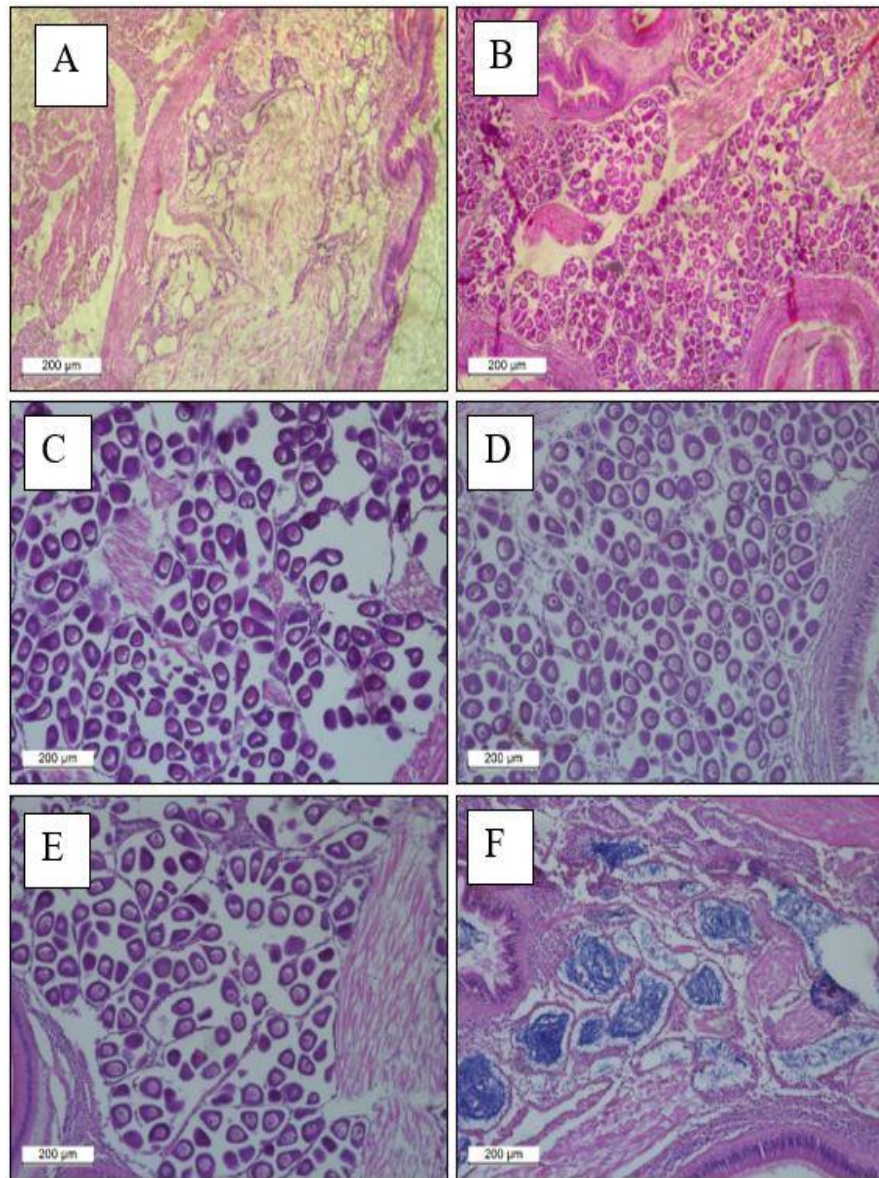
<b>Estádio</b>	<b>Descrição histológica</b>
<b>Repouso sexual (Fase 0)</b>	Caracterizado pela escassez e tamanho reduzido dos folículos gonadais dispersos na massa visceral. Tecido muscular e conjuntivo ocupa toda a zona desde a glândula digestiva ao pé. Não há evidencia de desenvolvimento gonadal. Sexo do individuo é indiferenciável.
<b>Gametogénese inicial (Fase I)</b>	Caraterizada pelo aumento de número e dimensão dos folículos e diminuição do tecido conjuntivo. Paredes foliculares tornam-se mais espessas e exibem células germinativas em diferentes fases de maturação e torna-se possível a distinção dos sexos. Os

	folículos e ácidos gonadais começam a aparecer em fêmeas e machos. Nas fêmeas estes aumentam de tamanho e aparecem cobertos com oócitos na fase de crescimento e nos machos com gâmetas imaturos (espermatogônias e espermatócitos).
<b>Gametogénesse avançada (Fase II)</b>	Caracterizada pelo aumento do diâmetro dos folículos e pela ausência quase total de tecido conjuntivo interfolicular. No interior dos folículos coexistem gâmetas em diferentes estados de maturação. No fim deste estágio, o oócito projeta-se do centro do lúmen, permanecendo preso, através do pedúnculo, A abundância de oócitos livres é igual aos que se encontram unidos a parede do folículo. Nos machos, a maioria dos ácidos encontra-se cheios de espermatídios e espermatozoides.
<b>Maturação (Fase III)</b>	Verifica-se a maturação da maioria, dos gâmetas. Nos oócitos maduros ocorre a ruptura do pedúnculo, e conseqüentemente, os oócitos, ocupam o interior folicular. Nos machos, os ácidos gonadais contem principalmente espermatozoides
<b>Desova (Fase IV)</b>	Caracteriza-se pela libertação dos gâmetas. À medida que a desova avança observa-se uma redução gradual das dimensões dos folículos e da densidade de gâmetas no seu interior. Alguns folículos poderão estar total ou parcialmente vazios. O tecido conjuntivo interfolicular é abundante.
<b>Pós-desova (Fase V)</b>	Abundante tecido conjuntivo interfolicular. Resíduos ocasionais de espermatozoides ou oócitos. Verifica-se um aumento acentuado do tecido conjuntivo interfolicular e a presença de hemócitos, que efetuam a lise <i>in situ</i> dos oócitos e espermatozoides residuais e de todo o material sexual não expelido.

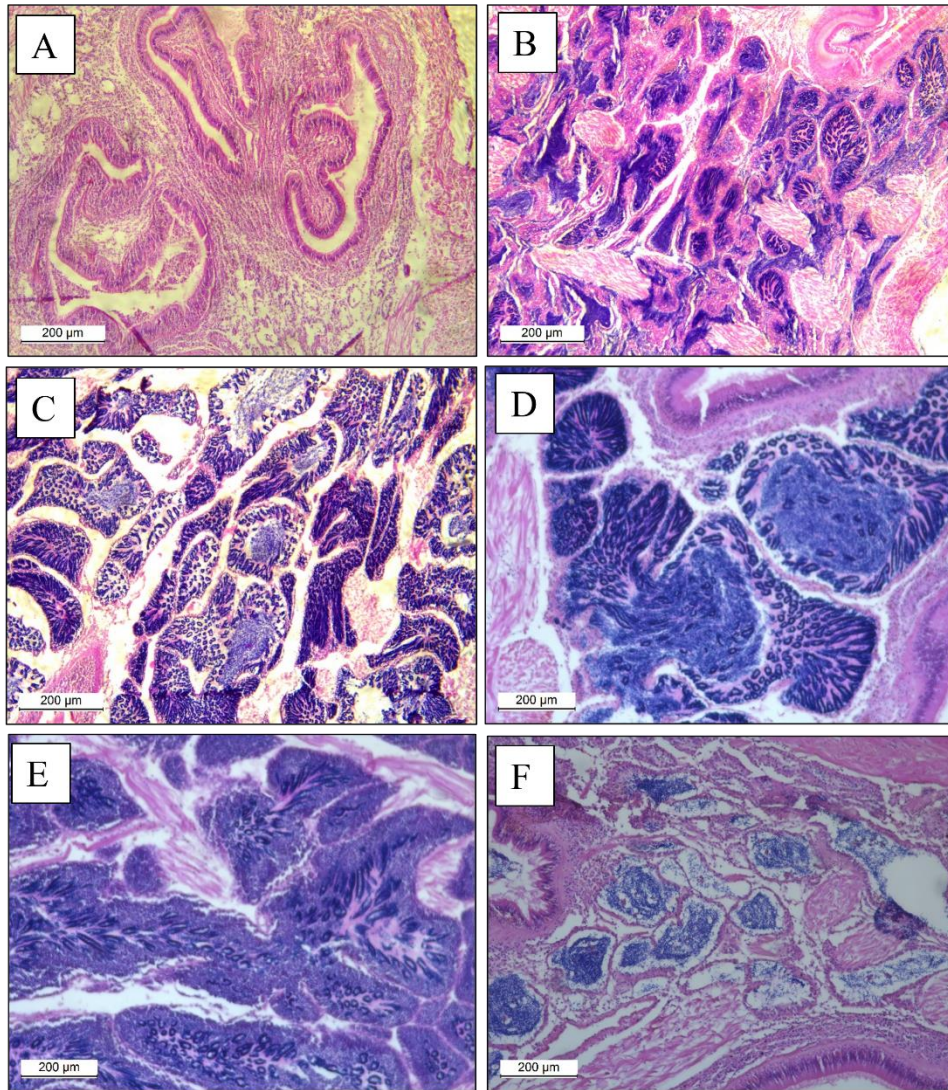
O índice gonadal (IG) foi determinado usando o método proposto por Seed (1976), com adaptação à escala reprodutiva.

$$IG = \frac{\sum \text{indivíduo em cada fase de maturação} \times \text{posição numérica}}{\text{Total de indivíduos por tratamento}}$$

Para cada fase de maturação da gónada foi atribuído um valor, sendo o Repouso sexual = 0, Gametogénese inicial = 3, Gametogénese avançada = 4, Maturação = 5, Desova = 2, Pós-desova = 1. O IG varia entre 0 (quando todos os indivíduos estão em repouso sexual) e 5 (quando todos os indivíduos estão na fase madura).



**Figura 4** - Microfotografias representativas dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas femininas de *Ruditapes philippinarum* (A-F) A - Repouso sexual; B - Gametogénese inicial; C - Gametogénese avançada; D - Maturação; E - Desova; F - Pós-desova.



**Figura 5** - Microfotografias representativas dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas masculinas de *Ruditapes philippinarum* (A-F) A - Repouso sexual; B – Gametogénese inicial; C - Gametogénese avançada; D – Maturação; E – Desova; F – Pós-desova.

### **2.7.6. Análise estatística**

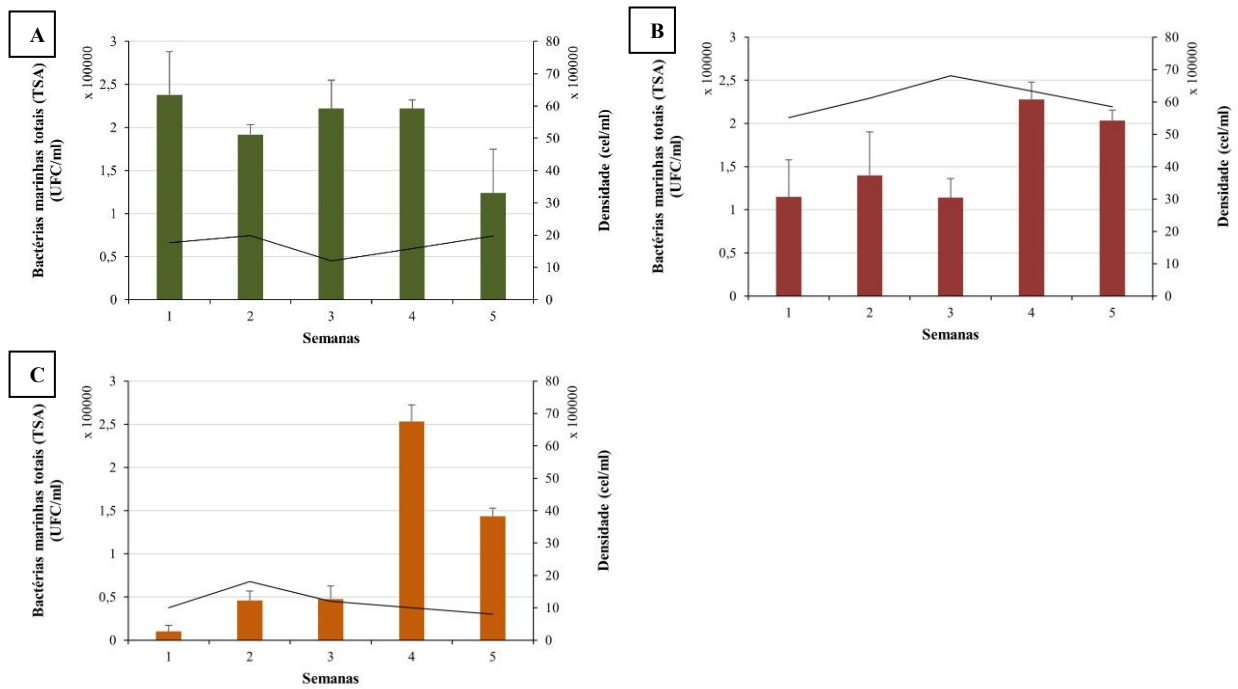
Os valores obtidos foram apresentados no formato de média  $\pm$  desvio padrão (DP) e normalizados com a função *Arcsine* sempre que estes se encontravam expressos em percentagem. No ensaio 3, para análise dos valores da biometria, índice de condição e composição bioquímica foram comparadas as médias entre os três momentos de amostragem para cada dieta (A, B e E).

Os valores do índice de condição, valores de peso obtidos para a análise biométrica e composição bioquímica (teor de proteínas, glicogénio e lípidos totais) foram analisados através de uma análise de variância unidirecional (One-way ANOVA). As diferenças estatísticas entre dietas e tempos de amostragem foram analisadas através de testes post hoc Tuckey de comparações múltiplas ( $P < 0,05$ ). O tratamento estatístico foi realizado com recurso ao software IBM SPSS Statistics 28.

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada em todos os cultivos de microalgas ao longo do tempo. As contagens obtidas, expressas em unidades formadoras de colónias (UFC) por ml, para cada uma das microalgas, estão registadas nos gráficos (Figura 6: A, B e C). Nos mesmos também estão assinaladas as densidades da cultura em número de células por ml (cel/ml). As culturas *stock* de *S. costatum* apresentaram as contagens microbiológicas mais elevadas ( $2,5 \times 10^5$  UFC/ml), seguidas da *T. chui* ( $2,3 \times 10^5$  UFC/ml) e *T. lutea* ( $2,2 \times 10^5$  UFC/ml) quando foi utilizado o meio TSA. Observou-se para *T. lutea* e *S. costatum*, um aumento à quarta semana. De um modo geral, os stocks de *T. chui* e *T. lutea* apresentaram um número total de bactérias mais elevado pelo facto de terem ido inoculados 6 semanas antes do stock de *S. costatum*, estado, como tal, expostos a contaminações por um período mais longo. A densidade da cultura *stock* de *T. chui* variou entre uma densidade mínima de  $1,20 \times 10^6$  cel/ml e uma densidade máxima  $1,99 \times 10^6$  cel/ml, a cultura de *T. lutea* entre  $5,51 \times 10^6$  cel/ml e  $6,8 \times 10^6$  cel/ml e a cultura de *S. costatum* entre  $1,81 \times 10^6$  cel/ml e  $8,08 \times 10^6$  cel/ml. A cultura em que se observou uma constância nos valores da densidade celular foi a cultura *T. lutea*. Não se observou crescimento em nenhuma das placas de TCBS em nenhum dos cultivos de microalgas.



**Figura 6** – Valores das contagens microbiológicas (média±DP, n=3) em meio TSA com 1,5% de NaCl e densidade celular (média, n=3) observadas nas culturas *stock* ao longo de 5 semanas: A) *Tetraselmis chui*; B) *Tisochrysis lutea* e C) *Skeletonema costatum*. Os resultados das contagens microbiológicas foram expressos em unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml) e os resultados da densidade expressos em densidade de células por ml (cel/ml).

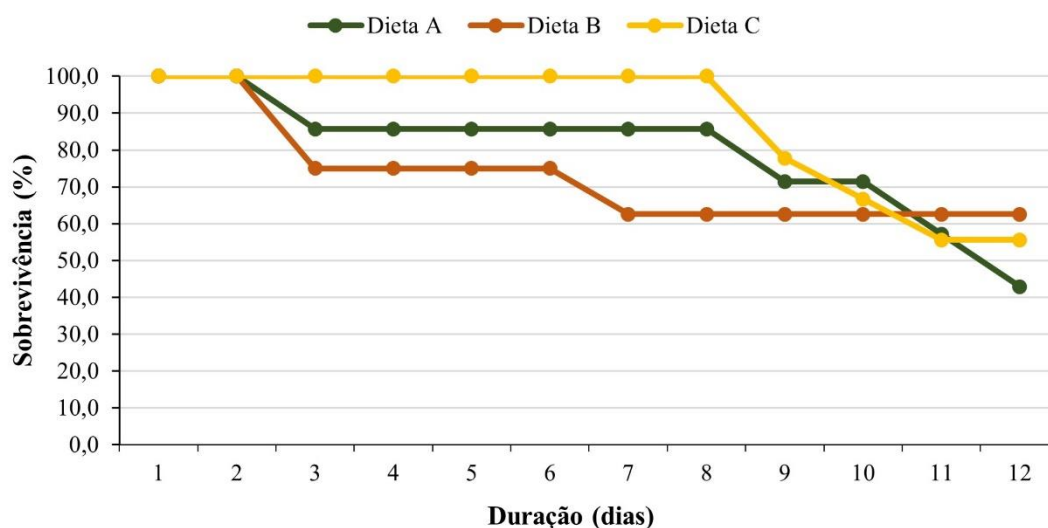
### **3.2. Ensaio 1**

Os indivíduos alimentados com a dieta A apresentaram consistentemente, fezes e ausência de alimento na água até ao fim do ensaio. Os indivíduos alimentados com a dieta B demonstraram um período de adaptação ao alimento, durante 5 dias. Este período foi caracterizado pelo desperdício de alimento evidente pela turbidez da água e pela presença de muitas pseudofezes, indicando que os indivíduos não estavam a digerir o alimento. Depois foi observada uma redução da presença de pseudofezes e diminuição da turbidez da água em comparação com o que se observou no início do ensaio. A partir do 6º dia até ao 12º dia, foi observada a presença de fezes e menor turbidez da água.

Os indivíduos alimentados com dieta C demonstraram uma melhor adaptação ao alimento e muito menos desperdício quando comparados com os indivíduos alimentados com a dieta B, até ao 5º dia, como indicado por serem sempre observadas mais fezes do que pseudofezes. O inverso aconteceu a partir do 7º dia, em que os indivíduos mostraram uma menor digestão do alimento, reduzindo significativamente a quantidade de fezes, apresentado mais pseudofezes e aumento da turbidez da água.

Foi observada ainda a presença de espuma na superfície da água dos tanques, nos tratamentos com dieta B e C sendo inicialmente removida com recurso a um camaroeiro. Porém, ao reduzir a dose de concentrado a quantidade de espuma diminuiu e, sem limpeza adicional, foi possível observar que desaparecia gradualmente ao longo do dia (Anexo 1).

Na figura 7 está registada a sobrevivência dos indivíduos durante o ensaio 1. Os indivíduos alimentados com a dieta A apresentaram uma diminuição na sua sobrevivência a partir do dia 3 (85,7%) mantendo-se estável até ao dia 8. Depois apresentaram um novo decréscimo, que se manteve até ao fim do ensaio sendo a dieta que apresentou menor sobrevivência final (42,9%). Os indivíduos alimentados com a dieta B apresentaram uma diminuição da sobrevivência para 75% até ao dia 3 passando para 62,5% ao dia 7, e depois permaneceu até ao final do ensaio, sendo a dieta que apresentou a maior sobrevivência. Os indivíduos alimentados com a dieta C apresentaram a maior sobrevivência (100%) durante os primeiros 8 dias do ensaio e depois um declínio até ao final do ensaio, dia 11 (55,6%).



**Figura 7** – Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e C (concentrado líquido piloto) durante 12 dias.

### 3.3. Ensaio 2

Os indivíduos alimentados com a dieta A apresentaram, ao longo dos 33 dias do ensaio, muitas fezes, ausência de pseudofezes ou desperdício de alimento e maior sobrevivência quando comparados com as restantes dietas.

Os indivíduos alimentados com a dieta B demonstraram um período de adaptação ao alimento de 7 dias (mais dois dias que no ensaio 1), sendo este período caracterizado pela presença de muitas pseudofezes, poucas fezes e decréscimo de sobrevivência (68%) que se manteve estável até ao fim do ensaio. Depois foi observada uma redução contínua da presença de pseudofezes, passando a ser possível observar algumas fezes e poucas pseudofezes, mantendo este comportamento até ao dia 20. Até ao fim do ensaio foram observadas poucas fezes.

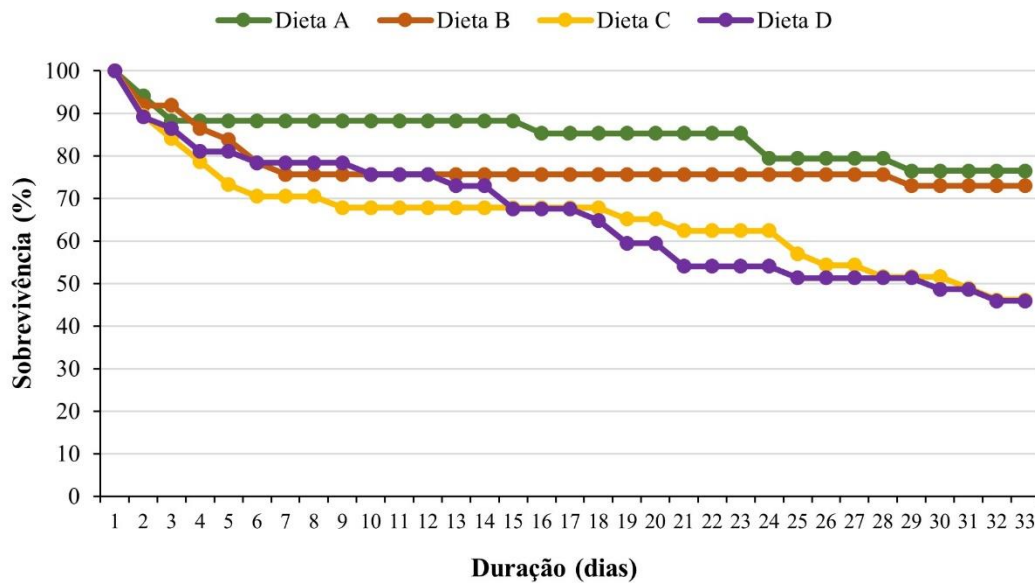
Os indivíduos alimentados com a dieta C demonstraram melhor digestibilidade do alimento quando comparados com a dieta B. Durante os primeiros 7 dias foram observadas muitas pseudofezes e apenas algumas fezes, após esse período houve uma redução das pseudofezes e a partir do 8º dia foi observada a presença de algumas fezes e ausência de pseudofezes. A partir do 26º dia e até ao final do ensaio foi observado um desperdício de alimento.

Os indivíduos alimentados com a dieta D apresentaram sempre muitas fezes ao longo dos 33 dias do ensaio. Até ao 5º dia foram observadas algumas pseudofezes tendo ocorrido uma redução até ao 13º dia, e não se tendo voltado a registar até ao final do ensaio. Entre o 3º e o 18º dia foi observado desperdício de alimento, apresentando a água uma cor esverdeada. Por esta razão foi ajustada a quantidade de alimento, com redução da quantidade de *T. chui* na dieta para 20%.

Na figura 8 apresenta-se a sobrevivência do ensaio 2, registada ao longo dos 33 dias. Os indivíduos alimentados com as dietas A e B apresentaram uma sobrevivência semelhante de 65% e 68%, respetivamente. Os indivíduos alimentados com a dieta A apresentaram uma sobrevivência relativamente estável durante os primeiros 15 dias do ensaio (65%) sendo observado depois um decréscimo. Os indivíduos alimentados com a dieta B apresentaram uma sobrevivência de 68% após a primeira semana que se manteve estável até ao fim do ensaio. Os indivíduos alimentados com a dieta C apresentaram uma sobrevivência de 60%, que se manteve estável durante a segunda e terceira semana, apresentando depois um decréscimo até ao final do ensaio (45%). Os indivíduos

alimentados com a dieta D apresentaram uma sobrevivência que foi decrescendo até ao final do ensaio (45%).

As dietas A (65%) e B (68%) apresentaram uma sobrevivência mais elevada relativamente às dietas C e D que apresentaram uma sobrevivência final mais baixa de 45%.



**Figura 8** - Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido), C (concentrado líquido piloto) e D (microalgas vivas em iguais proporções) durante 33 dias.

### **3.4. Ensaio 3**

Os indivíduos alimentados com dieta A apresentaram, poucas fezes nos primeiros dois dias do ensaio, passando depois a apresentar muitas fezes até ao último dia do ensaio. Durante o ensaio não se verificou a presença de pseudofezes nem desperdício de alimento.

Os indivíduos alimentados com a dieta B apresentaram, poucas fezes até ao 11º dia do ensaio, apresentando depois muitas fezes até ao fim do ensaio. Foram observadas pseudofezes apenas até ao 5º dia. Não foi observado desperdício de alimento. O ensaio com a dieta B terminou ao 24º dia.

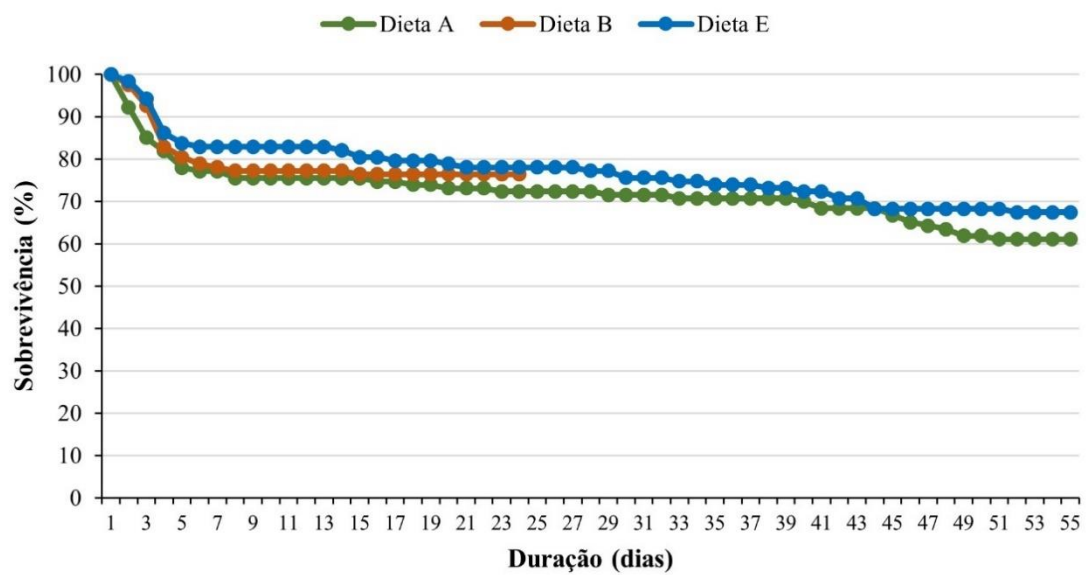
Os indivíduos alimentados com a dieta E apresentaram muitas fezes durante todo o ensaio, poucas pseudofezes até ao 21º dia do ensaio e apenas se observou desperdício de alimento até ao 5º dia.

Resumindo, quando comparadas as dietas A e B apresentaram um aumento na produção de fezes após um período inicial, enquanto a dieta E manteve uma elevada presença de fezes ao longo do ensaio. A presença de pseudofezes variou entre as dietas, sendo mais evidente na dieta B até ao 5º dia. Não houve desperdício de alimento nas três dietas, exceto nos primeiros dias nas dietas E e B.

Na figura 9 apresentam-se os dados da sobrevivência registada durante o ensaio 3. Os indivíduos alimentados com a dieta A apresentaram uma sobrevivência média de 77% no final da primeira semana do ensaio estabilizando-se até ao final da segunda semana onde começou a apresentar um declínio pouco acentuado, até ao 44º dia (68%) e depois um decréscimo até ao fim do ensaio (61%).

Os indivíduos alimentados com a dieta B apresentaram uma sobrevivência média de 78% no final da primeira semana de ensaio que se manteve estável até ao 24º dia, quando terminou o ensaio com esta dieta.

Os indivíduos alimentados com a dieta E apresentaram uma sobrevivência de 83% no final da primeira semana do ensaio, mantendo-se estável até ao 13º dia, onde começou a um decréscimo constante até ao final do ensaio (67%).

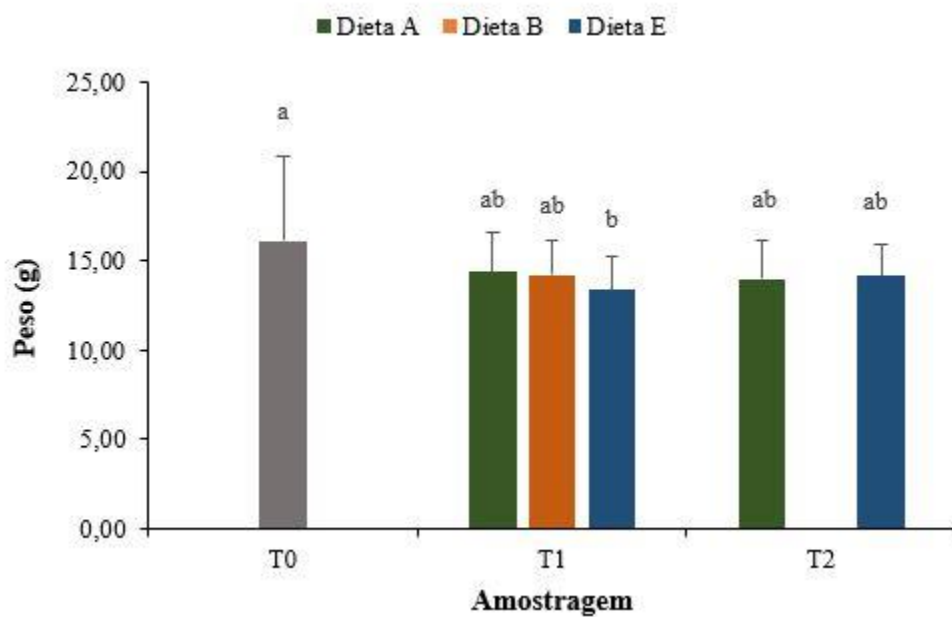


**Figura 9** - Representação gráfica da sobrevivência (%) dos indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e dieta E (pó piloto combinado com probióticos) durante 55 dias.

### 3.4.1. Biometria

O peso das amêijoas no início do ensaio (T0) foi significativamente mais elevado ( $16,09 \pm 4,74\text{g}$ ) do que o peso das amêijoas alimentadas com a dieta E na primeira amostragem ( $13,35 \pm 1,91\text{g}$ ), no entanto não foi significativamente diferente dos restantes tratamentos em ambos os períodos amostrados (T1 e T2) (Figura 10).

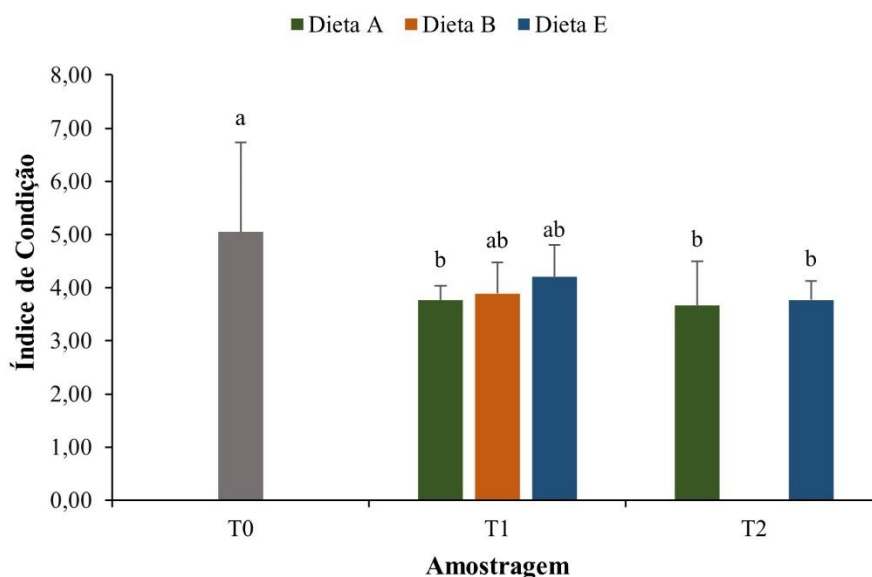
Foi avaliada a altura, largura e comprimento das valvas das amêijoas ao longo do ensaio. Foi possível verificar que não houve diferenças significativas entre as dietas ao longo de todo o ensaio em termos de altura ( $1,57 \pm 1,69\text{cm}$ ), largura ( $3,34 \pm 1,34\text{cm}$ ) e comprimento das valvas ( $2,41 \pm 2,81\text{cm}$ ).



**Figura 10-** Valores do peso em gramas (g) (média±DP, n=15) observados em indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio). As diferentes letras representam as diferenças significativas entre dietas ao longo do ensaio (One way ANOVA, post hoc Tukey,  $P < 0,05$ ).

### 3.4.2. Índice de condição

O índice de condição de reprodutores de amêijoas, foi avaliado ao longo do ensaio de condicionamento, com a duração de 55 dias, em que se testaram 3 dietas de microalgas, nomeadamente a Dieta A (mistura de microalgas vivas), a Dieta B (concentrado líquido de microalgas) e a Dieta E (dieta de microalgas em pó). Foi possível observar que o índice de condição dos animais no início do ensaio foi significativamente superior relativamente ao índice de condição dos animais alimentados com a Dieta A ao longo do ensaio, em ambas as amostragens (T1 e T2) e à dieta E no fim do ensaio (T2). No entanto, o índice de condição dos animais alimentados com as dietas B e E no primeiro ponto de amostragem não foi significativamente diferente do índice de condição inicial dos animais (T0) (Figura 11).



**Figura 11** - Valores do índice de condição (média±DP, n=15) observados em indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com a dieta A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio). Os resultados foram expressos em média. As diferentes letras representam as diferenças significativas entre dietas ao longo do ensaio (One way ANOVA, post hoc Tuckey,  $P < 0,05$ ).

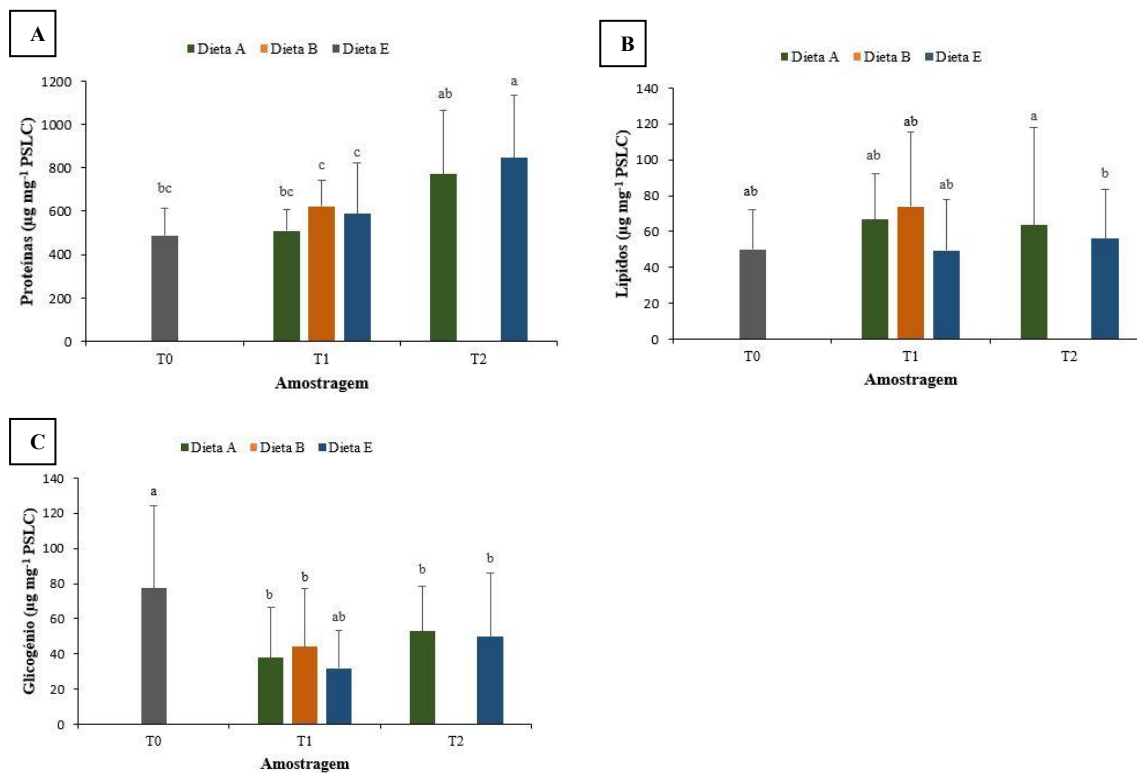
### 3.4.3. Análise bioquímica

O constituinte da massa corporal predominante das amêijoas acondicionadas e independentemente das dietas, foram as proteínas, seguidas dos lípidos totais e do glicogénio. A dieta E no final do acondicionamento (T2) revelou um nível de proteínas na massa corporal significativamente mais elevado ( $846,65 \pm 289,99 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) do que as amêijoas no início do ensaio ( $488,08 \pm 77,55 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) e nas dietas A

(508,42±101,04  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC), B (587,65±233,03  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC). O mesmo se observou relativamente à dieta E (771,723±295,24  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) na amostragem T1 (Figura 12A).

Os lípidos totais da massa corporal dos reprodutores acondicionados foram mais elevados na dieta A no na amostragem T2 (73,92±41,79  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC), sendo significativamente mais elevados do que os animais alimentados com dieta E no mesmo ponto (56,04±27,65  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC), no entanto não foi significativamente diferente nos restantes pontos de amostragem (Figura 12B).

O teor de glicogénio obtido, foi significativamente mais elevado na massa corporal das amêijoas, no início do acondicionamento (77,19±47,1565  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) relativamente a todos os pontos de amostragem exceto em relação à dieta E (52,77±25,79  $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) na amostragem T1 (Figura 12C).



**Figura 12** – Análise bioquímica de indivíduos de *Ruditapes philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio): A) Teor de proteína (média±DP, n=15), B) Teor de lípidos totais (média±DP, n=15), C) Teor de glicogénio (média±DP, n=15). Os resultados foram expressos em média ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC). As diferentes letras representam as diferenças significativas (One way ANOVA, post hoc Tuckey,  $P < 0,05$ ).

### 3.4.4. Análise histológica

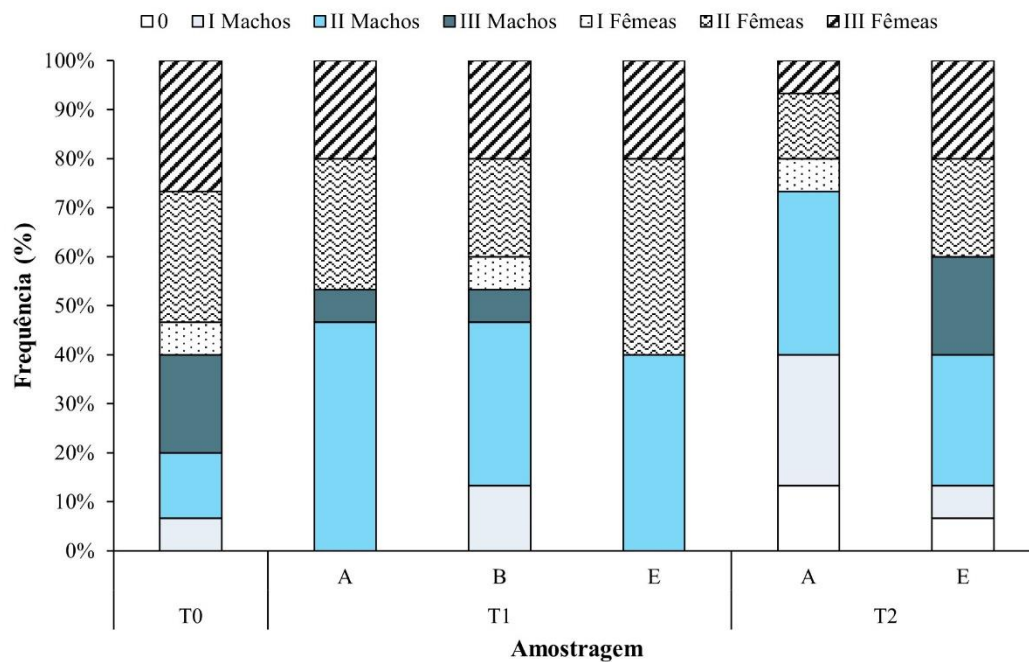
No início do ensaio (T0) observou-se que 13,3% dos indivíduos se encontravam no início da gametogênese (Fase I), 40% em gametogênese avançada (Fase II) e 46,7% maduros (Fase III) (Figura 13). O valor obtido para o IG foi 4,33 (Tabela 2).

**Tabela 3** – Valores do índice gonadal (IG) observados em indivíduos de *R. philippinarum* (n=15) acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio).

	T0	T1			T2	
		A	B	E	A	E
IG	4,33	4,27	4,07	4,20	3,20	4,07

No momento da amostragem T1 é observado que após o acondicionamento dos animais com a dieta A, 73,3% estavam em gametogênese avançada (Fase II) e 26,7% maduros (Fase III), com IG de 4,07 (Tabela 2). Os indivíduos amostrados da dieta B, 20% estavam no início da gametogênese (Fase I), 53,3% em gametogênese avançada (Fase II) e 26,7% maduros (Fase III) apresentando um IG de 4,07 (Tabela 2). No mesmo momento de amostragem, dos animais acondicionados com a dieta E, 80% estavam em gametogênese avançada (Fase II) e 20% maduros com IG de 4,20 (Tabela 2).

No final do acondicionamento os animais da dieta A, tinham 13,3% em repouso sexual (Fase 0), 33,3% no início da gametogênese (Fase I), 46,7% em gametogênese avançada (Fase II) e 6,7% maduros (Fase III) com IG de 3,20 (Tabela 2). Após o acondicionamento com a dieta E foi observado que 6,7% se encontravam em repouso sexual (Fase 0), 6,7% no início da gametogênese (Fase I), 46,7% em gametogênese avançada (Fase II) e 40,0% maduros (Fase III) com IG de 4,07 (Tabela 2).



**Figura 13** - Variações do desenvolvimento das gónadas dos machos e fêmeas de *R. philippinarum* acondicionados com as dietas A (microalgas vivas), B (concentrado líquido) e E (pó piloto) nos momentos de amostragem T0 (início do ensaio), T1 (24 dias de ensaio) e T2 (55 dias de ensaio) onde 0- Repouso sexual; I – Gametogénese inicial; II - Gametogénese avançada e III – Maturação.

#### 4. Discussão

A produção de bivalves em aquacultura está diretamente relacionada com a qualidade do alimento fornecido (Helm et al., 2004). Com as atuais técnicas de acondicionamento, a produção de microalgas pode representar 30% a 40% dos custos de produção (Soudant et al., 2000; Supono et al., 2023). A formulação de dietas focadas na nutrição de reprodutores com o objetivo de melhorar a qualidade reprodutiva tem sido o foco de vários estudos em espécies de bivalves produzidas em aquacultura (Robert & Trintignac, 1997; Marshall et al., 2010; Supono et al., 2023). No presente estudo foram testadas cinco dietas, das quais, a partir de ensaios preliminares foram selecionadas para o ensaio de acondicionamento, uma dieta controlo à base de microalgas vivas (dieta A), um concentrado líquido de microalgas (dieta B) e uma dieta em pó piloto combinando microalgas com probióticos (dieta E) com o objetivo de avaliar a sua eficiência na maturação de reprodutores de amêijoja japonesa (*R. philippinarum*).

O controlo microbiológico das microalgas utilizadas para alimentar os animais, é essencial pois a presença de bactérias potencialmente patogénicas pode afetar negativamente o crescimento das microalgas e dos bivalves (Pienkos & Darzins, 2009; Le Chevanton et al., 2013). Bactérias Gram-negativas dos géneros *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* e *Vibrio* estão associadas a declínios na densidade celular (Ashen & Goff, 2000), podem comprometer a sobrevivência dos animais e a segurança alimentar do produto final (Le et al., 2020). As culturas que apresentaram um maior número de bactérias foram os *stocks* de *Tetraselmis chui* e *Tisochrysis lutea*, nomeadamente os que foram mantidos durante mais tempo, antes de iniciar o controlo microbiológico. Pela observação dos gráficos parece existir uma relação inversa entre a densidade celular e o número total de bactérias, podendo evidenciar o envelhecimento da cultura *stock* por diminuição do número de células e aumento do número de bactérias. Estes resultados sugerem que estes cultivos tiveram maior exposição a fatores de contaminação em comparação com *S. costatum* que apenas à quarta semana atingiu valores semelhantes aos restantes *stocks*. Os cultivos foram mantidos em regime semi-contínuo, permanecendo assim expostos a riscos de contaminação biológica diária. Steinrucken et al. (2023) estudaram as comunidades bacterianas em distintas culturas de microalgas sujeitas a diferentes condições de crescimento, tendo concluído que os géneros de microalgas têm comunidades bacterianas próprias e que estas são afetadas

pelo meio de cultura. Estes autores demonstraram que as comunidades bacterianas permaneceram estáveis durante o cultivo de diferentes estirpes de *Phaedactylum* sp. Este trabalho reforça a importância de um controlo microbiológico das diferentes microalgas produzidas e demonstra que as comunidades bacterianas associadas também são muito distintas. Muito embora no presente estudo não se tenha feito uma identificação das bactérias que se desenvolveram, o facto de não ter havido crescimento bacteriano nas placas inoculadas em TCBS, meio de cultura específico para bactérias da família *Vibrionacea*, dos quais fazem parte um grande número de patógenos, revela a qualidade microbiológica dos cultivos para alimentação de bivalves. As densidades celulares dos cultivos mostraram uma relação inversa à contagem de microrganismos em meio TSA. O aumento do número de bactérias sugere que os cultivos estavam a envelhecer nos últimos dias de amostragem (Kokou et al., 2012).

Com base nos resultados obtidos nos dois primeiros ensaios, seleccionaram-se as dietas A (microalgas vivas) e B (concentrado líquido) para a realização do ensaio 3 e introduziu-se a dieta E (pó piloto combinado com probióticos). Delgado & Pérez-Camacho (2007) efetuaram um estudo sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento gonadal de reprodutores de *R. decussatus* e *R. philippinarum* alimentados com uma dieta monoespecífica de *I. galbana* clone T-ISO tendo concluído que *R. philippinarum* tem uma necessidade de maior quantidade de microalga *I. galbana* quando acondicionados a 18°C comparativamente com 14°C. Foram realizados outros estudos para o acondicionamento de reprodutores de bivalves, quando se utilizaram microalgas vivas como por exemplo, Matias et al. (2016), Anjos et al. (2017), Supono et al. (2023). No estudo de Matias et al. (2016) efetuado com reprodutores de *R. decussatus*, foram utilizadas duas dietas monoespecíficas, de *Isochrysis galbana* clone T-ISO e *Chaetoceros calcitrans* e uma mistura de *I. galbana* clone T-ISO e *C. calcitrans*. Os melhores resultados foram obtidos quando foi administrada uma dieta com a mistura das duas microalgas. Nalguns destes estudos, foi observado que uma maior proporção de diatomáceas como *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans* e *Thalassiosira pseudonana*, apresentam resultados que coincidem com as necessidades nutricionais do acondicionamento de reprodutores de *R. decussatus*. Em alternativa ao alimento vivo, também podem ser utilizadas dietas formuladas à base de algas inertes no acondicionamento de reprodutores. Um estudo de Rato et al. (2018) testou o efeito de quatro dietas com diferentes proporções da mistura de microalgas (*Skeletonema costatum*,

*Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* clone T-ISO) e pó de macroalgas (*Ulva rigida*) e foi observado que a substituição até 25% por pó de macroalgas revelou um efeito positivo no acondicionamento de reprodutores de *C. gigas*. Num estudo de Willer & Aldridge (2020) foi testado o efeito de três dietas à base de *Schizochytrium sp* no acondicionamento de reprodutores de *O. edulis* com uma dieta composta pela microalga viva, outra apenas com microencapsulados e a terceira uma combinação de ambas. A dieta composta por microencapsulados teve um melhor resultado na maturação das gónadas das ostras. López-Carvalho et al. (2017) avaliaram o efeito de três dietas nomeadamente: uma mistura de microalgas vivas de *T. lutea* e *C. calcitrans*, duas dietas de microalgas vivas enriquecidas com hidratos de carbono tendo concluído que as dietas microalgas vivas suplementadas com fontes ricas em hidratos de carbono são uma alternativa viável para a gametogénese de reprodutores *Modiolus capax* a elevadas temperaturas assim como aumentam as reservas de hidratos de carbono em tecidos somáticos a elevadas temperaturas (26°C).

Para o presente estudo foram utilizadas três dietas com composição semelhantes, nomeadamente microalgas vivas, um concentrado líquido e uma dieta em pó piloto combinada com probióticos. Foi possível verificar que houve uma perda gradual do índice de condição dos animais ao longo do tempo da experiência relativamente ao índice de condição inicial ( $5,05 \pm 1,69$ ). Este facto foi evidente no final do acondicionamento onde a dieta em pó piloto (dieta E) apresentou um valor do IC de  $3,77 \pm 0,35$ , e a dieta com microalgas vivas (dieta A) um valor de  $(3,67 \pm 0,83)$ . Estes valores são inferiores quando comparados com os valores obtidos no estudo de Matias et al. (2013) onde foram utilizadas duas dietas monoespecíficas, de *Isochrysis galbana* clone T-ISO (agora denominada *Tisochrysis lutea*) e *Chaetoceros calcitrans* e uma mistura de *I. galbana* clone T-ISO com *C. calcitrans* em reprodutores de *R. decussatus* sendo o valor do IC observado superior a 10,0. No estudo de Rato et al. (2018) em *C. gigas* sobre o efeito de quatro dietas com diferentes proporções da mistura de microalgas (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans* e *I. galbana* clone T-ISO) e pó de macroalga (*Ulva rigida*) em diferentes proporções. No início do acondicionamento o valor do índice de condição foi de  $4,57 \pm 1,37$ . No final da experiência a dieta composta por pó de macroalgas apresentou o valor mais baixo ( $1,96 \pm 0,27$ ) enquanto a dieta composta apenas por microalgas vivas apresentou o valor mais elevado ( $5,53 \pm 0,72$ ). Adicionalmente, é necessário salientar que os animais quando foram adquiridos já vinham com um nível de maturação avançado

levando à possibilidade de ocorrência de uma desova no início do ensaio. Este facto justifica assim o decréscimo observado no índice de condição como anteriormente descrito por Abbas (2018), que associa esta diminuição do IC ao elevado consumo energético envolvido no processo da reprodução. Um estudo conduzido por Vázquez et al. (2021) revelou que variações na aclimatização gera repercussões na performance reprodutiva e sobrevivência dos animais, uma vez que reprodução em si implica stress fisiológico e, desta forma, qualquer stress exógeno adicional durante o período reprodutivo comprometerá a sobrevivência, pois os animais têm de alocar uma grande quantidade de energia para suportar os custos de manutenção. No presente estudo a dieta em pó piloto combinada com probióticos (dieta E) (4,07) promoveu melhor desenvolvimento gonadal nos reprodutores de *R. philippinarum*, em contraste, a dieta com microalgas vivas (dieta A) (3,20) apresentou menor desenvolvimento gonadal.

No início do ensaio foi possível observar que uma grande parte dos animais (46,7%) se encontrava em estado de gametogénese avançada (fase III), o que dificultou a observação direta do efeito das dietas na maturação gonadal. No T2 observou-se que na dieta A, apenas 6,7% dos animais se encontrava em fase de gametogénese avançada (fase III), enquanto na dieta E, para a mesma fase, o valor foi de 40%. Mais uma vez sugerem uma melhor performance da dieta E na maturação das gónadas evidenciando possuir um carácter nutritivo adequado para os reprodutores. Num estudo de Matias et al. (2016) onde foram utilizadas duas dietas monoespecíficas, de *I. galbana* clone T-ISO e *C. calcitrans* e uma mistura de *I. galbana* clone T-ISO com *C. calcitrans* com reprodutores de *R. decussatus*, 60% dos animais apresentaram estados de desenvolvimento gonadal avançada (fase IV). O mesmo sucesso no desenvolvimento das gonadal foi observado num estudo de Rato et al. (2018), onde reprodutores de *C. gigas* alimentados com pó de macroalgas (*Ulva rigida*) apresentaram desenvolvimento gonadal ao fim de 11 semanas de acondicionamento onde foi observado que 75% dos animais estavam na fase de maturação (III) e 25% em fase de gametogénese avançada (II). Estes resultados evidenciam que dietas formuladas com microalgas produzidas industrialmente tiveram impacto no desenvolvimento das gonadas dos bivalves. Porém o presente estudo teve a duração de oito semanas, sendo necessário um período mais longo em condições otimizadas para avaliar de forma mais robusta o efeito das dietas selecionadas, nomeadamente a dieta controlo (dieta A), o concentrado líquido (dieta B) e a dieta em pó piloto combinada com probióticos (dieta E).

A condição gonadal é refletida a nível bioquímico e está diretamente relacionada com a alimentação (Abbas et al., 2018). Nos bivalves as proteínas possuem maioritariamente uma função estrutural, porém podem ser utilizadas como reserva de energia em situações de stress nutricional ou durante a maturação gonadal. Estas podem também servir de reserva energética na ausência de reservas de hidratos de carbono (Marshall et al., 2010; Matias et al., 2013). No presente estudo observou-se um aumento do teor proteico ao longo do ensaio sendo o valor mais elevado ( $846,65 \pm 289,99 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) registado na dieta E no final do ensaio (T2). O valor do teor de proteína mais baixo ( $488,08 \pm 77,55 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) foi registado no início do ensaio (T0). O mesmo padrão foi observado num estudo de Anjos et al. (2017) onde foram testadas quatro dietas de diferentes misturas de microalgas: *Pavlova lutheri* com *I. galbana* clone T-ISO, *P. lutheri*, T-ISO com *S. costatum* e *S. costatum*, e *C. calcitrans* com *P. lutheri*, *S. costatum* e *C. calcitrans* no acondicionamento de reprodutores de *C. angulata* e observou-se valor do teor de proteína variou entre  $242,21 \pm 64,00 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC e  $459,38 \pm 91,20 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC observado nos animais alimentados com uma mistura de *P. lutheri*, T-ISO e *S. costatum*. Num estudo de Rato et al. (2018) mesmo comportamento crescente nos valores proteicos foi observado em *C. gigas* quando alimentados com quatro dietas com diferentes proporções da mistura de microalgas (*S. costatum*, *C. calcitrans* e *I. galbana* clone T-ISO) e pó de macroalga (*Ulva rigida*) onde os valores variaram entre  $151,57 \pm 10,32 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC e  $549,46 \pm 61,20 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC. No presente estudo, os dados sugerem que o aumento do teor de proteína nos animais foi impulsionado pelo decréscimo do teor de glicogénio uma vez que no início do ensaio estes se encontravam na fase de desova e que obriga a um gasto energético. Desta forma, no futuro a dieta em pó poderá ser modificada de forma a reduzir o seu conteúdo em proteína e aumentando o seu conteúdo em lípidos.

Relativamente ao teor de glicogénio este apresentou valor mais elevado ( $77,19 \pm 47,15 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) no início do ensaio (T0). Nos bivalves adultos o glicogénio é a reserva energética mais importante uma vez que esta pode ser usada como fonte de energia para o crescimento e pode simultaneamente ser armazenada em células específicas como uma reserva energética para a gametogénese e desenvolvimento gonadal (Matias et al. 2013). Desta forma, a redução dos hidratos de carbono durante o processo de formação de gâmetas é observada como uma característica comum em *R. decussatus*, o que destaca a importância significativa do uso das suas reservas energéticas para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Matias et al. 2016). Num estudo realizado por Matias et al. (2016) em que

foram testadas o efeito de quatro dietas no acondicionamento de *R. decussatus* foi observado o mesmo padrão nos valores do teor de glicogénio nos animais acondicionados com a dieta à base de *I. galbana* clone T-ISO com *C. calcitrans*, onde no início do acondicionamento os animais apresentaram  $7,50 \pm 0,64\%$  do peso seco, seguido de um decréscimo para  $4,35 \pm 0,61\%$  à quarta semana e no final do ensaio observou-se um aumento para  $8,10 \pm 0,35\%$  onde os elevados valores no teor do glicogénio foram registados num período em que os animais se encontravam na sua maioria na fase de gametogénese avançada. O mesmo padrão foi observado no presente trabalho onde o valor mais elevado do teor de glicogénio foi registado no início do acondicionamento onde os animais apresentavam numa fase de desenvolvimento gonadal avançada.

Relativamente ao teor de lípidos totais estes apresentaram o valor mais elevado ( $63,47 \pm 54,76 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) com a dieta A no final do ensaio. O valor mais baixo ( $49,28 \pm 28,61 \mu\text{g mg}^{-1}$  PSLC) foi registado com a dieta E no mesmo período. Estes dados sugerem que a dieta A possuía um teor lipídico adequado para acondicionamento dos reprodutores, uma vez que estes possuem um papel fundamental na produção dos gâmetas pois são essenciais para o organismo do reprodutor durante o processo da gametogénese e na própria formação dos gâmetas sendo que espermatozoides e oócitos apresentam grande composição lipídica (Albentosa et al., 2007). O mesmo foi observado por Matias et al. (2016), num estudo que comparou o efeito dietas com diferentes composições de microalgas, onde se verificou que uma dieta à base de *I. galbana* clone T-ISO e *C. calcitrans* produziu um elevado teor lipídico na massa visceral dos reprodutores ( $10,69 \pm 0,50\%$  do peso seco) onde estes apresentavam a condição ideal para desovar. Consequentemente, a acumulação de lípidos observada nos reprodutores de *R. philippinarum* do presente trabalho não apresentaram um padrão dentro do padrão normal de acondicionamento de reprodutores de amêijoas.

Em resumo, foi possível observar neste estudo, apesar da diminuição do índice de condição (que foi comum a todas as dietas) uma boa performance da dieta experimental em pó piloto combinada com probióticos comparativamente com as microalgas vivas.

A utilização de dietas de microalgas produzidas industrialmente para aquacultura de bivalves, tal como as que foram utilizadas na presente tese, contribuem para a redução da produção de microalgas em aquacultura o que pode promover a otimização dos recursos e metodologias aplicadas neste setor de produção animal. A utilização destas dietas em maturação de bivalves é particularmente relevante uma vez que a recolha de pós-

larvas/juvenis de bivalves para aquacultura em ambiente natural se encontra em declínio devido às alterações climáticas. Neste sentido, atualmente há uma necessidade crescente de produção de animais em maternidade através da reprodução de bivalves. A eficiente maturação de bivalves com dietas de microalgas formuladas especificamente para esta aplicação é essencial para o desenvolvimento deste setor de aquacultura.

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo enfatizam o sucesso do condicionamento dos reprodutores de amêijoas quando alimentados com dietas formuladas com microalgas produzidas industrialmente. Através da evolução da composição química e análise considerou-se que a dieta em pó piloto combinada com probióticos (dieta E) teve influência positiva na maturação das gónadas dos reprodutores de *R. philippinarum*. Apesar dos animais alimentados com a dieta controlo à base de microalgas vivas terem apresentado um teor lipídico superior na sua massa visceral aos animais alimentados com a dieta em pó, esta não promoveu melhor desenvolvimento gonadal. A aquisição dos animais já numa fase madura e as condições do cultivo pode ter influenciado a ocorrência de uma desova no início do ensaio uma vez que estes apresentaram um decréscimo no índice de condição. O mesmo pode ser concluído através da diminuição observada no teor de glicogénio em todas as dietas na amostragem T1. Assim sendo, no futuro devem ser realizados novos ensaios com estas dietas e antes do ensaio sujeitar os animais a temperaturas reduzidas de forma a regredir o seu estado gonadal a níveis basais de forma a avaliar de forma mais conclusiva o efeito das dietas na maturação gonadal dos animais.

Em estudos futuros seria interessante avaliar o comportamento das dietas utilizadas no presente trabalho durante um período mais longo uma vez que o concentrado líquido foi testado por um curto período e apresentou os valores nutricionais mais elevados das três dietas assim como analisar a composição bioquímica das dietas a testar. Adicionalmente sugere-se que sejam testadas também dietas compostas por alimento vivo e inerte, em diferentes proporções, de modo a averiguar o impacto da combinação das diferentes dietas no condicionamento dos reprodutores.



## 6. Referências

- Abidli, S., Zaidi, S., Ben Younes, R., Lahbib, Y., & Trigui El Menif, N. (2023). Impact of polyethylene microplastics on the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia): examination of filtration rate, growth, and immunomodulation. *Ecotoxicology*, 32(6), 746–755.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U., & Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 241–249.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Fernández-Reiriz, M., & Labarta, U. (2002). Wheatgerm flour in diets for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, spat. *Aquaculture*, 212(1–4), 335–345.
- Anjos, C., Baptista, T., Joaquim, S., Mendes, S., Matias, A. M., Moura, P., Simões, T., & Matias, D. (2017). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research*, 48(7), 3859–3878.
- Ashen, J. B., & Goff, L. J. (2000). Molecular and Ecological Evidence for Species Specificity and Coevolution in a Group of Marine Algal-Bacterial Symbioses. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3024–3030.
- Bald, J., Siquin, A., Borja, A., Caill-Milly, N., Duclercq, B., Dang, C., & de Montaudouin, X. (2009). A system dynamics model for the management of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Bay of Arcachon (France). *Ecological Modelling*, 220(21), 2828–2837.
- Bidegain, G., & Juanes, J. A. (2013). Does expansion of the introduced Manila clam *Ruditapes philippinarum* cause competitive displacement of the European native clam *Ruditapes decussatus*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 44–52.
- Bordignon, F., Trocino, A., Rossetti, E., Zomeño, C., Pascual, A., Birolo, M., Llorens, S. M., & Xiccato, G. (2021). Effect of stocking density on growth and survival of juvenile Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in suspended lanterns in a

- North Italian lagoon. *Aquaculture Reports*, 20, 100719.
- Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M. T., & Ventosa, A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the Causative Agent of the Brown Ring Disease Affecting Cultured Clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2), 480–484.
- Brown, M., & Robert, R. (2002). Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207(3–4), 289–309.
- Camacho, P., Salinas, J. M., Fuertes, C., & Delgado, M. (2004). Preparation of Single Cell Detritus from *Laminaria saccharina* as a Hatchery Diet for Bivalve Mollusks. *Marine Biotechnology*, 6(6), 642–649.
- 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.
- Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., Chen, P., & 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.
- Chiesa, S., Nonnis Marzano, F., Minervini, G., De Lucrezia, D., Baccarani, G., Bordignon, G., Poli, I., Ravagnan, G., & Argeese, E. (2011). The invasive Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: Population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fisheries Research*, 110(2), 259–267.
- Coughlan, B. M., Moroney, G. A., Pelt, F. N. A. M. van, O'Brien, N. M., Davenport, J., & O'Halloran, J. (2009). The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 58(11), 1680–1684.
- Delgado, M., & Pérez-Camacho, A. (2007). Comparative study of gonadal development *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Scientia Marina*, 71(3), 471–484.
- Dias, E., Chainho, P., Barrocas-Dias, C., & Adão, H. (2019). Food sources of the non-

- indigenous bivalve *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) and trophic niche overlap with native species. *Aquatic Invasions*, 14(4), 638–655.
- Matias, D. C. C. (2013). *Bases Biológicas e Ambientes para a Optimização da Produção de Amêijoas-boa Ruditapes decussatus (Linnaeus, 1758)*.
- Carvalho, F. B., Cabral, S., Lino, J. C., Gaspar, M., Angélico, M., Ramajal, J. & Chainho, P. (2020). *Invasão à vista nos estuários do Tejo e Sado*.
- Gaspar, M. (1996). *Bivalves do litoral oceânico algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pescaria dos mananciais de interesse económico: aplicação à gestão dos recursos*.
- Gui, Y., Zamora, L., Dunphy, B. J., & Jeffs, A. G. (2016). Evaluation of the formulated diet MySpat for feeding hatchery-reared spat of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791). *Aquaculture Research*, 47(12), 3907–3912.
- Hassan, M. M., Parks, V., & Laramore, S. (2021). Assessment of microalgae concentrate as diet for hard clam, *Mercenaria mercenaria*, larvae. *Aquaculture Nutrition*, 27(6), 1871–1879.
- Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*.
- Hendriks, I. E., van Duren, L. A., & Herman, P. M. . (2003). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 199–213.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., & Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520–1527.
- Laing, I., & Lopez-Alvarado, J. (1994). Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). In *Aquaculture and Fisheries Management* (Vol. 25).
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O., & Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3), 212–222.
- Le, T. S., Southgate, P. C., O'Connor, W., Abramov, T., Shelley, D., V. Vu, S., &

- Kurtböke, D. İ. (2020). Use of Bacteriophages to Control *Vibrio* Contamination of Microalgae Used as a Food Source for Oyster Larvae During Hatchery Culture. *Current Microbiology*, 77(8), 1811–1820.
- Loor, A., Bossier, P., & Nevejan, N. (2021). Dietary substitution of microalgae with the *Saccharomyces cerevisiae* mutant, Δmnn9, for feeding Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) juveniles. *Aquaculture*, 534, 736253.
- López-Alvarado, J. (2015). Effect of broodstock diets on biochemical composition and larval growth of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). ~ 23 ~ *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 3(1), 23–27.
- López-Carvallo, J. A., Saucedo, P. E., Rodríguez-Jaramillo, C.,órdova, Á. I. C.-C., García-Corona, J. L., & Mazón-Suástegui, J. M. (2017). Carbohydrate-Rich Diets Meet Energy Demands of Gametogenesis in Hatchery-Conditioned Mussels (*Modiolus capax*) at Increasing Temperatures. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 649–657.
- Maia F., Barroso C., & Gaspar M. (2021). *Ciclo reprodutivo, índice de condição e tamanho de primeira maturação sexual da ameijoia-japonesa Ruditapes philippinarum (Adams & Reeve, 1850) na ria de Aveiro, 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.
- Martinez, G., Leiva, G. E., Navarro, J. M., & Aguilera, C. (2000). Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1), 67–83.
- Martini, A., Aguiari, L., Capoccioni, F., Martinoli, M., Napolitano, R., Pirlo, G., Tonachella, N., & Pulcini, D. (2023). Is Manila Clam Farming Environmentally Sustainable? A Life Cycle Assessment (LCA) Approach Applied to an Italian *Ruditapes philippinarum* Hatchery. *Sustainability*, 15(4), 3237.
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A. M., & Leitão, A. (2016). Reproductive effort of the European clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): influence of different diets and temperatures. *Invertebrate Reproduction & Development*, 60(1), 49–58.

- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M., & Marin, M. G. (2013). Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), 34–40.
- Paillard, C., Jean, F., Ford, S. E., Powell, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., & Flye-Sainte-Marie, J. (2014). A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *Journal of Sea Research*, 91, 15–34.
- Parisi, G., Centoducati, G., Gasco, L., Gatta, P. P., Moretti, V. M., Piccolo, G., Roncarati, A., Terova, G., & Pais, A. (2012). Molluscs and echinoderms aquaculture: biological aspects, current status, technical progress and future perspectives for the most promising species in Italy. *Italian Journal of Animal Science*, 11(4), e72.
- Parwadani Aji, L. (2011). The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves. In *Makara Journal of Science* (Vol. 15, Issue 1).
- Pienkos, P. T., & Darzins, A. (2009). The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(4), 431–440.
- Pires, D. S. (2018). *Produção de Moluscos Bivalves e Fatores de Risco Associados*.
- Rahmani, A., Delavat, F., Lambert, C., Le Goic, N., Dabas, E., Paillard, C., & Pichereau, V. (2021). Implication of the Type IV Secretion System in the Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease Affecting the Manila Clam *Ruditapes philippinarum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
- Rato, A., Joaquim, S., Matias, A. M., Roque, C., Marques, A., & Matias, D. (2022). The Impact of Climate Change on Bivalve Farming: Combined Effect of Temperature and Salinity on Survival and Feeding Behavior of Clams *Ruditapes decussatus*. *Frontiers in Marine Science*, 9.
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, T. G., Martins, Z. E., Guedes, A. C., Pereira, L. F., Machado, J., Matias, A. M., Gonçalves, J. F. M., Vaz-Pires, P., Magnoni, L. J., Ozório, R. O. A., & Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*.

- Robert, R., Luis Sánchez, J., Pérez-Parallé, L., Ponis, E., Kamermans, P., & O'mahoney, M. (2013). A glimpse on the mollusc industry in Europe. In *Aquaculture Europe* (Vol. 38, Issue 1).
- Robert, R., & Trintignac, P. (1997). Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources*, *10*(5), 315–327.
- Saucedo, P. E., González-Jiménez, A., Acosta-Salmón, H., Mazón-Suástegui, J. M., & Ronsón-Paulín, J. A. (2013). Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture*, *392–395*, 113–119.
- Sobral, P., & Widdows, J. (1997). Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, *34*(12), 992–1000.
- Sorokin, I., & Giovanardi, O. (1995). Trophic characteristics of the Manila clam (*Tapes philippinarum* Adams and Reeve). In *ICES J. mar. Sci* (Vol. 52).
- Soudant, P., Sanles, M. V., Quere, C., Le Coz, J. R., Marty, Y., Moal, J., Samain, J. F., & Sorgeloos, P. (2000). The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, *184*(3–4), 315–326.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96.
- Supono, S., Mugica, M., Spreitzenbarth, S., & Jeffs, A. (2023). Potential for Concentrated Microalgae as Replacement Diets for Juvenile Green-Lipped Mussels, *Perna canaliculus*. *Aquaculture Research*, *2023*, 1–9.
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 11–31.
- Vázquez, E., Woodin, S. A., Wethey, D. S., Peteiro, L. G., & Olabarria, C. (2021). Reproduction Under Stress: Acute Effect of Low Salinities and Heat Waves on Reproductive Cycle of Four Ecologically and Commercially Important Bivalves. *Frontiers in Marine Science*, *8*.
- Willer, D., & Aldridge, D. C. (2017). Microencapsulated diets to improve bivalve

shellfish aquaculture. *Royal Society Open Science*, 4(11), 171142.

Zhu, Y., Liao, K., Tian, J., Liu, Y., Xu, J., Liu, X., Zhang, L., & Yan, X. (2022). Substitution of microalgae with microcapsule diet for two bivalve species, manila clam *Ruditapes philippinarum* and razor clam *Sinonovacula constricta*. *Aquaculture Reports*, 22, 100991.

## 7. Anexos

**Anexo 1** - Observações das fezes (F), pseudofezes (Pf), desperdício (D) registadas numa escala quantitativa de 0 a 3, (onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade) e quantidade de alimento fornecido em ml (Q) em indivíduos de *R. philippinarum* alimentados com 4 dietas diferentes (A, B e C).

Dias	Tanque A1 (dieta A)				Tanque A2 (dieta B)				Tanque A3 (dieta C)			
	F	Pf	D	Q (ml)	F	Pf	D	Q (ml)	F	Pf	D	Q (ml)
1	3	0	0	1110	0	3	3	20	2	2	2	20
2	3	0	0	950	1	3	3	20	2	2	1	20
3	3	0	0	950	2	2	3	20	2	1	1	20
4	3	0	0	950	2	2	3	20	2	1	1	20
5	3	0	0	950	2	1	2	20	2	1	0	100
6	3	0	0	950	2	1	1	20	1	1	3	100
7	3	0	0	950	3	1	1	20	1	3	1	20
8	3	0	0	800	3	1	1	10	1	3	1	10
9	3	0	0	800	3	1	1	10	1	3	1	10
10	3	0	0	800	3	1	0	10	1	3	1	10
11	3	0	0	800	3	1	0	10	1	3	2	10
12	3	0	0	640	3	1	0	20	1	3	0	10

**Anexo 2** - Observações das fezes (F), pseudofezes (Pf), desperdício (D) registadas numa escala quantitativa de 0 a 3, (onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade) e quantidade de alimento fornecido em mL (Q) em indivíduos de *R. philippinarum* alimentados com 4 dietas diferentes (A, B, C e D).

Dia	A1 – Dieta A			A2 – Dieta B			A3 – Dieta C			A4 – Dieta B		
	F	Pf	D	F	Pf	D	F	Pf	D	F	Pf	D
1	2	0	0	2	3	0	2	3	0	3	2	0
2	3	0	0	2	3	0	2	3	0	3	2	0
3	3	0	0	2	3	0	2	3	0	3	2	1
4	3	0	0	2	2	0	2	2	0	3	2	1
5	3	0	0	2	2	0	2	2	0	3	2	1
6	3	0	0	2	1	0	2	2	0	3	3	1
7	3	0	0	2	1	0	2	1	0	3	1	1
8	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	1
9	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	0
10	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	1
11	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	1
12	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	1
13	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	1	1
14	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	0
15	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	1
16	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	1
17	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	1
18	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	1
19	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	0
20	3	0	0	2	1	0	2	0	0	3	0	0
21	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
22	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
23	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
24	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
25	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
26	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
27	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
28	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
29	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
30	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
31	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
32	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0
33	3	0	0	2	0	0	2	0	1	3	0	0

**Anexo 3.1** - Observações das fezes (F), pseudofezes (Pf) e desperdício (D) registadas numa escala quantitativa de 0 a 3, (onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade) em indivíduos de *R. philippinarum* alimentados com a dieta A.

**Dieta A**

Dia	A1			A2			A3		
	F	Pf	D	F	Pf	D	F	Pf	D
1	2	0	0	2	0	0	2	0	0
2	2	0	0	2	0	0	3	0	0
3	3	0	0	3	0	0	3	0	0
4	3	0	0	3	0	0	3	0	0
5	3	0	0	3	0	0	3	0	0
6	3	0	0	3	0	0	3	0	0
7	3	0	0	3	0	0	3	0	0
8	3	0	0	3	0	0	3	0	0
9	3	0	0	3	0	0	3	0	0
10	3	0	0	3	0	0	3	0	0
11	3	0	0	3	0	0	3	0	0
12	3	0	0	3	0	0	3	0	0
13	3	0	0	3	0	0	3	0	0
14	3	0	0	3	0	0	3	0	0
15	3	0	0	3	0	0	3	0	0
16	3	0	0	3	0	0	3	0	0
17	3	0	0	3	0	0	3	0	0
18	3	0	0	3	0	0	3	0	0
19	3	0	0	3	0	0	3	0	0
20	3	0	0	3	0	0	3	0	0
21	3	0	0	3	0	0	3	0	0
22	3	0	0	3	0	0	3	0	0
23	3	0	0	3	0	0	3	0	0
24	3	0	0	3	0	0	3	0	0
25	3	0	0	3	0	0	3	0	0
26	3	0	0	3	0	0	3	0	0
27	3	0	0	3	0	0	3	0	0
28	3	0	0	3	0	0	3	0	0
29	3	0	0	3	0	0	3	0	0
30	3	0	0	3	0	0	3	0	0
31	3	0	0	3	0	0	3	0	0
32	3	0	0	3	0	0	3	0	0
33	3	0	0	3	0	0	3	0	0
34	3	0	0	3	0	0	3	0	0
35	3	0	0	3	0	0	3	0	0
36	3	0	0	3	0	0	3	0	0
37	3	0	0	3	0	0	3	0	0
38	3	0	0	3	0	0	3	0	0

39	3	0	0	3	0	0	3	0	0
40	3	0	0	3	0	0	3	0	0
41	3	0	0	3	0	0	3	0	0
42	3	0	0	3	0	0	3	0	0
43	3	0	0	3	0	0	3	0	0
44	3	0	0	3	0	0	3	0	0
45	3	0	0	3	0	0	3	0	0
46	3	0	0	3	0	0	3	0	0
47	3	0	0	3	0	0	3	0	0
48	3	0	0	3	0	0	3	0	0
49	3	0	0	3	0	0	3	0	0
50	3	0	0	3	0	0	3	0	0
51	3	0	0	3	0	0	3	0	0
52	3	0	0	3	0	0	3	0	0
53	3	0	0	3	0	0	3	0	0
54	3	0	0	3	0	0	3	0	0
55	3	0	0	3	0	0	3	0	0

**Anexo 3.2** - Observações das fezes (F), pseudofezes (Pf) e desperdício (D) registadas numa escala quantitativa de 0 a 3, (onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade) em indivíduos de *R. philippinarum* alimentados com a dieta B.

**Dieta B**

Dia	B1			B2			B3		
	F	Pf	D	F	Pf	D	F	Pf	D
1	2	1	0	2	1	0	2	0	0
2	2	1	0	2	0	0	2	0	0
3	2	1	0	2	1	0	2	1	0
4	2	1	0	2	1	0	2	1	0
5	2	0	0	2	0	0	2	1	0
6	2	0	0	2	0	0	2	0	0
7	2	0	0	2	0	0	2	0	0
8	2	0	0	2	0	0	2	0	0
9	2	0	0	2	0	0	2	0	0
10	2	0	0	2	0	0	2	0	0
11	2	0	0	2	0	0	2	1	0
12	3	0	0	3	0	0	3	0	0
13	3	0	0	3	0	0	3	0	0
14	3	0	0	3	0	0	3	0	0
15	3	0	0	3	0	0	3	0	0
16	3	0	0	3	0	0	3	0	0
17	3	0	0	3	0	0	3	0	0
18	3	0	0	3	0	0	3	0	0
19	3	0	0	3	0	0	3	0	0
20	3	0	0	3	0	0	3	0	0
21	3	0	0	3	0	0	3	0	0
22	3	0	0	3	0	0	3	0	0
23	3	0	0	3	0	0	3	0	0
24	3	0	0	3	0	0	3	0	0

**Anexo 3.3** - Observações das fezes (F), pseudofezes (Pf) e desperdício (D) registadas numa escala quantitativa de 0 a 3, (onde 0 - ausência, 1 – pouca quantidade, 2 – alguma quantidade e 3 – muita quantidade) em indivíduos de *R. philippinarum* alimentados com a dieta E.

### Dieta E

Dia	E1			E2			E3		
	F	Pf	D	F	Pf	D	F	Pf	D
1	3	1	1	3	1	1	3	2	2
2	3	1	0	3	1	0	3	1	0
3	3	2	0	3	2	0	3	2	0
4	3	2	0	3	2	0	3	2	0
5	3	2	0	3	2	0	3	1	0
6	3	1	0	3	1	0	3	1	0
7	3	1	0	3	1	0	3	1	0
8	3	1	0	3	1	0	3	1	0
9	3	1	0	3	1	0	3	1	0
10	3	1	0	3	1	0	3	1	0
11	3	1	0	3	1	0	3	1	0
12	3	1	0	3	0	0	3	1	0
13	3	1	0	3	1	0	3	2	0
14	3	1	0	3	1	0	3	1	0
15	3	1	0	3	0	0	3	1	0
16	3	0	0	3	0	0	3	1	0
17	3	1	0	3	0	0	3	1	0
18	3	0	0	3	0	0	3	0	0
19	3	1	0	3	0	0	3	1	0
20	3	0	0	3	0	0	3	1	0
21	3	0	0	3	0	0	3	1	0
22	3	0	0	3	0	0	3	0	0
23	3	0	0	3	1	0	3	0	0
24	3	0	0	3	0	0	3	1	0
25	3	0	0	3	0	0	3	0	0
26	3	0	0	3	0	0	3	0	0
27	3	0	0	3	0	0	3	0	0
28	3	0	0	3	0	0	3	0	0
29	3	0	0	3	0	0	3	0	0
30	3	0	0	3	0	0	3	0	0
31	3	0	0	3	0	0	3	0	0
32	3	0	0	3	0	0	3	0	0
33	3	0	0	3	0	0	3	0	0
34	3	0	0	3	0	0	3	0	0
35	3	0	0	3	0	0	3	0	0
36	3	0	0	3	0	0	3	0	0
37	3	0	0	3	0	0	3	0	0
38	3	0	0	3	0	0	3	0	0
39	3	0	0	3	0	0	3	0	0

40	3	0	0	3	0	0	3	0	0
41	3	0	0	3	0	0	3	0	0
42	3	0	0	3	0	0	3	0	0
43	3	0	0	3	0	0	3	0	0
44	3	0	0	3	0	0	3	0	0
45	3	0	0	3	0	0	3	0	0
46	3	0	0	3	0	0	3	0	0
47	3	0	0	3	0	0	3	0	0
48	3	0	0	3	0	0	3	0	0
49	3	0	0	3	0	0	3	0	0
50	3	0	0	3	0	0	3	0	0
51	3	0	0	3	0	0	3	0	0
52	3	0	0	3	0	0	3	0	0
53	3	0	0	3	0	0	3	0	0
54	3	0	0	3	0	0	3	0	0
55	3	0	0	3	0	0	3	0	0