



**Variação da concentração bacteriana no meio de cultivo de
linguado branco – *Solea senegalensis* Kaup, 1858 – por
intermédio da acção de filtração do invertebrado *Sabellaria
alveolata* Linnaeus, 1767**

Ângela Rita Franco Sousa

[2013]



**Variação da concentração bacteriana no meio de cultivo de
linguado branco – *Solea senegalensis* Kaup, 1858 – por
intermédio da acção de filtração do invertebrado *Sabellaria
alveolata* Linnaeus, 1767**

Ângela Rita Franco Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação da Mestre Teresa Baptista

[2013]



Título: Variação da concentração bacteriana no meio de cultivo de linguado branco – *Solea senegalensis* Kaup, 1858 – por intermédio da acção de filtração do invertebrado *Sabellaria alveolata* Linnaeus, 1767

Copyright © Ângela Rita Franco Sousa

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2013

“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/trabalho de projecto/relatório de estágio 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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Dedicatória e Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que de forma decisiva contribuíram para a realização/concretização deste trabalho

À professora Mestre Teresa Baptista, pelos conselhos e orientação disponibilizada.

À professora Doutora Susana Mendes, pela disponibilidade e assistência concedida.

A todos os professores da escola superior de Turismo e Tecnologias do mar de Peniche que de algum modo manifestaram a sua vontade em ajudar.

Aos meus pais, irmão e madrinha, pela força, presença e motivação que sempre me acompanha.

À Tânia e à Filipa, pela companhia e espírito de entreajuda.

A todos aqueles que directa ou indirectamente me ajudaram a tornar este trabalho possível, o meu Muito Obrigada!

Dedico esta dissertação aos meus Pais, Irmão e Madrinha por tornarem menos difícil o que nem sempre é fácil.

Resumo

Portugal dispõe de factores naturais favoráveis ao desenvolvimento do sector aquícola muito para além do que se regista actualmente. Para fazer frente a esta situação, é importante para o crescimento do mercado optar pela diversificação de cultivos, produzindo novas espécies como o linguado branco, *Solea senegalensis*. Este cultivo tem uma incidência de patologias de origem bacteriana muito significativa, estando a vibriose mencionada entre as principais patologias associadas. O *Vibrio harveyi* está entre as principais espécies de *Vibrio* associadas a prejuízos na produção aquícola. A água do meio envolvente tem sido apontada como principal via de transmissão da vibriose causada por diferentes espécies de *Vibrio*. Este facto realça a importância em salvaguardar a qualidade da água de cultivo, aliada à crescente necessidade de aplicar medidas alternativas, nomeadamente profiláticas, no controlo de doenças em aquacultura.

Neste estudo, a aplicação de um biofiltro formado por poliquetas filtradoras da espécie *Sabellaria alveolata*, teve como objectivo testar a capacidade das mesmas na diminuição da concentração bacteriana, presente num sistema de produção de linguado branco. Pretendeu-se também averiguar a existência de alguma relação entre esta variação e a mortalidade de indivíduos *S. senegalensis*.

Utilizando uma concentração bacteriana $>10^8$ (LD₅₀), foi induzida a infecção nos linguados do sistema de cultivo, tendo-se utilizado circuitos com e sem biofiltro. Avaliou-se a taxa de mortalidade no cultivo, bem como o teor bacteriano na água dos diferentes circuitos, sendo eles o circuito infectado sem biofiltro, infectado com biofiltro e respectivos circuitos controlo.

A mortalidade registada foi reduzida, no entanto foram apresentadas diferenças estatisticamente significativas entre os circuitos controlo isto é, sem adição de bactéria (C1 e C2). Nos circuitos onde foi introduzido *V. harveyi*, a presença do biofiltro não demonstrou diferenças estatisticamente significativas na mortalidade registada.

Com as análises microbiológicas realizadas à água de cultivo ao longo do período de ensaio, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na variação da concentração bacteriana, nos circuitos onde se encontrava presente a poliqueta, não sendo possível relacionar a presença do biofiltro com uma diminuição no teor bacteriano presente na água de cultivo.

As análises moleculares realizadas aos linguados amostrados indicaram a presença de *V.harveyi* nos tecidos de linguado não infectado. As poliquetas foram também sujeitas a análise molecular, demonstrando a ausência de *V. harveyi*.

Histologicamente foram observadas células de tecido de linguado sem danos aparentes, ou qualquer indício de patologia associada. A água de cultivo foi analisada por técnicas de microbiologia, não tendo sido verificadas diferenças estatisticamente significativas nas unidades formadoras de colónias contabilizadas ao longo do tempo.

Estes resultados levaram à hipótese de um primeiro contacto entre os juvenis de linguado utilizados e a espécie bacteriana *V. harveyi*, o que de facto foi confirmado pelo local de aquisição dos juvenis. Deste modo sugere-se que os resultados obtidos tenham se devam ao desenvolvimento de um factor de defesa imune adaptativa com capacidade para induzir a resistência bacteriana observada.

A eficiência da filtração bacteriana pela poliqueta foi evidenciada através do registo de mortalidade obtido em circuitos sem infecção bacteriana. Microbiologicamente, a carga bacteriana evidenciada ao longo do tempo não permitiu uma associação entre a variação da mesma com a presença/ausência do biofiltro. No entanto, seria importante prosseguir este estudo aplicando técnicas que permitam obter resultados mais precisos, como técnicas de PCR.

Palavras-chave: *Vibrio harveyi*; *Solea senegalensis*; *Sabellaria alveolata*; Biofiltração, Resistência.

Abstract

Portugal has natural favorable factors to the development of aquaculture far beyond what is currently being explored. To fight back this situation is important to make the market grow by expanding the cultivation of new species like sole, *Solea senegalensis*. But this species has a high bacterial pathology incidence, with vibrio being one of the most relevant diseases observed. *Vibrio harveyi* is one of the main causes of death in aquaculture, with the water being the most likely mean of transmission. Due to this fact, there's a need to implement more prophylactic measures, which enhances the importance of maintaining the water quality.

In this study, the application of a biofilter composed by polychaete worms, the filter feeding *Sabellaria alveolata*, aimed to test the ability of the variation of the same bacterial concentration present in the production system of sole. It is also intended to ascertain the existence of any relationship between this variation and mortality of *S. senegalensis*.

Using a bacterial concentration $> 10^8$ (LD₅₀), infection was induced in the culture system by varying the presence of the biofilter. With this, was evaluated mortality rate obtained in cultivation and bacterial growth in water of the different circuits, more precisely, the circuit infected without biofilter, the circuit infected with a biofilter and their controls..

Molecular analyzes performed to sole samples indicted the presence of *V. harveyi* in the uninfected soles. The polychaetes were also subjected to molecular analysis, demonstrating the absence of *V. harveyi*.

The registered sole mortality was reduced, yet with statistically significant differences between control circuits. In circuits where *V. harveyi* was introduced, the presence of the biofilter showed no statistically significant differences in the recorded mortality.

With the microbiological analysis of water cultivation throughout the period of infection, there were no statistically significant differences in bacterial concentration changes in circuits where the polychaete was present, which excludes a relation between the presence of the biofilter and the water bacterial concentration.

Histologically, were observed tissue cells of sole without apparent damage, or any evidence of associated pathology. The water culture was analyzed by microbiological techniques and there was no statistically significant differences in bacterial counts over time.

These results led to the hypothesis of a first contact between the juveniles of sole and *V. harveyi* bacterial species, which in fact has been confirmed by the hatchery from which juveniles were acquired. Thus it is suggested that the results obtained were originated by a factor of development of an adaptive immune defense capacity to induce the bacterial resistance observed.

The bacterial filtration efficiency of the polychaete was evidenced by recording the mortality obtained in circuits without inducing bacterial infection. Microbiologically, the bacterial load over time doesn't allow an association between it's variation with the presence/absence of the biofilter. However, it would be important to continue this study by applying techniques to obtain more accurate results, such as PCR.

Key-words: *Vibrio harveyi*; *Solea senegalensis*; *Sabellaria alveolata*; Biofilters; Resistance.

Índice

Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de tabelas	xvii
1. Introdução	1
1.1. Estado actual da aquacultura.....	1
1.2. O cultivo de <i>Solea senegalensis</i> (Kaup, 1858) em Portugal.....	3
1.3. Aspectos biológicos de <i>S.senegalensis</i>	4
1.4. Condições de cultivo	5
1.5. Constrangimentos no cultivo.....	6
1.5.1. Vibriose - causas e sintomatologia	6
1.5.2. <i>Vibrio harveyi</i>	7
1.5.3. Medidas de prevenção e controlo da Vibriose.....	10
1.6. Biofiltração num cultivo integrado	11
1.6.1. Biologia da poliqueta <i>Sabellaria alveolata</i>	12
1.6.2. <i>S.alveolata</i> como biofiltro	14
2. Objectivo geral	17
2.1. Objectivos específicos.....	17
3. Procedimentos	19
3.1. Organismos biológicos	19
3.2. Sistema de cultivo	19
3.3. Aclimação do biofiltro	20
3.4. Sensibilidade de <i>S. senegalensis</i> a <i>V.harveyi</i>	21
3.4.1. Preparação da dose letal (LD ₅₀).....	21
3.4.2. Recuperação da estirpe bacteriana	21
3.4.3. Identificação fenotípica da estirpe bacteriana	22
3.5. Infecção bacteriana	23
3.5.1. Relação entre unidades formadoras de colónias (UFC) e densidade óptica para <i>V. harveyi</i>	23
3.5.2. Análise microbiológica à Água	24
3.5.3. Amostragem de <i>S. senegalensis</i> e <i>S. alveolata</i>	24
3.6. Análise estatística	25
4. Resultados	27

4.1. Sensibilidade de <i>S. senegalensis</i> a <i>V.harveyi</i>	27
4.1.1 Registo de mortalidade	27
4.1.2. Taxa de mortalidade.....	27
4.1.3. Recuperação e identificação bacteriana.....	28
4.1.3.1. Circuito de infecção	28
4.1.3.2. Circuito controlo	29
4.2. Infecção bacteriana	30
4.2.1 <i>S. senegalensis</i> e <i>S. alveolata</i>	30
4.2.1.1 Taxa de mortalidade de <i>S. senegalensis</i>	30
4.2.1.2. Análise estatística da mortalidade de <i>S. senegalensis</i>	30
4.2.1.3 Análise microbiológica de <i>S. senegalensis</i>	32
4.2.1.4. Análise molecular de <i>S. senegalensis</i> e <i>S. alveolata</i>	32
4.2.1.4. Análise histológica de <i>S. senegalensis</i>	34
4.2.2. Água de cultivo	35
4.2.2.1. Análise microbiológica e estatística das contagens UFC.....	35
- Antes e depois da infecção	35
- No decorrer da infecção	37
5. Discussão	39
6. Considerações Finais	47
7. Referências Bibliográficas	49
8. Anexos	59
Anexo I - Composição nutricional da ração distribuída no sistema de recirculação de água em estudo	59
Anexo II - Procedimento de análise histológica	60

Índice de Figuras

Figura 1- Representação gráfica do crescimento mundial de capturas no estado selvagem e produção aquícola em milhões de toneladas, desde 1950 até 2010 (FAO,2012).	1
Figura 2- Representação gráfica da produção aquícola em Portugal entre os anos 2010 e 2011, em termos de quantidade (10^3 toneladas) e valor económico (10^6 euros) (INE,2013) .	2
Figura 3- Representação gráfica da produção de linguado legítimo em Portugal entre os anos 2008 e 2011 em regime intensivo, extensivo e semi-intensivo; (A) valor económico do linguado legítimo; (B) toneladas de linguado legítimo produzidas (INE, 2009, 2010, 2011, 2012).....	3
Figura 4- Representação fotográfica de construções tubulares do género Sabellaria; A) ampliação de indivíduo da espécie <i>alveolata</i> dentro do seu tubo; B) colónia da espécie <i>alveolata</i>	12
Figura 5- Representação fotográfica da espécie <i>S. alveolata</i> (Linnaeus, 1767); A) indivíduo em posição dorsal; (B) ampliação da coroa de cílios que compõem o sistema de filtração, posição dorsal.	12
Figura 6 - Representação esquemática da coroa de cílios de <i>S.alveolata</i> ; A) posição frontal da coroa de cílios; (B) extremidade de um dos cílios que compõem a camada externa da coroa ciliar (Fauvel, 1927).....	13
Figura 7- Representação fotográfica (A) e esquemática (B) dos órgãos de filtração na região anterior, posição ventral; B1- lóbulos cefálicos (LC); em cada lóbulo localiza-se um sulco primário (SP); cada sulco primário é dividido em sulcos secundários (SS); palpo (P); B2- representação dos sílios (Si) inseridos na extremidade dos sulcos secundários; parede cefálica (PC); boca (Bc)	14
Figura 8- Representação esquemática do sistema de cultivo.	20
Figura 9- Representação esquemática da composição de cada circuito do sistema.....	23
Figura 10- Registo diário da ocorrência de mortalidade de linguados em ambos os circuitos representados por CC, circuito controlo e CI, circuito de infeção, durante 8 dias de ensaio.	27
Figura 11- Mortalidade registada durante o período de infeção; os valores são expressos como média \pm erro-padrão da média (SE); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre C1 e C3 (p -value< 0,05); (#) Diferenças estatisticamente significativas entre C2 e C3 (p -value< 0,05); (●) Diferenças estatisticamente significativas entre C2 e C4 (p -value< 0,05) .	31
Figura 12- Mortalidade <i>versus</i> circuito; Cada letra denota um subconjunto do factor Circuito cujas proporções não diferem significativamente entre si, ao nível de significância de 0,05 (Teste de Qui-Quadrado).....	31

Figura 13- Resultado da análise de PCR em 35 amostras de *S.senegalensis* e *S.alveolata* em contacto com *V.harveyi*; M = Marcador de peso molecular (100pb DNA gTp-ladder, gTPbio); 1= (+) *S. senegalensis* em C1; 2= (+) *S. senegalensis* em C3; 3= (+) *S. senegalensis* em C2; 4= (+) *S. senegalensis* em C3; 5= (+) *S. senegalensis* em C4; 6= (-) *S.alveolata* em C4; 7= (+) *S. senegalensis* em C2; 8= (+) *S. senegalensis* em C1; 9= (+) *S. senegalensis* em C4; 10= (+) *S. senegalensis* em C3; 11= (+) *S. senegalensis* em C3; 12= (+) *S. senegalensis* em C4; 13= (-) *S.alveolata* em C2; 14= (+) *S. senegalensis* em C2; 15= (+) *S. senegalensis* em C1; 16= (+) *S. senegalensis* em C1; 17= (+) *S. senegalensis* em C3; 18= (+) *S. senegalensis* em C4; 19= (+) *S. senegalensis* em C3; 20= (+) *S. senegalensis* em C3; 21= (-) *S.alveolata* em C2; 22= (+) *S. senegalensis* em C1; 23= (+) *S. senegalensis* em C2; 24= (+) *S. senegalensis* em C4; 25= (+) *S. senegalensis* em C3; 26= (+) *S. senegalensis* em C4; 27= (+) *S. senegalensis* em C3; 28= (-) *S.alveolata* em C4; 29= (+) *S. senegalensis* em C2; 30= (+) *S. senegalensis* em C3; 31= (+?) *S. senegalensis* em C4; 32= (+?) *S. senegalensis* em C1; 33= (-) *S. senegalensis* em C1; 34= (+) *S. senegalensis* em C4; 35= (-) *S. senegalensis* em C3 ; C+ = controlo positivo (*V. harveyi* DSM 19623); C- = Controlo negativo..... **34**

Figura 14- Preparações histológicas, coradas com H&E, de rim de indivíduos amostrados no período de infecção, nos diferentes circuitos, numa ampliação de 400x; A) indivíduo do C1; B) indivíduo do C2; C) indivíduo do C3; D) indivíduo do C4; 1) nefrónios; 2) melanomacrófagos; 3) epitélio tubular; 4) glomérulos de Malpighi **35**

Figura 15- Comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ nos quatro circuitos, antes e depois da infecção; A) contagens em meio TSA (1,5% NaCl); B) contagens em meio TCBS; os valores das contagens encontram-se logaritmizados (logx+1). **36**

Figura 16- Análise estatística 1way-ANOVA para comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ nos quatro circuitos, no momento antes e depois da infecção; A) contagens em meio TSA (1,5% NaCl); B) contagens em meio TCBS; os valores são expressos como média ± erro-padrão (SE) e encontram-se logaritmizados (log x+1). **36**

Figura 17- Comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ realizadas nos quatro circuitos, durante diferentes dias do ensaio; A) em meio de cultivo TSA (1,5% NaCl); B) em meio de cultivo TCBS; Os valores das contagens encontram-se logaritmizados (log x+1)... **37**

Figura 18- Análise estatística 1way-ANOVA das contagens microbiológicas realizadas nos quatro circuitos, durante os vários dias do ensaio; os valores são expressos como média ± erro-padrão (SE); A) em meio TSA (1,5% NaCl) (UFC mL⁻¹); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 6 (*p-value* <0,05); B) em meio TCBS (UFC mL⁻¹); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 4 (*p-value* < 0,05); (#) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 6 (*p-value* < 0,05). **38**

Índice de tabelas

Tabela I- Registo de espécies afectadas pelo <i>V. harveyi</i>	8
Tabela II- Testes bioquímicos utilizados na identificação da estirpe <i>V. harveyi</i> ATCC 14126, segundo Buller (2004); β H= β haemolysis; SW = Swarming; ODC = Ornithine decarboxylase; LDC = Lysine decarboxylase; ADH = Arginine dihydrolase; VP = Voges-Proskauer; ONPG = β -galactosidase ; OF = Fermentativo; H ₂ S =Sulfido de hidrogénio; TCBS = Thiosulphate-citrate-bile-sucrose agar; T ^o = Temperatura; NaCl (%) = Crescimento em % de NaCl; 0129 (10 mg) = Resistente a 10 mg do agente vibriostático 0129; 0129 (150 mg) = Sensível a 150 mg do agente vibriostático 0129; negativo (-); positivo (+); fraco (F); positivo fraco (+F); fermentativo (Ferm); amarelo (A); resistente (R); sensível (S).	10
Tabela III- Cálculo da taxa de mortalidade ocorrida durante o ensaio de sensibilidade dos linguados à bactéria, nos dois circuitos em estudo.....	28
Tabela IV- Registo do resultado dos testes de identificação bacteriana aplicados à estirpe bacteriana recuperada no circuito infectado; positivo (+); negativo (-).	29
Tabela V- Registo do resultado dos testes de identificação bacteriana aplicados aos isolados bacterianos recuperados dos órgãos internos de indivíduos mortos no C3; positivo (+); negativo (-); Swa=swarming; Mob=mobilidade; Lum=luminescência.	29
Tabela VI- Taxa de mortalidade de linguados registada durante o período de infecção.....	30
Tabela VII- Crescimento bacteriano verificado em todos os circuitos, ao longo do período de infecção, em três meios de cultivo distintos, TCBS, TSA (1,5% de NaCl) e meio de luminescência; positivo (+).....	32
Tabela VIII- Registo da análise PCR efectuada em linguados recolhidos dos quatro sistemas, antes, durante e no final do período de infecção; positivo (+); negativo (-).	33
Tabela IX- Registo da análise PCR efectuada em poliquetas recolhidas em triplicado dos sistemas C2 e C4, antes e no final do período de infecção; negativo (-).	33
Tabela X- Ficha de composição fornecida pela empresa SPAROS, LDA.....	59
Tabela XI- Tempos atribuídos durante o processamento de tecidos e posterior coloração dos mesmos	60

1. Introdução

1.1 Estado actual da aquacultura

A produção global em aquacultura continua em expansão, embora mais lentamente do que nas décadas de 80 e 90. Apesar de a aquacultura não representar uma quota muito significativa no mercado mundial face ao total de capturas em meio selvagem, tem vindo a aumentar para satisfazer as necessidades do consumo humano (FAO, 2012).

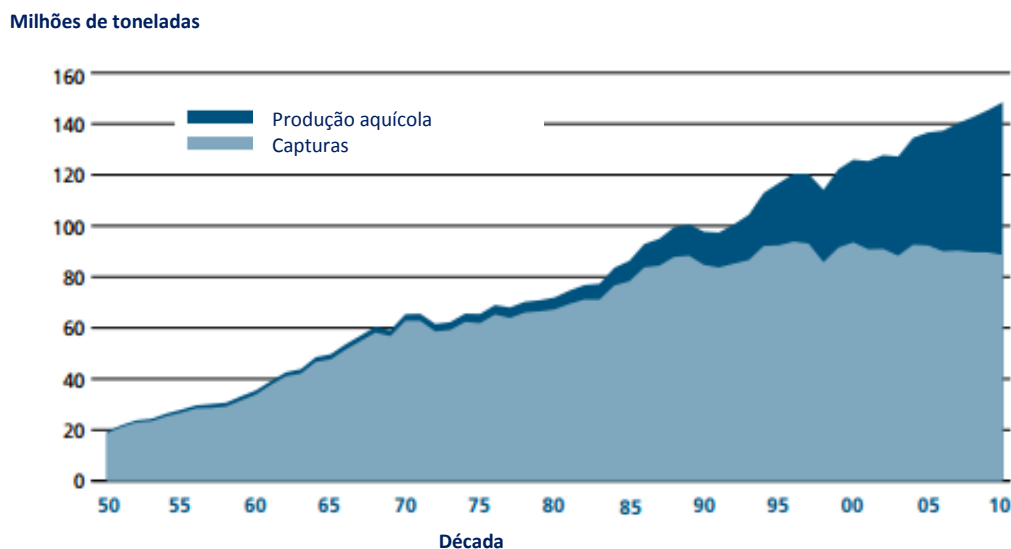


Figura 1- Representação gráfica do crescimento mundial de capturas no estado selvagem e produção aquícola em milhões de toneladas, desde 1950 até 2010 (FAO, 2012).

A espécie e a quantidade de produto final a produzir em aquacultura são influenciadas pelas necessidades do mercado. O mercado da indústria pesqueira é muito dinâmico, cada vez mais complexo e estratificado, com mais diversificação entre espécies e formas de produto. Espécies de elevado valor comercial como o camarão, salmão, atum, robalo, dourada e alguns peixes planos são muito comercializados, em particular as exportações para mercados mais prósperos. Na categoria dos peixes marinhos onde se incluem os peixes planos, a produção sofreu um aumento significativo de 278 000 toneladas em 1990 para 1.500.000 toneladas em 2010 (figura 1), tendo como principais países produtores a China e a Espanha (FAO, 2010; 2012).

Portugal dispõe de factores naturais favoráveis ao desenvolvimento do sector aquícola muito para além do que se regista actualmente (POP 2007/2013), sendo no entanto considerado um sector ainda com pouca expressão económica (COTEC, 2012).

Para fazer frente a esta situação é importante para o crescimento do mercado de aquacultura em Portugal optar pela diversificação, ou seja a produção de novas espécies como o pregado, linguado, sargo, pargo e corvina, associada às condições naturais do país, capazes de potenciar um melhor aproveitamento produtivo de algumas espécies como no caso dos moluscos bivalves (mexilhão e ostra) (COTEC, 2012; POP 2007/2013)

Em termos de investimentos lançados em Portugal para promover a produção aquícola, o POP 2007/2013 refere a preferência na implementação da produção de espécies em águas salgadas ou salobras, nomeadamente dos peixes planos (pregado e linguado) e dos moluscos bivalves, bem como a melhoria da qualidade das produções já existentes. A produção aquícola em Portugal registou no ano de 2010, relativamente ao ano 2009, um ligeiro aumento de 0,2% em quantidade (toneladas), e de 5% em valor económico, representando um total anual de 8 013 toneladas produzidas, equivalentes a 46 462 mil euros. No ano seguinte, 2011, foi registado um aumento de 11,4% das toneladas produzidas e de 23,3% em termos de valor, o que contribuiu para atingir uma produção aquícola de 9 166 toneladas correspondentes a 58 279 mil euros. Este aumento deve-se essencialmente ao crescimento de produção de pregado, que compensou a quebra de produção de robalo e dourada (INE, 2012).

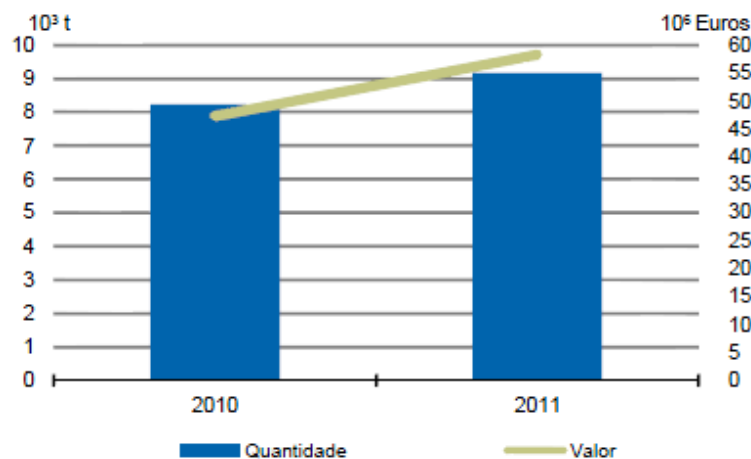


Figura 2- Representação gráfica da produção aquícola em Portugal entre os anos 2010 e 2011, em termos de quantidade (10³ toneladas) e valor económico (10⁶ euros) (INE, 2013).

A tendência registada para a produção de linguado legítimo nos anos 2008, 2009 e 2010 em regime intensivo, indica um aumento na produção de linguado legítimo, que coincide com o aumento da valorização económica, como se verifica na figura 3 (INE, 2009, 2010, 2011, 2012). De 2010 para 2011 o regime semi-intensivo registou um ligeiro aumento

de valor. Este aumento coincide com o aumento de produção em quantidade, não sendo possível verificar o mesmo para os regimes intensivo e extensivo devido a ausência de dados específicos para esta espécie.

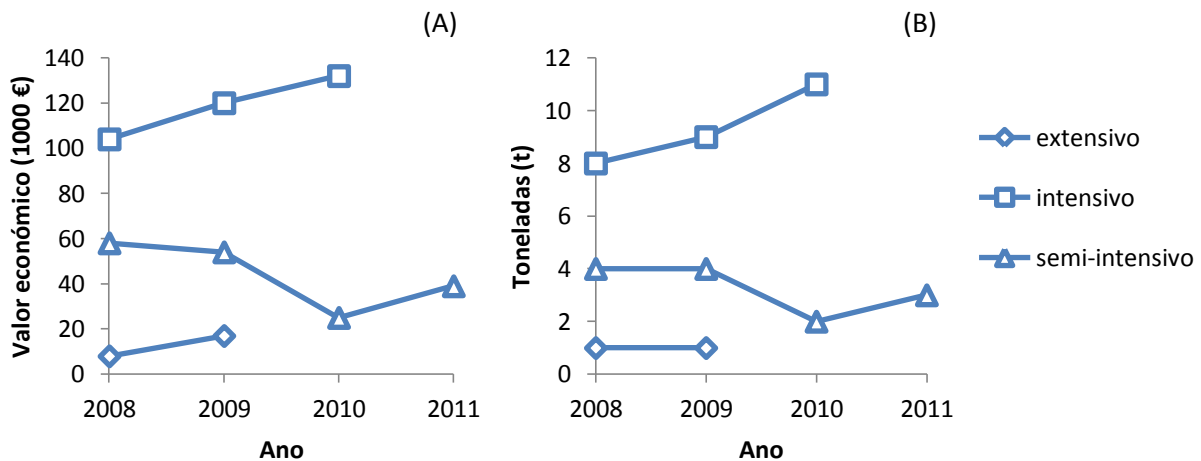


Figura 3- Representação gráfica da produção de linguado legítimo em Portugal entre os anos 2008 e 2011 em regime intensivo, extensivo e semi-intensivo; (A) valor económico do linguado legítimo; (B) toneladas de linguado legítimo produzidas (INE, 2009, 2010, 2011, 2012).

Esta análise de dados estatísticos reflecte a existência de dificuldades no cultivo de linguado, o que reforça a importância e a necessidade de elaborar trabalhos científicos que permitam aumentar a produção aquícola, colaborando para a resolução de problemas como a elevada mortalidade e as conseqüentes perdas económicas na produção, favorecendo o crescimento da aquacultura em Portugal.

1.2 O cultivo da espécie *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) em Portugal

O sul da Europa, que se tem concentrado na produção de dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*), requer diversificação nos cultivos para fazer face ao rápido crescimento da produção e saturação do mercado (Rico *et al.*, 2008; Sáez *et al.*, 2011).

Os estudos sobre o cultivo do género *Solea* tiveram início no final dos anos 70 na Península Ibérica contudo, durante a maior parte do tempo subsistiu a escassez de resultados que impediram a evolução deste cultivo. Trata-se de uma espécie que apresentou uma maior complexidade nas técnicas de cultivo em comparação com as necessidades da dourada ou robalo, uma vez que a aplicação das mesmas técnicas na produção de linguado não surtia os resultados esperados (Sáez *et al.*, 2011). Em Portugal, a produção aquícola de *S. senegalensis*, de nome comum linguado senegalês ou linguado

branco teve o seu início na década de 80, uma produção em tanques de terra impulsionada pelos apoios comunitários ao país em sintonia com o reaproveitamento de antigas salinas abandonadas. O cultivo desta espécie é comum na península ibérica em regime extensivo e semi-intensivo, sendo uma forte candidata ao cultivo intensivo na região do Mediterrâneo (Dias, 1994; Ribeiro *et al.*, 1999; Dinis *et al.*, 1999).

Mas durante os últimos anos, diferentes projetos nacionais e europeus têm vindo a complementar o conhecimento científico e técnico a aplicar no cultivo, em áreas como a reprodução, nutrição e a patologia, destinados a ultrapassar todas estas limitações existentes (Sáez *et al.*, 2011; Tejada *et al.*, 2007).

A desova natural em cativeiro já é efectuada assim como um cultivo larvar, com taxas de sobrevivência entre 60%-80%. Existem ainda alguns obstáculos a nível de comportamento alimentar e mortalidade elevada associada a patologias. A grande variação de tamanhos na fase de pré-engorda em conjunto com mal formações do esqueleto e anomalias na pigmentação são também factores que prejudicam o desenvolvimento da comercialização do produto (Castelo Branco *et al.*, 2008, 2010). Mas a capacidade em completar o seu ciclo biológico em cativeiro e o elevado valor económico permitem considerar a espécie como promissora no mercado aquícola (Zorrilla *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2011).

1.3 Aspectos biológicos da espécie *S. senegalensis*

Esta espécie de linguado é comum nas águas do Atlântico sul e Mediterrâneo, estando bem adaptada a climas quentes. Trata-se de um peixe pelágico e com simetria bilateral na fase larvar, tornando-se bentónico e assimétrico (plano) na fase juvenil e adulta. Na fase de vida pelágica podem ser encontrados entre os 10 e os 15m de profundidade. Ao atingirem entre 10-15mm de comprimento tornam-se assimétricos e bentónicos, passando à fase juvenil, onde se deslocam para maiores profundidades (Castelo Branco & Ramos, 1998). Na fase larvar a alimentação é baseada em rotíferos, já nas fases juvenil e adulto alimentam-se de zoobentos, como pequenos crustáceos, moluscos bivalves ou poliquetas. É uma espécie gonocórica, com uma época de desova natural entre Março/Abril até Junho. As fêmeas maturam aos cerca de 3 anos de idade podendo atingir os 32 cm de comprimento e uma fecundidade de aproximadamente 530 oócitos por fêmea. A sua morfologia externa é muito semelhante à espécie *Solea solea*, com diferenças apenas em detalhes específicos tais como a forma e coloração, como no caso barbatana peitoral, onde a espécie *solea* possui uma mancha negra (Ribeiro *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2003; Anguis & Cañavate, 2005). Ambas as espécies têm ciclos de vida semelhantes e com maturação sexual na mesma

idade e tamanho no entanto, a espécie *senegalensis* aparenta ter melhor aptidão para crescimento em cativeiro. Em Espanha já foram obtidos indivíduos desta espécie com um peso médio de 450g em 14 meses, resultados optimistas para os produtores em cultivo intensivo (20-30 kg m⁻²) (Anguis & Cañavate, 2005).

1.4 Condições de cultivo

A densidade de cultivo utilizada varia consoante a fase do ciclo de vida e o regime de produção. Sánchez *et al.*, (2010), refere a capacidade da espécie tolerar valores entre 30-45 kg m⁻², no entanto podem ser manifestadas respostas associadas a situações de *stress*, mencionando como uma opção razoável encontrar o equilíbrio entre o economicamente viável e o bem-estar animal. Manifestam maior actividade durante a noite ou durante a fase escura do seu fotoperíodo, sendo capazes de alterar o seu ritmo de consumo de oxigénio durante a fase de luz para responder a necessidades metabólicas como a alimentação (Castanheira *et al.*, 2011). Quanto ao regime nutritivo, alimentar com maior frequência parece reduzir a heterogeneidade do crescimento, tendo pouco efeito sobre a taxa média do mesmo. Assim como o fotoperíodo não parece influenciar o consumo de ração nem o crescimento médio (Imsland *et al.*, 2003). Embora seja uma espécie descrita como tendo hábitos alimentares nocturnos, Marinho *et al.*, (2012) revelam que a conversão proteica e o crescimento aumentam quando alimentados durante a fase diurna do fotoperíodo. Quanto a parâmetros físico-químicos da água, a temperatura média a utilizar em cultivos de engorda varia entre autores, mas sendo uma espécie natural de águas temperadas, Howell *et al.*, (2006) recomenda 14°C no mínimo e 26°C como temperatura máxima. O óptimo de salinidade estará entre 33-35 (Imsland *et al.*, 2003). Em termos de resistência à concentração de compostos azotados, Parra & Yúfera (1999) referem uma provável associação entre a tolerância demonstrada pelas larvas em estudo e a produção de muco da sua epiderme. Mas ainda é necessário continuar a investigar os efeitos dos compostos azotados no desenvolvimento do linguado branco, uma vez que a sua toxicidade é influenciada por outros factores abióticos como a temperatura, salinidade e pH. A sensibilidade a concentrações elevadas pode ainda ter consequências negativas na produção através da debilitação do sistema imunológico (provocado pelo estado de stress), dando origem à manifestação de doenças provocadas por agentes oportunistas.

1.5 Constrangimentos no cultivo

No cultivo de *S. senegalensis*, a incidência de patologias de origem bacteriana é muito significativa (Rico *et al.*, 2008), estando a vibriose mencionada entre as principais patologias associadas a este cultivo (Howell *et al.*, 2006). Em 2003, Zorrilla e colaboradores, isolaram e identificaram a espécie *V. harveyi* em populações de *S. senegalensis*, num surto com mortalidade moderada (Zorrilla *et al.*, 2003; Korun, 2008; Ransangan *et al.*, 2012), no entanto é ainda escasso o isolamento e caracterização de bactérias patogénicas para o linguado-branco. Além da vibriose está reportada a susceptibilidade à Pasteurelose, causada por *Photobacterium damsela ssp. piscicida* e ao vírus necrótico pancreático, IPNV (*infections pancreatic necrosis virus*) (Imsland *et al.*, 2003), à doença vírica do linfoquisto, LCDV (*lymphocystis disease viruses*) (Alonso *et al.*, 2005) e à Tenacibaculose, causada por *Tenacibaculum maritimum* (Vilar *et al.*, 2012).

1.5.1 Vibriose - causas e sintomatologia

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, que se manifestam geralmente devido a um desequilíbrio (aumento súbito) na população de bactérias do género *Vibrio* (Ghittino *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005; Austin & Zhang, 2006) ou despoletadas por condições ambientais e/ou nutricionais desfavoráveis num cultivo, condições estas que serão determinantes na severidade do surto (Jun & Woo, 2003).

Os sinais da vibriose são semelhantes a muitas outras doenças bacterianas, tanto a nível externo como interno (Thompson *et al.*, 2004). Externamente pode verificar-se letargia, escurecimento da pele, palidez branquial, áreas hemorrágicas em redor da boca e barbatanas, anorexia, lesões dérmicas profundas, lesões necróticas no músculo, exoftalmia, opacidade da córnea e úlceras na superfície da pele. Em peixes moribundos os sintomas internos traduzem-se em gastroenterite, anemia, hemorragias na cavidade abdominal como fígado e rim, palidez dos órgãos internos e distensão abdominal (Zorrilla *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005). Todos estes sinais de doença são manifestados consoante a severidade da infecção manifestada, independentemente da espécie afectada (Jun & Woo, 2003; Themptander, 2005). No estudo de Zorrilla *et al.*, (2003) em populações de *S. senegalensis* infectadas com *V.harveyi* (como mencionado anteriormente no ponto 4), os principais sinais exteriores evidenciavam úlceras da pele e áreas hemorrágicas perto das barbatanas e boca (Korun, 2008; Ransangan *et al.*, 2012).

1.5.2 *Vibrio harveyi*

O *Vibrio harveyi* está entre as principais espécies de *Vibrio* associadas a prejuízos na produção aquícola (Ghittino *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005; Austin & Zhang, 2006). É uma bactéria gram-negativa com capacidade para emitir luminescência (Austin, 2005; Austin & Zhang, 2006) omnipresente em ambientes estuarino e marinho, onde ocorrem naturalmente (Austin & Zhang, 2006). Cada célula possui um diâmetro entre 4 a 12 µm (Slominska *et al.*, 2002), e pode ser encontrado em modo de vida livre na coluna de água ou associado a seres vivos marinhos como zooplâncton, esponjas, corais, moluscos, crustáceos e peixes ósseos (Thompson *et al.*, 2004; Themptander, 2005; Austin & Zhang, 2006; Vinod *et al.*, 2006).

Por recurso a análises fenotípicas e genotípicas, incluindo a sequência 16S rDNA, verificou-se que outras espécies como *V. carchariae* e *V. trachuri* são na realidade sinónimos do *Vibrio harveyi*, tendo este último precedência como sinónimo sénior (Austin, 2005; Austin & Zhang, 2006; Austin, 2010).

V. harveyi é uma das espécies bacterianas isoladas com maior frequência e numa grande variedade de cultivos em todo o mundo (Pujalte, 2003; Soto-Rodriguez *et al.*, 2012), com capacidade para causar surtos patológicos com mortalidade moderada (Rico *et al.*, 2008) ou severa em cultivos de vertebrados e invertebrados marinhos (Arijo *et al.*, 2005), mais frequentemente associado a elevadas perdas económicas (devido à elevada virulência e prevalência da patologia) em cultivos de invertebrados como os crustáceos peneídeos, localizados maioritariamente na Ásia e América do Sul. (Austin & Zhang, 2006, Soto-Rodriguez *et al.*, 2012). A tabela I representa a lista de espécies marinhas em que já foi recuperado e identificado o *V. harveyi* como causa dos sintomas de doença manifestados.

Tabela I- Registo de espécies afectadas pelo *V. harveyi*

Filo	Espécie	Autor
Molusca	<i>Pinctada maxima</i>	Pass <i>et al.</i> , 1987
	<i>Sulculus diversicolor supratexta</i>	Nishimori <i>et al.</i> , 1998
	<i>Haliotis tuberculata</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 2002
	<i>Penaeus monodon</i>	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 1994 Hettiarachchi <i>et al.</i> , 2005
Crustacea	<i>Portunus trituberculatus</i>	Ishimaru & Muroga, 1997
	<i>Penaeus japonicus</i> , <i>Penaeus schmitti</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>L. stylirotris</i>	Alvarez <i>et al.</i> , 1998
	<i>Penaeus chinensis</i>	Vandenberghe <i>et al.</i> , 1998
	<i>Panulirus homarus</i>	Leslie <i>et al.</i> , 2012
	<i>Negraprion brevirostris</i> <i>Carcharhinus plumbeus</i>	Grimes <i>et al.</i> , 1985 Colwell & Grimes 1984 Bertone <i>et al.</i> , 1996
Chordata (Subclasse Elasmobranchii)	<i>Caranx hippos</i> , <i>Centropomus undecimalis</i>	Kraxberger-Beatty <i>et al.</i> , 1990
Chordata (Classe Osteichthyes)	<i>Acanthopagrus schlegeli</i> , <i>A. latus</i> , <i>Lateolabrax japonicus</i> , <i>Sciaenops ocellatus</i> ,	Yii <i>et al.</i> , 1997
	<i>Paralichthys dentatus</i>	Soffientino <i>et al.</i> , 1999 Gauger <i>et al.</i> , 2006
	<i>Epinephelus coioides</i>	Yii <i>et al.</i> , 1997; Lee <i>et al.</i> , 2002
	<i>Mola mola</i>	Hispano <i>et al.</i> , 1997
	<i>Acanthopagrus cuvieri</i> , <i>Epinephelus tauvina</i>	Saeed, 1995
	<i>Chanos chanos</i>	Ishimaru & Muroga, 1997
	<i>Mugil curema</i> , <i>Trachinotus carolinus</i> , <i>Trachinotus falcatus</i> , <i>Chaetodipterus faber</i> , <i>Centropomus undecimalis</i> , <i>Acanthopagrus</i> <i>cuvieri</i> , <i>Epinephelus tauvina</i>	Alvarez <i>et al.</i> , 1998
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo salar</i>	Zhang & Austin, 2000
	<i>Hippocampus sp.</i>	Alcaide <i>et al.</i> , 2001
	<i>Trachurus japonicus</i>	Thompson <i>et al.</i> , 2002
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Liu <i>et al.</i> , 2003
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Pujalte <i>et al.</i> , 2003
	<i>Solea senegalensis</i>	Zorrilla <i>et al.</i> , 2003
	<i>Rachycentron canadum</i>	Liu <i>et al.</i> , 2004
	<i>Hippocampus kuda</i>	Tendencia, 2004
	<i>Sebastes schlegeli</i>	Won & Park, 2008
	<i>Paralichthys olivaceus</i> ,	Li <i>et al.</i> , 2011
	<i>Epinephelus awoara</i>	Qin <i>et al.</i> , 2006; Qin <i>et al.</i> , 2009
	<i>Portunus pelagicus</i>	Talpur <i>et al.</i> , 2011
	<i>Epinephelus bruneus</i>	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2012
<i>Lates calcarifer</i>	Tendencia, 2002 Ransangan <i>et al.</i> , 2012	

A severidade com que os sintomas de doença se manifestam em determinada espécie depende da sua sensibilidade às diversas estirpes de *V. harveyi* existentes, da concentração bacteriana e do tempo de exposição a esta, podendo a conjugação destes factores causar surtos graves ou apenas debilitar o organismo afectado (Oakey *et al.*, 2003; Austin & Zhang, 2006).

A estirpe de *V.harveyi* a utilizar neste trabalho, DSM 19623 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), também identificada noutros Bancos de

microrganismos como ATCC 14126 (American Type Culture Collection) ou CECT 525 (Colección Espanola de Cultivos Tipo).

As abordagens tradicionais para a identificação de *Vibrios* são baseadas em métodos fenotípicos, como o perfil metabólico ou de ácidos gordos, métodos sorológicos e perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. Mas este tipo de abordagem baseado na caracterização e comparação produtos da expressão genética de diferentes espécies e estirpes, tem um poder discriminatório limitado para o *V.harveyi*, devido aos seus fenótipos muito semelhantes. A plasticidade do genoma pode ainda causar variabilidade fenotípica, afectando assim a reprodutibilidade do perfil fenotípico (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

Já os testes bioquímicos são vulgarmente utilizados para a identificação de *V. harveyi*, existindo alguns sistemas standart disponíveis no mercado denominados por API-ZYM, API 20E, API 20NE e API 50CH (Buller, 2004), ou chaves de identificação de características fenotípicas descritas por diversos autores, como Buller (2004) e Rico *et al.*, (2008) para caracterização de estirpes deste *Vibrio*.

Os métodos sorológicos são uma alternativa aos testes bioquímicos. Contudo, no teste imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) baseado em anticorpos policlonais, desenvolvido por Robertson *et al.*, (1998) para identificação rápida de *V. harveyi* em peneídeos, foi observada uma reactividade cruzada com espécies relacionadas. Phianphak *et al.*, (2005) desenvolveram anticorpos monoclonais para detecção de *V. harveyi* em peneídeos, porém o ensaio revelou também reactividade cruzada com outras bactérias Gram negativas. O facto dos anticorpos necessários não serem amplamente disponíveis torna-se numa desvantagem para os métodos serológicos.

Os testes de biologia molecular têm capacidade para detectar diferenças menores entre genomas e com maior estabilidade molecular, quando comparados com os perfis fenotípicos de algumas espécies. No entanto, para espécies relacionadas com o *V. harveyi*, genomas altamente semelhantes bem como a plasticidade do mesmo podem limitar a identificação precisa através de técnicas moleculares. Existem diferentes métodos moleculares que têm sido utilizados para identificação de *V. harveyi*.

A escolha do método mais adequado a um estudo é influenciada pelo objectivo do trabalho (identificação, detecção ou caracterização) bem como do número e diversidade das estirpes em causa, tempo necessário para obtenção de resultados e custos associados.

Pang *et al.*, (2006) desenvolveram um método efectivo para identificação de *V. harveyi* que se baseia na utilização do gene *toxR* como marcador taxonómico. Os *primers* do gene *toxR* foram concebidos com especificidade para *V. harveyi* e incorporados na cadeia de reacção polimerase (PCR, polymerase chain reaction). Gomez-Gil *et al.*, (2004) utilizou técnicas fenotípicas e genotípicas para identificação de diferentes espécies de *Vibrio*, permitindo esta associação de diferentes técnicas a obtenção de resultados ainda mais seguros.

Tabela II- Testes bioquímicos utilizados na identificação da estirpe *V. harveyi* ATCC 14126, segundo Buller (2004); βH=β haemolysis; SW = Swarming; ODC = Ornithine decarboxylase; LDC = Lysine decarboxylase; ADH = Arginine dihydrolase; VP = Voges-Proskauer; ONPG =β-galactosidase ; OF = Fermentativo; H₂S =Sulfido de hidrogénio; TCBS = Thiosulphate-citrate-bile-sucrose agar; T° = Temperatura; NaCl (%) = Crescimento em % de NaCl; 0129 (10 mg) = Resistente a 10 mg do agente vibriostático 0129; 0129 (150 mg) = Sensível a 150 mg do agente vibriostático 0129; negativo (-); positivo (+); fraco (F); positivo fraco (+F); fermentativo (Ferm); amarelo (A); resistente (R); sensível (S).

Teste	Resultado	Teste	Resultado	Teste	Resultado
Gram	-	Citrato	+F	Salicina	-
Oxidase	+	Ureia	-	Sorbitol	-
Catalase	+	VP	-	Sucrose	+
βH	F	Gelatina	+	H ₂ S	-
Motilidade	+	ONPG	-	TCBS	A
SW	-	O-F	Ferm	T°C	12-40
ODC	+	Arabinose	-	NaCl (%)	3-6
LDC	+	Glucose	+	O129 (10 mg)	R
ADH	-	Inositol	-	O129 (150 mg)	S
Nitrato	+	Manitol	+		
Indole	+	Manose	+		

Fonte: (Buller, 2004)

1.5.3 Medidas de prevenção e controlo da Vibriose

Como tratamento profilático, a vacinação é um método recomendado e tem sido alvo de investigação para que torne um método cada vez mais eficaz e promissor contra vibrioses (Jun & Woo, 2003; Imsland *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005). No entanto continua a ser necessário otimizar protocolos e regimes de vacinação para o género *Solea* (Howell *et al.*, 2006).

A utilização de probióticos, prebióticos e simbióticos (Gómez-Gil *et al.*, 2000) também tem revelado eficácia na protecção contra vibrioses, através da melhoria das condições de cultivo nomeadamente através da estimulação do sistema imunitário do individuo hospedeiro

através da colonização de bactérias benéficas e conseqüentemente impedindo a colonização de bactérias patogénicas no trato intestinal. É um método que não gera resistências e/ou não contamina o ambiente (Berger, 2000; Irianto & Austin, 2002).

No entanto, a medida mais frequentemente utilizada é o recurso a antibióticos, seja através de tratamento profilático ou como terapia para combate à doença (Jun & Woo, 2003). Este recurso a tratamento químico tem-se revelado excessivo, contribuindo para o aparecimento de estirpes resistentes (Balcázar *et al.*, 2007; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). Thompson *et al.*, (2004) sugere que o uso excessivo de antibióticos em simultâneo com elevadas trocas de água nos cultivos pode favorecer a proliferação de espécies de *Vibrio* e aumentar a sua virulência e prevalência do mesmo. Surge deste modo a necessidade de encontrar medidas alternativas de combate à doença, com destaque para as medidas profiláticas (Austin, 2010).

1.6 Biofiltração num cultivo integrado

A água do meio envolvente tem sido apontada como principal via de transmissão da vibriose causada por diferentes espécies de *Vibrio* (Jun & Woo, 2003). Este facto realça a importância em salvaguardar a qualidade da água de cultivo, o que pode ser garantido pela aplicação de cultivos integrados na mesma produção. Os cultivos integrados em aquacultura são uma prática centenária na China, uma técnica inicialmente terrestre e mais tarde expandida para o meio aquático. Esta prática tem como objectivo reciclar os desperdícios de alimento e os co-produtos (como as fezes e os nutrientes) através de uma cultura de uma espécie de um diferente nível trófico, para reduzir a carga orgânica libertada no meio selvagem (Ren *et al.*, 2012).

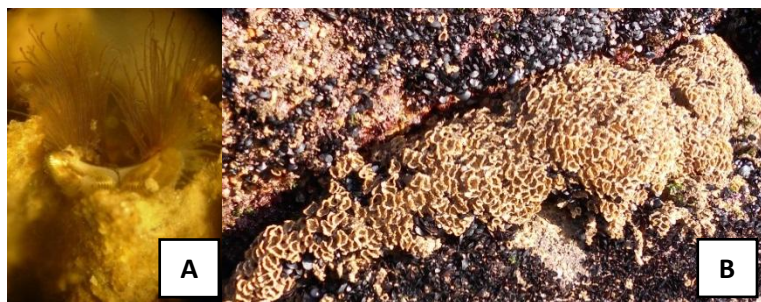
O termo *filter feeders* ou *filter feeding* é representado pela acção de um biofiltro instalado como cultivo integrado. Estes podem ser compostos por organismos filtradores tais como bivalves, esponjas, hidrozoários, anémonas-do-mar, hidróides, antozoários ou poliquetas, organismos que compõem comunidades bentónicas do sublitoral, com a capacidade de capturar partículas a partir da coluna de água com elevada eficiência (Gao *et al.*, 2008), uma vez que necessitam de filtrar elevados volumes de água para completarem os seus requerimentos nutritivos (Larsen & Riisgård, 2000; Riisgård & Larsen, 2001).

Entre estes diferentes grupos de macroinvertebrados marinhos, os poliquetas representam uma das melhores taxas de fixação de pequenas partículas suspensas na coluna de água, incluindo bactérias, metais pesados, contaminantes microbianos, hidrocarbonatos e nutrientes (Ostroumov, 2005; Gifford *et al.*, 2006; Licciano *et al.*, 2007a).

Este modo de bio-filtração acaba por permitir um controlo da libertação excessiva de agentes patogénicos, tais como bactérias, vírus e protozoários no ambiente (Gifford *et al.*, 2004), evitando também a degradação da qualidade da água nos sistemas de cultivo (Focardi *et al.*, 2005; Zaccone *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

1.6.1 Biologia da poliqueta *Sabellaria alveolata* (Linnaeus, 1767)

Sabellaria alveolata é uma espécie gregária, que habita em galerias que aderem às rochas na parte superior da zona intertidal. Estas construções abrigam outros organismos e a sua função como habitat tem sido alvo de estudo (Dubois *et al.*, 2003).



Fonte: A) upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bf/Sabellaria_alveolata.jpg.

Figura 4- Representação de construções tubulares do género *Sabellaria*; A) Ampliação de indivíduo da espécie *alveolata* dentro do seu tubo; B) colónia da espécie *alveolata*.

Indivíduos da espécie *Sabellaria alveolata* (figura 5) são reconhecidos como construtores das maiores formações biogénicas da costa europeia, geograficamente distribuídas pelo norte da Europa, desde o sul de Marrocos até ao limite norte da Grã-Bretanha e Irlanda (Dubois *et al.*, 2003; NIEA, 2005).



Fonte: B) upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Sabellaria_alveolata_b.JPG.

Figura 5- Representação fotográfica da espécie *Sabellaria alveolata* (Linnaeus, 1767); A) indivíduo em posição dorsal; (B) ampliação da coroa de cílios que compõem o sistema de filtração, posição dorsal.

Como a maioria dos invertebrados marinhos bentónicos, estes organismos exibem um ciclo de vida bento-pelágico que inclui estado larvar planctónico e dois estados bentónicos, o juvenil e o adulto. Uma fixação bem-sucedida exige um habitat apropriado, no final do desenvolvimento larvar. Processos oceânicos como correntes marinhas, *upwellings*, etc, conduzem as larvas planctónicas, que se fixam dependentemente de numerosos factores como a retenção local de larvas ou da conectividade entre populações espacialmente isoladas (Ayata *et al.*, 2009). Possui um tempo médio de vida entre 4 a 5 anos, embora alguns indivíduos possam viver entre 8 a 10 anos. É uma espécie gonocórica, que inicia a sua actividade reprodutiva durante o primeiro ano de vida, e que se volta a reproduzir a cada 3 anos. A desova é semi-contínua com dois períodos de desova, o maior ocorre no início de Maio e o segundo no início do mês de Setembro. No entanto, este padrão de maturidade sexual pode alterar-se principalmente devido a factores ambientais como a temperatura, fotoperíodo ou disponibilidade de alimento (Dubois *et al.*, 2007). O impacto da temperatura nesta espécie ainda não está bem estudado, mas sabe-se que são vulneráveis aos invernos rigorosos no limite norte da sua distribuição geográfica (NIEA, 2005). Quanto a temperaturas mais elevadas, também não estão disponíveis registos concretos, a não ser para o estado larvar, através da correlação entre temperaturas superiores a 17,5°C com concentrações elevadas deste estado de vida (Dubois *et al.*, 2007).

A identificação da espécie é efectuada pela camada externa dos cílios que compõem a coroa ciliar, através da forma da extremidade dos mesmos como se pode verificar no exemplo abaixo representado.

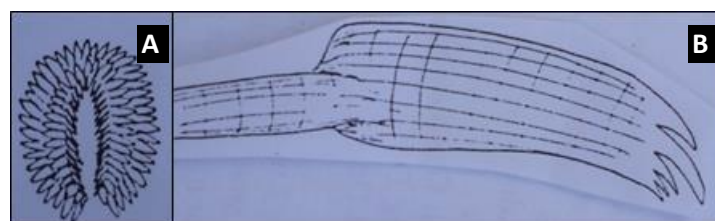
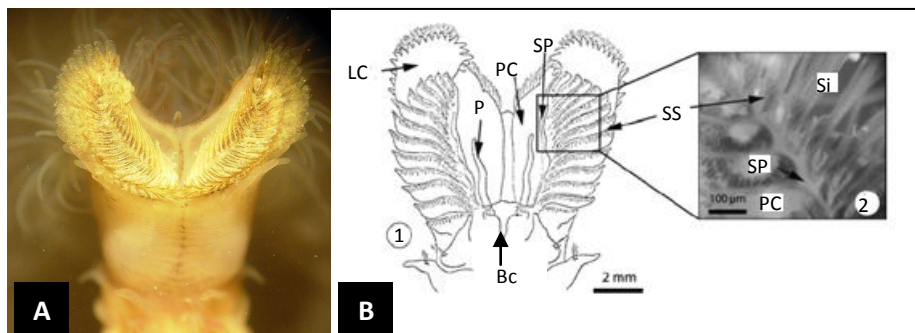


Figura 6 - Representação esquemática da coroa de cílios de *S. alveolata*; A) posição frontal da coroa de cílios; B) extremidade de um dos cílios que compõem a camada externa da coroa ciliar (Fauvel, 1927).

1.6.2 *Sabellaria alveolata* como biofiltro

Dos invertebrados marinhos anteriormente mencionados no ponto 8 (qualidade da água num cultivo integrado), os bivalves são o grupo mais estudado na sua tarefa de filtração, por razões económicas. Já com o grupo dos poliquetas a informação disponível é menor embora exista informação sobre o processo de filtração, velocidades e mecanismos de captura de partículas para algumas famílias como *Sabellidae* e *Sabellaridae*, por métodos de filmagem, medições da taxa de filtração e eficiência de retenção (Dubois *et al.*, 2005).

Dubois *et al.*, (2005) observou a espécie *S. alveolata* e constatou que o seu mecanismo de captura de partículas consiste num agrupamento de cílios laterais, que funcionam como uma bomba de sucção que gera um fluxo, direccionando partículas em suspensão para a tal região ciliar (entrada de água). Com estes movimentos, os cílios interceptam as partículas que são recolhidas pelos sulcos laterais (figura 1.5).



Fonte: A) upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Sabellaria_alveolata_b.JPG; B) Dubois *et al.*, 2005.

Figura 7- Representação fotográfica (A) e esquemática (B) dos órgãos de filtração na região anterior, posição ventral; B1- lóbulos cefálicos (LC); em cada lóbulo localiza-se um sulco primário (SP); cada sulco primário é dividido em sulcos secundários (SS); palpo (P); B2- representação dos sílios (Si) inseridos na extremidade dos sulcos secundários; parede cefálica (PC); boca (Bc).

Este mesmo autor já tinha referido em estudos anteriores (Dubois *et al.*, 2003), a eficiência desta espécie na captura de partículas com um diâmetro esférico $>4 \mu\text{m}$, e que partículas de dimensões $>5 \mu\text{m}$ podem ser retidas com uma eficiência de 100%. Dois anos mais tarde o mesmo autor (Dubois, *et al.*, 2005) verificou que o espaço entre os cílios é de pelo menos $30 \mu\text{m}$, concluindo que os movimentos causados pelos cílios estarão provavelmente envolvidos na alteração de correntes dentro da coroa de cílios, auxiliando a captura de partículas de tão pequenas dimensões.

Por observações de vídeo e análises histológicas foi também revelado nesse mesmo estudo a capacidade de produzir e libertar pseudofezes, uma adaptação às elevadas

concentrações de partículas retidas. As pseudofezes são compostas por agregados de partículas que são capturados, acumulados nos sulcos, transportados para a boca e expelidos posteriormente por esta, com o auxílio de cílios móveis que produzem “cordas” de muco que auxiliam na tarefa. As fronteiras dos sulcos são muito flexíveis e podem reter partícula de maiores dimensões como grãos de areia ou fragmentos de concha de alguns milímetros (Dubois *et al.*, 2005).

Atendendo às limitações biológicas da espécie, que vive em locais expostos a correntes marítimas e forte ondulação, é mencionada a utilização de um muco de elevada viscosidade que terá provavelmente a função de evitar a ressuspensão das partículas capturadas, bem como estar envolvido no transporte indiscriminado de partículas para posterior selecção. (Dubois *et al.*, 2005). Le Cam *et al.*, (2011) refere-se à secreção de um muco a que designa de cimento biomineralizado com propriedades visco-elásticas, produzido por organismos tubícolas. Uma das funções desta secreção é agregar grãos de areia e pedaços de concha de vários tamanhos formando tubos organizados em forma de galeria, de modo consistente.

Foi descrito para a espécie *Sabella spallanzanni*, pertencente à família *Sabellidae*, a sua capacidade em filtrar, acumular e remover eficazmente as bactérias utilizadas na água como única fonte de alimento, incluindo *Vibrios*. Demonstrou também a capacidade de promover a transferência de matéria orgânica a partir de coluna de água para o sedimento na forma de fezes e pseudofezes, assim como remover matéria orgânica do sistema através da compactação com o muco segregado pela poliqueta durante a construção tubícola (Licciano *et al.*, 2007b; Stabili *et al.*, 2010).

Resultados semelhantes podem ser obtidos neste presente estudo utilizando a espécie *Sabellaria alveolata*, que à semelhança da espécie *Sabella spalanzanni* reúne todas as potencialidades fisiológicas, como anteriormente descritas, para que seja possível diminuir a concentração bacteriana presente no sistema de cultivo. A análise das secreções mucosas não será realizada neste trabalho, nem a compreensão do seu papel na possível redução da carga bacteriana.

2. Objectivo Geral

O presente estudo pretende avaliar a influência da poliqueta *Sabellaria alveolata*, através da acção de biofiltração, na variação da carga bacteriana de um cultivo de *Solea senegalensis*, de modo a determinar a eficácia da acção preventiva da poliqueta filtradora em estudo, em casos de manifestação de vibriose. Para tal, foram determinados objectivos específicos que, no seu conjunto, permitiram clarificar e atingir o objectivo final.

2.1 Objectivos específicos

Por adição de uma concentração bacteriana de *V. harveyi* DSM 19623 no cultivo de *S. senegalensis*, avaliou-se a evolução da mesma concentração bacteriana em circuitos de água na presença e ausência do biofiltro ao longo do tempo, a fim de obter:

- A eficiência da filtração bacteriana na água, por contagem das unidades formadoras de colónias (UFC), ao longo do período de ensaio;
- A taxa de mortalidade registada na espécie *S. senegalensis* e a sua relação com presença/ausência do biofiltro.

Para cumprimento dos objectivos traçados, serão realizadas técnicas microbiológicas, histológicas e moleculares às amostras recolhidas durante o estudo.

3. Procedimentos

3.1 Organismos biológicos

Para realização deste estudo, nas instalações da Escola Superior de Tecnologias do Mar, *campus 4* do Instituto Politécnico de Leiria, foram utilizadas três espécies organismos vivos:

- O linguado branco, *Solea senegalensis*, sendo os exemplares juvenis adquiridos na estação do IPMA em Olhão, Algarve, em duas datas distintas (7/11/12 e 6/3/13);
- A estirpe bacteriana *Vibrio harveyi* DSM 19623, adquirida ao Instituto *Leibniz DSMZ* (banco Alemão de microrganismos e células) sendo mantida em estado de criopreservação com glicerol em alíquotas a - 80 °C (*Thermo, Electron Corporation*), de acordo com as instruções do produto;
- A poliqueta marinha *Sabellaria alveolata*, através de recolhas *in situ* de pequenos pedaços de colónia fragmentada, na zona intertidal da praia rochosa da Consolação, situada na costa de Peniche.

3.2 Sistema de cultivo

O sistema de cultivo utilizado é composto por quatro circuitos (C1, C2, C3 e C4), cada um com três tabuleiros (t1, t2 e t3) e o respectivo filtro, entre os quais ocorre a recirculação de água, não havendo trocas de água entre circuitos. Cada filtro é composto por três compartimentos. Após a entrada de água no filtro, esta é sujeita no primeiro compartimento a filtração mecânica (por acção da lã de vidro) e microbiológica (acção de *bioballs*). O segundo compartimento é reservado à acção de biofiltração pela poliqueta marinha em estudo, sendo deste modo ocupado apenas em alguns ensaios. O terceiro compartimento destina-se à bomba de água (*Prodac Magic Pump 550*) responsável pela circulação de água do respectivo circuito. A renovação de água é feita manualmente. A oxigenação da água foi garantida através da instalação de uma bomba de ar (*Elite 802*) em cada circuito. Para aquecimento da água dos circuitos foram utilizadas resistências (*Eheim jäger 3612*).

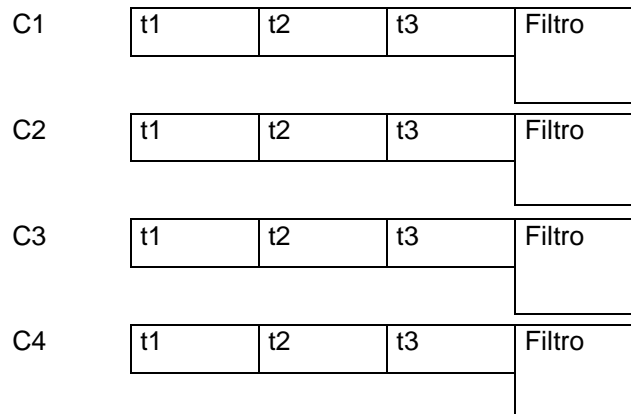


Figura 8- Representação esquemática do sistema de cultivo.

3.3. Aclimação do biofiltro

Após a recolha dos indivíduos *in situ*, procedeu-se à quebra da colónia em pedaços consecutivamente de menores dimensões, até obter tubos individualizados e encurtados. Deste modo foi possível eliminar os compartimentos vazios e contabilizar os indivíduos presentes, permitindo também eliminar outros organismos que se encontravam associados à colónia. A visualização de indivíduos dentro dos tubos era auxiliada com uma lupa (*Zeiss*) ou por incidência de luz.

Os pequenos tubos encontravam-se dispostos de modo organizado (boca para o mesmo lado) dentro do filtro de água do sistema de recirculação de água (SRA), sem a presença de qualquer outro organismo vivo em estudo. Os indivíduos eram alimentados diariamente com os resíduos de ração para linguado (Anexo I) que ficava depositado no filtro, simulando o processo natural de filtração do sistema.

Semanalmente ocorria a contagem de indivíduos, fora de água, para registo de mortalidade. Ao serem retirados da água os indivíduos recolhiam-se dentro do casulo, assumindo então que, pela sua capacidade de fixação às paredes do mesmo, todos os indivíduos encontrados no interior do casulo estavam vivos.

3.4 Sensibilidade de *S. senegalensis* a *V. harveyi*

A sensibilidade dos linguados ao agente bacteriano seria indicada pela incidência de mortalidade (cerca de 50% da população) no sistema de cultivo. Para tal, foram aclimatados em dois circuitos do sistema cerca de 228 linguados com o peso médio de 3g, distribuídos por 6 tabuleiros (três em cada circuito de água) cada um com capacidade para aproximadamente 4L de água, sendo imposta uma densidade média de aproximadamente 2kg m⁻². A temperatura média rondou os 19°C nos dois circuitos, um para realizar a infecção e outro como controlo. A ração era distribuída uma vez ao dia, após a verificação dos parâmetros de qualidade da água, sifonagem e reposição da mesma.

3.4.1 Preparação da dose letal (LD₅₀)

Para a recuperação bacteriana em condições de assepsia foi necessário recorrer à utilização de material previamente esterilizado, assim como para realização dos testes fenotípicos, evitando assim qualquer contaminação.

Tendo por base o volume máximo de água do circuito a infectar e a concentração bacteriana necessária para atingir a LD50 (dose letal para 50% da população calculou-se o volume de bactéria necessário para a infeção. Foi seleccionada a concentração inicial correspondente ao tubo nº5 da escala de McFarland por corresponder à concentração pretendida, >10⁸, descrita por Rico *et al.*, (2008).

A bactéria criopreservada a -80°C foi colocada em meio líquido TSB (*trytic soy broth*), durante 24h a 22°C. Após esse período de incubação, foram inoculados 100 microlitros de suspensão bacteriana, recolhidos assepticamente, em placas de Petri com meio sólido TSA (suplementado para ter uma concentração final de 1,5% de NaCl), com o auxílio de um espalhador estéril, que foram incubadas durante 24h a 22°C. Suspendeu-se a bactéria em solução salina (0,85%), preparando-se a quantidade necessária para a infecção até ser obtido o grau de turvação equivalente ao tubo 5 da escala de MacFarland.

3.4.2 Recuperação da estirpe bacteriana

O ensaio decorreu em 14 dias, durante os quais se procedeu à recolha dos mortos para análise microbiológica, quer no circuito de infecção quer no de controlo. Durante os primeiros dias, não foram realizadas trocas de água em nenhum dos circuitos, nem

adicionada ração para que a qualidade da água se mantivesse adequada pelo maior período de tempo possível. Os mortos recolhidos foram sujeitos a análise microbiológica. Como tal, cada linguado foi sujeito a necropsia em condições de assepsia para que pudesse ser feito inóculo do rim, fígado e baço de cada indivíduo, em meio de cultivo sólido selectivo TCBS (*Thiosulfate citrate bile salts-sucrose agar*), para incubação a 22°C durante 24h. Após este período, procedeu-se à repicagem da cultura inicial para meio sólido não selectivo TSA (*tryptic soy agar*), (1,5% de NaCl), para nova incubação nas mesmas condições. Depois de 24h seguiu-se a realização de testes fenotípicos para identificação bacteriana.

3.4.3 Identificação fenotípica da estirpe bacteriana

Segundo os estudos de recuperação e identificação de *V. harveyi* (DSM 19623) de cultivos de *S. senegalensis* descritos por Zorrilla *et al.*, (2003) e por Rico *et al.*, (2008) foram utilizados testes de caracterização fenotípica que, em conjunto com a chave de identificação de bactérias Gram negativas descrita por Buller (2004), serviram como referência para selecção dos testes de identificação utilizados neste presente trabalho.

Para identificação do género, foram efectuadas observações de microscopia óptica para verificar a mobilidade e morfologia da bactéria ao microscópio, com uma ampliação de 100x, sendo também realizado o teste da Oxidase e de Gram. Para se proceder à identificação da estirpe bacteriana foram utilizados meios de cultivo como *Muller Hinton* (Buller, 2004) para testar a susceptibilidade ao agente vibriostático O/129 (10µg) e resistência ao antibiótico ampicilina (10µg), meios para a arginina descarboxilase, ornitina descarboxilase e lisina descarboxilase (*Sigma-aldrich*), onde se efectuaram os testes para capacidade de descarboxilação de aminoácidos, solução salina (0,85%) (Buller, 2004) para reacção da β-galactosidase (ONPG), crescimento na ausência ou presença de NaCl, tendo sido utilizado o meio TSA (Buller, 2004) suplementado com diferentes concentrações de NaCl (0%, 8% e 10%), bem como a diferentes temperaturas (4°C, 22°C, 35°C e 40°C). Foi também utilizado meio de caseína (*Merk*) suplementado com 1,5% de NaCl para o teste Indol, fermentação de açúcares, no caso da glucose utilizando o meio *Kligler Iron Agar* (*Merk*) e para o manitol e sorbitol utilizando caldo base de vermelho de fenol (*Himedia*). Foi também realizado o teste para identificar a via para degradação da glucose, oxidativa ou fermentativa, recorrendo ao meio basal O-F (*API-23*), e o teste *Voges – Proskauer* em meio MR-VP (Buller, 2004). A capacidade da estirpe em estudo para emitir luminescência foi visualizada com auxílio de um meio de cultura luminescente (Buller, 2004).

3.5 Infecção bacteriana

Cerca de 194 linguados com peso médio de 10g, distribuídos aleatoriamente pelos 12 tabuleiros do sistema de cultivo, perfazendo uma densidade média de 1,5 Kg m⁻². Os indivíduos foram aclimatados a uma temperatura média de 19°C. Para compor o biofiltro foram divididos aleatoriamente cerca de 1500 poliquetas em suportes de rede em PVC, tendo sido colocados cerca 750 indivíduos previamente contabilizados em cada um dos filtros dos respectivos circuitos. Para este ensaio foram utilizados os quatro circuitos do sistema.

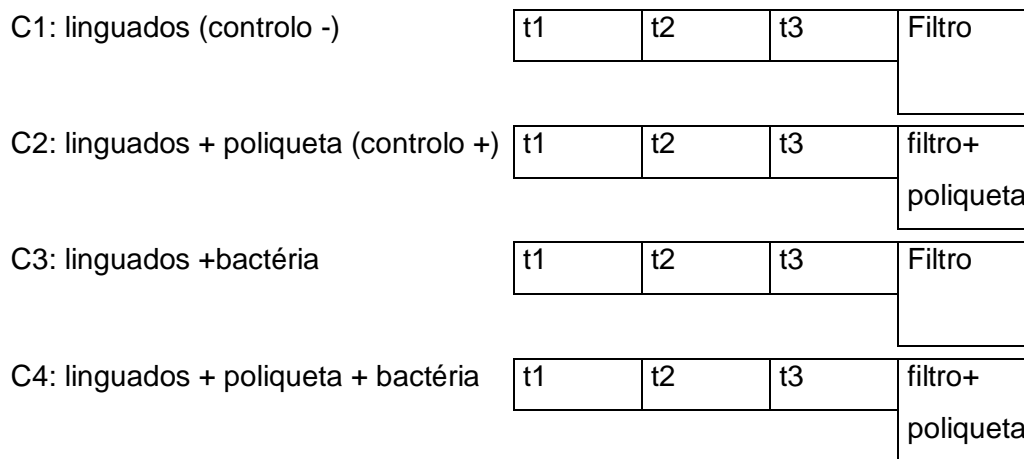


Figura 9- Representação esquemática da composição de cada circuito do sistema.

3.5.1. Relação entre unidades formadoras de colónias (UFC) e densidade óptica para *V. harveyi*

Para preparação da concentração pretendida (LD₅₀) nos circuitos a infectar, C3 e C4, foi determinada uma concentração bacteriana por leitura ao espectrofotómetro (*Thermo Electron Corporation, Helios alpha*) próxima do valor desejado, ou seja, uma concentração superior a 10⁸. Para tal foi feita uma suspensão bacteriana e depois foram efectuadas diluições em série da bactéria *V. harveyi*, cultivada previamente em TSB e incubada a 30°C (*Binder*) durante 24 horas. De cada diluição foi retirada uma amostra para leitura ao espectrofotómetro, num comprimento de onda de 600 nm. Utilizando as mesmas diluições já preparadas, foi efectuado o plaqueamento em duplicado de duas diluições, 10⁻⁹ e 10⁻¹⁰ em TSA (1,5% de NaCl) e incubadas a 30°C durante 24 horas. Com os resultados obtidos das contagens de UFC e com os valores resultantes da leitura ao espectrofotómetro foi possível determinar uma concentração bacteriana que se aproximasse do valor pretendido (>10⁸),

tendo sido obtido um valor de $65,5 \cdot 10^9$. Para preparar os inóculos bacterianos foi utilizada a mesma solução-mãe de *V.harveyi* cultivada anteriormente. Foi então repicada a cultura disponível em TSB para cerca de placas de TSA (1,5% de NaCl), durante um período de incubação de 24h a 30°C. Procedeu-se novamente à leitura ao espectrofotómetro.

3.5.2 Análise microbiológica à Água

Imediatamente antes da infecção com *V. harveyi*, foi recolhida uma amostra de água de cada tabuleiro do sistema (12 tabuleiros), para análises microbiológicas. Em condições de assepsia, cada amostra foi alvo de diluições decimais sendo posteriormente plaqueadas as diluições, 10^{-9} e 10^{-10} , de todos os tabuleiros, em meio TSA (1,5% de NaCl) e TCBS, ambos em duplicado. A incubação ocorreu nas 24 horas seguintes a 30°C. Este procedimento de recolha de amostras, diluição das mesmas e plaqueamento em TSA e TCBS em duplicado, foi repetido após a infecção (entre uma a duas horas depois) e consecutivamente de dois em dois dias até terminar o ensaio, 10 dias depois. A temperatura média da água manteve-se cerca dos 19°C.

3.5.3 Amostragem de *S. senegalensis* e *S. alveolata*

A amostragem de linguados ocorreu também em diferentes etapas, isto é, antes, durante e após o período de infecção. Antes da infecção nos circuitos 3 e 4, foram recolhidos aleatoriamente três indivíduos de todos os circuitos, aleatoriamente, para análise microbiológica e molecular. Durante o período da infecção, foram apenas recolhidos os indivíduos mortos, aleatoriamente divididos para análise microbiológica e molecular. No final do período de infecção (10 dias depois), foram recolhidos de modo aleatório três indivíduos de cada circuito para análise molecular e histológica.

Os indivíduos sujeitos a análise microbiológica foram necropsiados, em condições de assepsia e com o auxílio de uma ansa estéril foi recolhida uma amostra do rim, fígado e baço, para inocular em meio TCBS e TSA (1,5% de NaCl). A incubação ocorreu a 30°C durante 24 horas. O crescimento bacteriano obtido em ambos os meios foi registado, tendo ainda ocorrido a repicagem de colónias isoladas em meio TSA (1,5% de NaCl) para meio de cultivo luminescente (Buller, 2004), incubado nas mesmas condições e com registo do resultado obtido.

Para proceder à análise molecular os indivíduos recolhidos foram necropsiados, garantindo as condições de assepsia, para que se pudesse retirar uma porção dos órgãos rim, fígado e baço. As amostras recolhidas foram colocadas em tubos *Eppendorff* estéreis, imergidas em solução DESS para preservação dos tecidos. As amostras foram separadas por dias e por circuitos, e posteriormente enviadas para o laboratório *IFAPA - Centro Agua del Pino* em Espanha, onde foi aplicada a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), segundo o procedimento descrito por Pang *et al.*, (2006).

Os indivíduos *S. alveolata* foram recolhidos somente para análise molecular, tendo sido amostrados antes da infecção e no final da mesma. Os exemplares foram retirados, aleatoriamente de ambos os circuitos onde se encontravam, C2 e C4, da bioconstrução envolvente e seccionados, em condições de assepsia e com o auxílio de uma lâmina estéril, de modo a isolar uma porção do organismo e preservação do mesmo em solução DESS (Yoder *et al.*, 2006), num *Eppendorff* estéril. As amostras recolhidas foram sujeitas à técnica de PCR.

Foram ainda realizadas análises histológicas à espécie *S. senegalensis*. Para tal, foram efectuadas através recolha dos órgãos rim, fígado e baço dos indivíduos em estudo, em condições de assepsia, tendo as amostras sido preservadas em formol tamponado a 4%, em *Eppendorff* estéreis identificados consoante a data da recolha da amostra e o circuito correspondente. Posteriormente todas as amostras recolhidas foram colocadas no processador de tecidos (*Leica TP 1020*) tendo-se feito cortes de rim, fígado e baço que deram origem a preparações microscópicas, que foram coradas com hematoxilina eosina (H&E) (procedimento histológico em anexo II).

3.6 Análise estatística

Em todas as análises estatísticas efectuadas, os pressupostos para a execução do referido método (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados.

Para os casos em que se observou a violação dos referidos requisitos, foi realizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Sempre que adequado, foi executado o teste de *Tukey* para comparações múltiplas. Adicionalmente foi ainda analisada a associação entre a mortalidade registada e cada um dos circuitos considerados, mediante a realização do teste de independência do Qui-Quadrado.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 0.05 (i.e., *p-value* < 0,05). Todos os cálculos foram realizados com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics 20.0.

De salientar também que os dados das contagens microbiológicas (UFC mL⁻¹) correspondem aos valores médios. Estes foram logaritmizados ($\log x + 1$), por forma a atenuar as discrepâncias na magnitude de valores.

4. Resultados

4.1 Sensibilidade de *S. senegalensis* a *V. harveyi*

4.1.1 Registo de mortalidade

Durante este ensaio, foi registada diariamente a mortalidade ocorrida em ambos os circuitos em estudo, podendo observar-se na figura 10 valores de mortalidade mais elevados no circuito infectado (CI) e com registo iniciado 24 horas após a infecção. Já no circuito controlo (CC), além de uma menor frequência de registo, este inicia-se ao sexto dia de ensaio.

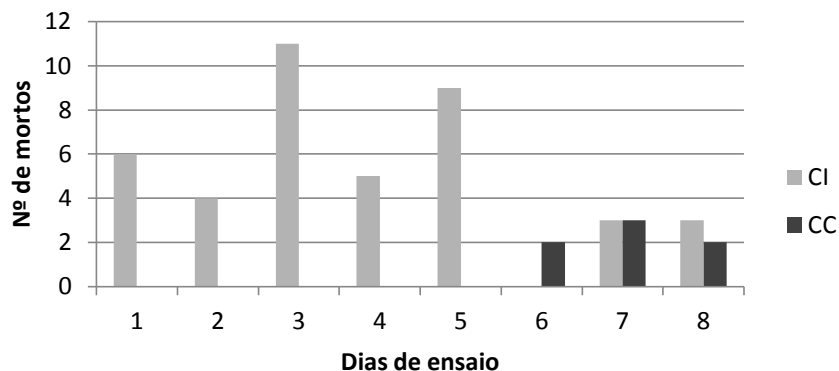


Figura 10- Registo diário da ocorrência de mortalidade de linguados em ambos os circuitos representados por CC, circuito controlo e CI, circuito de infecção, durante 8 dias de ensaio.

4.1.2 Taxa de mortalidade

No circuito de infecção (CI) foram registados 41 indivíduos mortos ao longo de 8 dias de ensaio, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 49,40%, como se verifica na tabela III. No circuito controlo (CC) foi registada uma taxa de mortalidade de cerca de 8% devido aos 7 indivíduos recolhidos nos últimos três dias do ensaio.

Tabela III- Cálculo da taxa de mortalidade ocorrida durante o ensaio de sensibilidade dos linguados à bactéria, nos dois circuitos em estudo.

Circuito	CC	CI
Nº total indivíduos	87	83
Nº total de mortos	7	41
Taxa de mortalidade (%)	8,05	49,40

4.1.3 Recuperação e identificação bacteriana

4.1.3.1 Circuito de infecção

Os peixes mortos recolhidos do CI foram analisados por técnicas de microbiologia, tendo-se procedido ao inóculo do rim, fígado e baço em meio de cultura TCBS e TSA (1,5% NaCl), onde foi verificado crescimento bacteriano com alteração da cor inicial do meio, de verde para amarelo e o crescimento em *swarming*, respectivamente, após um período de 24h de incubação a 22°C para ambos os meios de cultivo. Foi efectuada a purificação das colónias que se pretendiam identificar, tendo sido feita repicagem para meio TSA (1,5% NaCl), incubado nas 24h seguintes novamente a 22°C.

Com as colónias isoladas foram realizados os testes mencionados na tabela IV. Por visualização ao microscópio óptico, numa ampliação de 100x, foi observada a mobilidade e forma celular. Os testes de Gram e oxidase complementaram a identificação do género bacteriano da estirpe em estudo. Para identificação da espécie foram utilizados os testes ONPG (β -galactosidase), Indol, a sensibilidade ao composto vibriostático O/129 (10 μ g) e ao antibiótico ampicilina (10 μ g), teste de VP (Voges-Proskauer), crescimento a diferentes concentrações de NaCl (8 e 10%) e ainda o crescimento a diferentes temperaturas (4°C, 35°C e 40°C). Foram também realizados testes de reacção aos aminoácidos LDH (lisina), ODC (ornitina) e ADH (arginina), teste de fermentação-oxidação de glucose (O-F), fermentação dos açúcares manitol, sorbitol e glucose e emissão de luminescência pelas colónias bacterianas cultivadas em meio luminescente (Buller, 2004). O resultado esperado para cada um dos testes indica que todos os resultados obtidos coincidem na identificação da espécie *V. harveyi*.

Tabela IV- Registo do resultado dos testes de identificação bacteriana aplicados à estirpe bacteriana recuperada no circuito infectado; positivo (+); negativo (-).

Teste	Resultado	Teste	Resultado
TCBS	Amarelo	4 ^o C	-
<i>Swarming</i>	+	35 ^o C	+
Forma	Bacilo curvo	40 ^o C	+
Mobilidade	+	LDH	+
Gram	-	ODC	+
Oxidase	+	ADH	-
ONPG	-	Manitol	+
Indol	+	Sorbitol	+
0/129 (10µg)	Resistente	Glucose	Fermentativo
AMP (10µg)	Sensível	0-F	Fermentativo
8% NaCl	+	Luminescência	+
10% NaCl	-		

4.1.3.2 Circuito Controlo

Os resultados descritos na tabela V, foram obtidos na realização de testes para identificação da estirpe bacteriana recuperada dos órgãos internos (rim, fígado e baço) dos peixes mortos recolhidos no circuito controlo. Os órgãos internos rim, fígado e baço dos linguados analisados apresentaram crescimento e formação de colónias de coloração amarela em TCBS, mas em contrapartida nenhum deles apresentou crescimento bacteriano em *swarming* em meio TSA (1,5% NaCl). Um dos isolados apresentou resultado positivo no teste de Oxidase, resultado positivo para o teste de Gram, e noutro isolado observou-se crescimento bacteriano a 35^oC.

Tabela V- Registo do resultado dos testes de identificação bacteriana aplicados aos isolados bacterianos recuperados dos órgãos internos de indivíduos mortos no C3; positivo (+); negativo (-); Swa=swarming; Mob=mobilidade; Lum=luminescência.

	TCBS	Swa	Mob	Gram	Oxidase	4 ^o C	35 ^o C	40 ^o C	Lum
Isolado 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Isolado 2	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Isolado 3	+	-	-	-	-	-	+	-	-

4.2. Infecção bacteriana

4.2.1 *S. senegalensis* e *S. alveolata*

4.2.1.1 Taxa de mortalidade de *S. senegalensis*

Neste ensaio foram utilizados os quatro circuitos do sistema, representados na figura 9, tendo sido registada a ocorrência de mortalidade em cada circuito. A tabela VI indica que no C1, controlo negativo, a taxa de mortalidade atingiu os 10,4%. No C2, representando o controlo positivo (sem infecção bacteriana mas com biofiltro), o valor foi de 2,1%. O C3, com infecção bacteriana e sem biofiltro, apresentou uma taxa de mortalidade de 35%, tendo o último circuito (C4), com infecção bacteriana e biofiltro demonstrado uma taxa de 20%.

Tabela VI- Taxa de mortalidade de linguados registada durante o período de infecção.

Circuito	C1	C2	C3	C4
Nº total indivíduos	48	47	49	50
Nº total de mortos	5	1	17	10
Taxa de mortalidade (%)	10,4	2,1	35	20

4.2.1.2 Análise estatística da mortalidade de *S. senegalensis*

Relativamente à mortalidade registada, é possível verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas quando comparados os quatro circuitos (*Kruskal-Wallis*, $p\text{-value} < 0,05$). Na figura 11 estão representadas diferenças estatisticamente significativas entre circuitos não infectados, C1 e C2 ($p\text{-value} = 0,006$) e ainda entre C1 e C3 ($p\text{-value} = 0,04$), bem como entre C2 e C4 ($p\text{-value} = 0,000$). Entre circuitos infectados (C3 e C4) não foram evidenciadas diferenças de mortalidade estatisticamente significativas ($p\text{-value} = 0,119$).

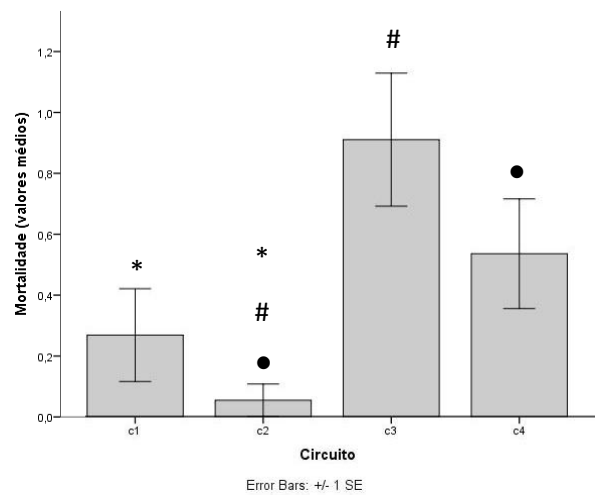


Figura 11- Mortalidade registada durante o período de infecção; os valores são expressos como média \pm erro-padrão (SE); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre C1 e C3 (p -value < 0,05); (#) Diferenças estatisticamente significativas entre C2 e C3 (p -value < 0,05); (•) Diferenças estatisticamente significativas entre C2 e C4 (p -value < 0,05).

No seguimento dos resultados obtidos, foi averiguada a possível associação entre a mortalidade e o circuito. Neste sentido, os resultados (figura 12) permitem concluir a existência de uma dependência (Qui-Quadrado, p -value = 0,017) entre ambos os factores em comparação (mortalidade *versus* circuito), confirmando maior mortalidade nos circuitos infectados, como seria expectável

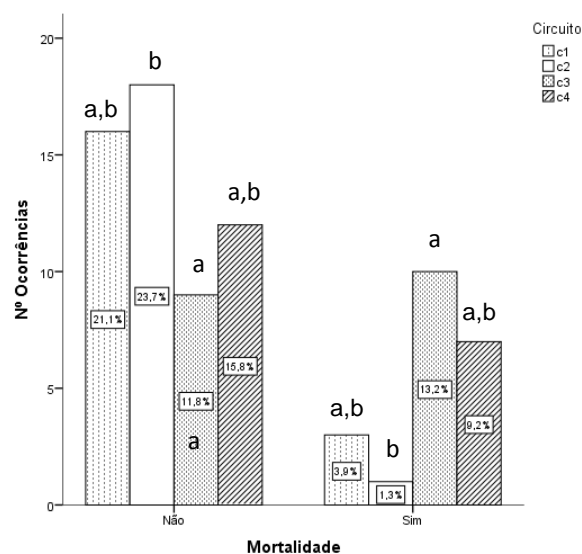


Figura 12- Mortalidade *versus* circuito; Cada letra denota um subconjunto do factor Circuito cujas proporções não diferem significativamente entre si, ao nível de significância de 0,05 (Teste de Qui-Quadrado).

4.2.1.3 Análise microbiológica de *S. senegalensis*

Os linguados recolhidos para análise microbiológica apresentaram, por inóculo dos órgãos internos (rim fígado e baço), nos períodos antes, durante e final da infecção, crescimento nos três meios de cultivo bacteriano representados na tabela VII (abaixo indicada). De salientar que foram recolhidas amostras em todos os circuitos para cada período de infecção, sendo o resultado obtido para cada um coincidente entre todos, sem distinção. Em TCBS foram visualizadas colónias de coloração amarela, em meio TSA (1,5% de NaCl) foi possível registar o crescimento e também a emissão de luminescência, tal como observado em meio luminescente (Buller, 2004).

Tabela VII- Crescimento bacteriano verificado em todos os circuitos, ao longo do período de infecção, em três meios de cultivo distintos, TCBS, TSA (1,5% de NaCl) e meio de luminescência; positivo (+).

Período	Meio de Cultivo	Swarming	Luminescência	Coloração amarela
Antes	TCBS			+
	TSA	+	+	
	Luminescência	+	+	
Durante	TCBS			+
	TSA	+	+	
	Luminescência	+	+	
Final	TCBS			+
	TSA	+	+	
	Luminescência	+	+	

4.2.1.4 Análise molecular de *S. senegalensis* e *S. alveolata*

A análise molecular efectuada às amostras recolhidas nos períodos antes, durante e final do período de infecção, encontra-se abaixo indicada (tabela VIII), descrevendo a presença do *V. harveyi* (+), a ausência do mesmo (-), ou os resultados positivos pouco claros (+?). Para o dia 24 de Abril existem amostras dos quatro circuitos em triplicado. No período durante a infecção, foram apenas amostrados indivíduos mortos, não existindo por

isso mais do que um indivíduo por circuito num mesmo dia, à excepção do dia 16 de Maio, em que foram recolhidos dois indivíduos no circuito C3 para análise.

Tabela VIII- Registo da análise PCR efectuada em linguados recolhidos dos quatro sistemas, antes, durante e no final do período de infecção; positivo (+); negativo (-).

Circuito	C1	C2	C3	C4
Antes	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
Durante			+	
			+	
			+	+
	+	+	+	+
			+	+
Final			+	
	-		-	+?
	+?		+	

As amostras de poliquetas recolhidas para análise molecular, nos periodos antes, durante e final das infecções, foram também analisadas pela técnica de PCR (tabela IX), os resultados obtidos revelam a ausência do *V. harveyi* nas amostras recolhidas antes e depois da infecção.

Tabela IX- Registo da análise PCR efectuada em poliquetas recolhidas em triplicado dos sistemas C2 e C4, antes e no final do período de infecção; negativo (-).

Circuito	C2	C4
Antes	-	-
Final	-	-

Na figura 13 encontra-se o resultado obtido após submetidas as amostras de *S. senegalensis* e *S. alveolata* pela técnica de PCR em gel de agarose. Nos dois poços representados por C+ (controlo positivo), é possível visualizar uma banda de material genético da estirpe *V. harveyi* DSM 19623. Os poços identificados pelos números 6, 13, 21, 28, 33, e 35 demonstraram a ausência da bactéria nos seus tecidos, sendo os poços 31 e 32 considerados como positivos pouco claros. Os restantes poços identificados por numeração árabe representam as amostras onde foi detectado material genético de *V. harveyi*, confirmando a sua presença.

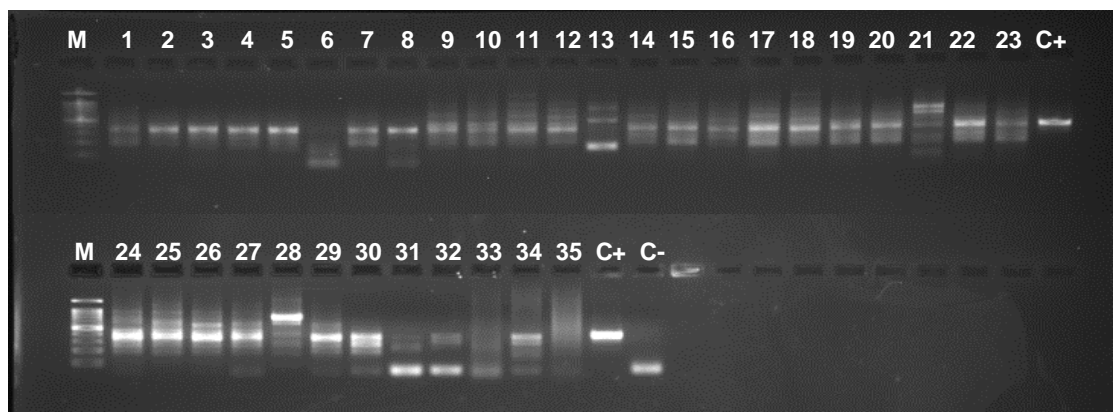


Figura 13- Resultado da análise de PCR em 35 amostras de *S. senegalensis* e *S. alveolata* em contacto com o *V. harveyi*; M = Marcador de peso molecular (100pb DNA gTp-ladder, *gTPbio*); 1= (+) *S. senegalensis* em C1; 2= (+) *S. senegalensis* em C3; 3= (+) *S. senegalensis* em C2; 4= (+) *S. senegalensis* em C3; 5= (+) *S. senegalensis* em C4; 6= (-) *S. alveolata* em C4; 7= (+) *S. senegalensis* em C2; 8= (+) *S. senegalensis* em C1; 9= (+) *S. senegalensis* em C4; 10= (+) *S. senegalensis* em C3; 11= (+) *S. senegalensis* em C3; 12= (+) *S. senegalensis* em C4; 13= (-) *S. alveolata* em C2; 14= (+) *S. senegalensis* em C2; 15= (+) *S. senegalensis* em C1; 16= (+) *S. senegalensis* em C1; 17= (+) *S. senegalensis* em C3; 18= (+) *S. senegalensis* em C4; 19= (+) *S. senegalensis* em C3; 20= (+) *S. senegalensis* em C3; 21= (-) *S. alveolata* em C2; 22= (+) *S. senegalensis* em C1; 23= (+) *S. senegalensis* em C2; 24= (+) *S. senegalensis* em C4; 25= (+) *S. senegalensis* em C3; 26= (+) *S. senegalensis* em C4; 27= (+) *S. senegalensis* em C3; 28= (-) *S. alveolata* em C4; 29= (+) *S. senegalensis* em C2; 30= (+) *S. senegalensis* em C3; 31= (+?) *S. senegalensis* em C4; 32= (+?) *S. senegalensis* em C1; 33= (-) *S. senegalensis* em C1; 34= (+) *S. senegalensis* em C4; 35= (-) *S. senegalensis* em C3 ; C+ = controlo positivo (*V. harveyi* DSM 19623); C- = Controlo negativo.

4.2.1.5 Análise histológica de *S. senegalensis*

Foram recolhidas para análise histológica amostras de rim, fígado e baço de indivíduos seleccionados aleatoriamente. Por microscopia óptica numa ampliação de 400x, foram obtidas imagens como as representadas na figura 15. Cada compartimento da imagem identificado como A), B), C) e D) representa uma amostra de fígado correspondente a um individuo do C1, C2, C3 e C4, respectivamente. A nível celular verifica-se então a inexistência de danos ou corpos estranhos ao tecido.

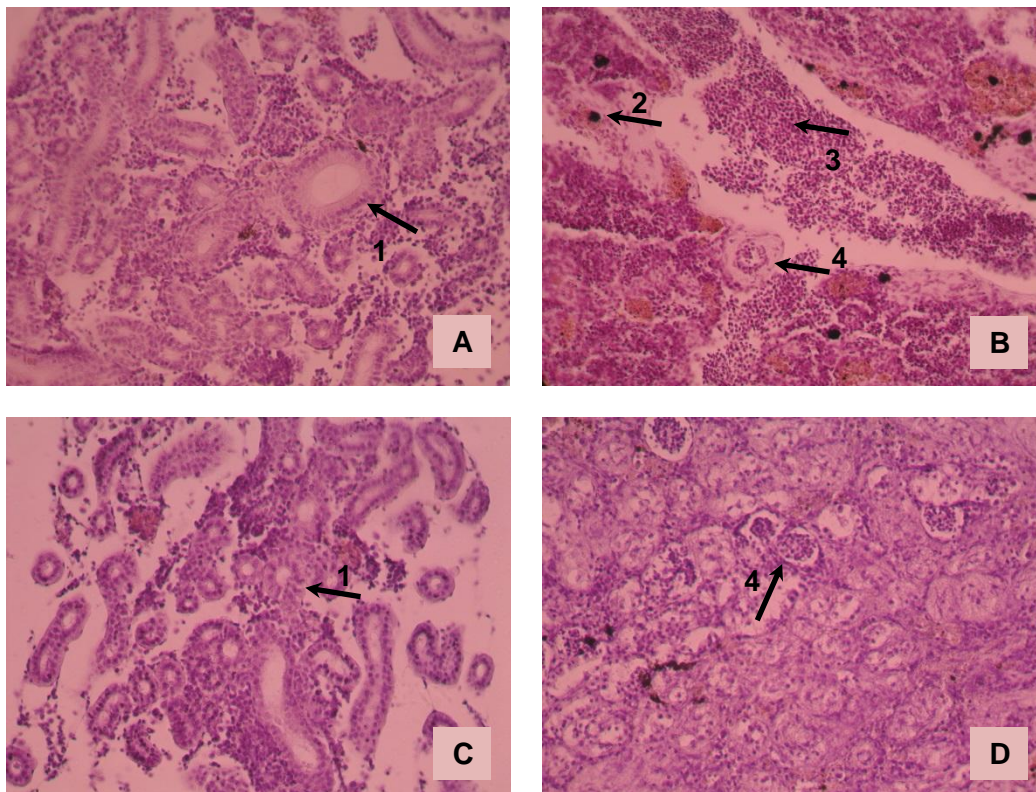


Figura 14- Preparações histológicas coradas com H&E, de rim de indivíduos amostrados no período de infecção, nos diferentes circuitos, numa ampliação de 400x; A) indivíduo do C1; B) indivíduo do C2; C) indivíduo do C3; D) indivíduo do C4; 1) nefrónios; 2) melanomacrófagos; 3) epitélio tubular; 4) glomérulos de Malpighi.

4.2.2 Água de Cultivo

4.2.2.1 Análise microbiológica e estatística das contagens UFC

- Antes e depois da infecção

Nas figuras 16 A e 17 A, encontram-se os resultados das contagens microbiológicas (UFC mL⁻¹) antes e depois da infecção, em meio de cultura TSA (1,5% de NaCl). Em todos os circuitos verifica-se um ligeiro aumento do número de bactérias no momento depois da infecção, sendo que o circuito 2 foi o que demonstrou maior aumento, embora seja um circuito controlo. O circuito 4 revelou valores superiores tanto antes, como depois da infecção.

Comparando os dois meios de cultura relativamente às contagens microbiológicas antes e depois da infecção (Figura 16 A e B), o número de bactérias demonstrou algumas variações entre estes. O circuito 4 que antes da infecção, em TSA (1,5% NaCl), revelou

elevado número de contagens e em TCBS (como também se pode ver na figura 16 B) verificou-se uma diminuição significativa do mesmo. No circuito 2 observou-se maior número de bactérias em TSA (1,5% NaCl) também antes da infecção, e no circuito 3 houve aumento em TCBS depois da infecção.

Relativamente à análise estatística comparando as contagens antes e depois da infecção, tanto em meio TSA como em TCBS (figura 17 A e B, respectivamente), não foram registadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas.

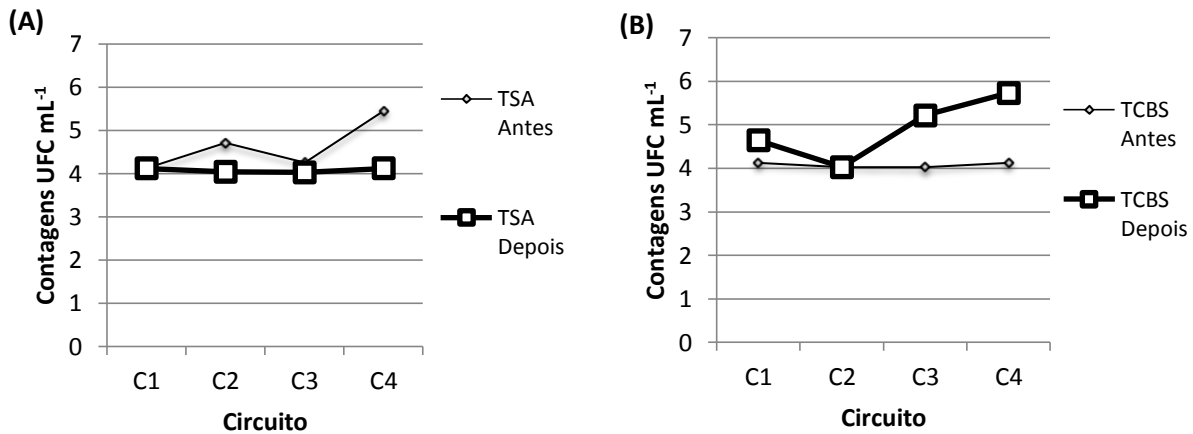


Figura 15- Comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ nos quatro circuitos, antes e depois da infecção; A) contagens em meio TSA (1,5% NaCl); B) contagens em meio TCBS; os valores das contagens encontram-se logaritmizados (log x+1).

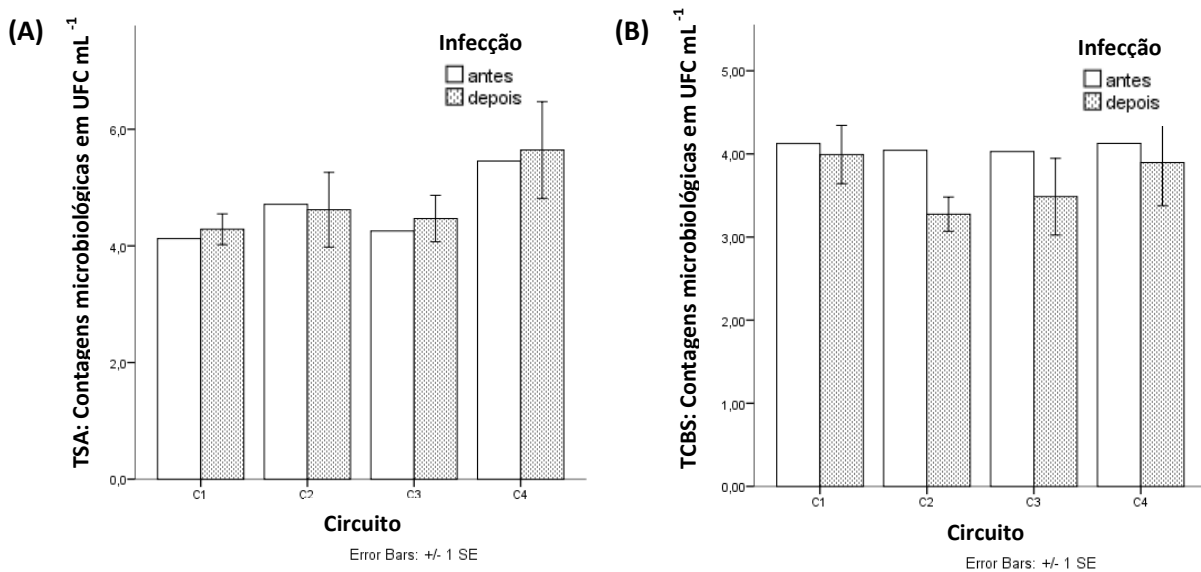


Figura 16- Análise estatística 1way-ANOVA para comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ nos quatro circuitos, no momento antes e depois da infecção; A) contagens em meio TSA (1,5% NaCl); B) contagens em meio TCBS; os valores são expressos como média ± erro-padrão (SE) e encontram-se logaritmizados (log x+1).

- No decorrer da infecção

As contagens microbiológicas médias em UFC mL⁻¹ realizadas em TSA (1,5% de NaCl), comparando os quatro circuitos utilizados para o ensaio experimental, no decorrer da infecção, apresentam-se na figura 18 A. Verifica-se então que ocorre maior número de bactérias no C4, sendo que o C1 foi onde se obtiveram valores de contagem inferiores. Os circuitos controlo revelaram constante diminuição ao longo dos três dias analisados, ao contrário dos circuitos com infecção, onde houve aumento no segundo dia seguindo-se de diminuição acentuada no último dia analisado.

Em relação às contagens realizadas em TCBS (figura 18 B) verifica-se que para todos os circuitos são apresentados valores muito semelhantes, observando-se valores superiores em relação ao primeiro dia nos circuitos 3 e 4, como seria expectável devido à infecção com *V. harveyi*. Os circuitos infectados revelam uma maior diminuição do número de bactérias no último dia, sendo que o circuito quatro demonstra uma diminuição ligeiramente maior.

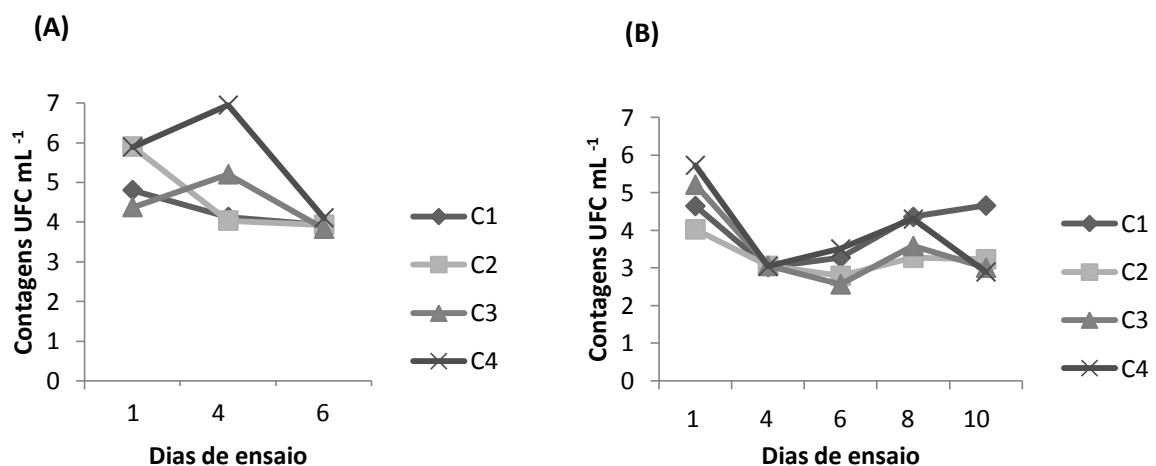


Figura 17- Comparação das contagens microbiológicas em UFC mL⁻¹ realizadas nos quatro circuitos, durante diferentes dias do ensaio; A) em meio de cultivo TSA (1,5% NaCl); B) em meio de cultivo TCBS; os valores das contagens encontram-se logaritizados (log x+1).

No que respeita às contagens microbiológicas realizadas em TSA (figura 19 A), os resultados não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre circuitos (ANOVA, *p-value* = 0,144), revelando diferenças entre datas (*Kruskal-Wallis*, *p-value* = 0,019). Ditas diferenças são observadas no dia 1 quando comparado com o dia 6 (*p-value* = 0,014).

Os resultados estatísticos em TCBS (figura 19 B) revelaram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre circuitos (ANOVA, *p-value* = 0,543), mas

existem diferenças estatisticamente significativas entre datas. (*Kruskal-Wallis*, p -value = 0,011). Mais concretamente, ditas diferenças verificam-se no dia 1 quando comparado com os dias 4 (p -value = 0,005) e 6 (p -value = 0,005).

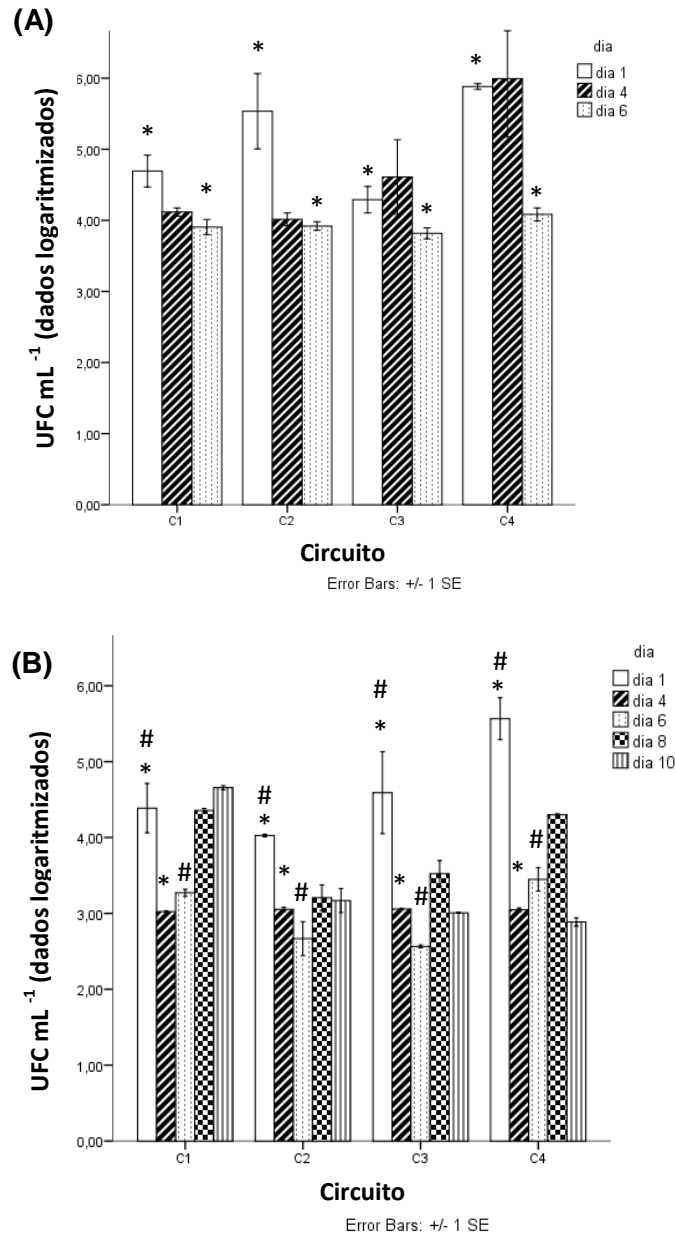


Figura 18- Análise estatística 1way-ANOVA das contagens microbiológicas realizadas nos quatro circuitos, durante os vários dias do ensaio; os valores são expressos como média \pm erro-padrão (SE); A) em meio TSA (1,5% NaCl) (UFC mL^{-1}); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 6 (p -value < 0,05); B) em meio TCBS (UFC mL^{-1}); (*) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 4 (p -value < 0,05); (#) Diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 6 (p -value < 0,05).

5. Discussão

No ensaio de avaliação da sensibilidade dos linguados ao *V. harveyi*, foram obtidos resultados através da taxa de mortalidade resultante no circuito infectado em relação ao circuito controlo. Verifica-se então na figura 10 que a mortalidade no circuito infectado ocorreu desde o primeiro dia de ensaio, contrastando com o circuito controlo como seria de esperar. A mortalidade resultante do circuito controlo, tendo sido registada apenas ao sexto dia de ensaio, pode ser justificada pela ausência de alimento fornecido, uma vez que esta acção iria contribuir para uma degradação mais rápida da qualidade da água, que por sua vez se manteve sem renovação durante todo o ensaio para manter a concentração bacteriana introduzida. Na tabela III verifica-se que a taxa de mortalidade ocorrida no circuito infectado foi de 49,40%, muito próxima de 50% como seria de esperar ao aplicar uma concentração bacteriana necessária para atingir a LD50, descrita por Rico *et al.*, (2008).

Sabe-se ainda que a mortalidade causada no circuito infectado foi causada por *V. harveyi*, após o processo de recuperação e identificação microbiológica da bactéria dos órgãos internos rim, fígado e baço de indivíduos recolhidos no CI, como se verifica pelos resultados apresentados na tabela III. Por microscopia óptica foi observada a morfologia em forma de bacilo curvo e a presença de mobilidade, características comuns no género *vibrio* (González-Párraga *et al.*, 2011). Nos restantes testes de identificação fenotípica do *V. harveyi* (tabela IV) foram também obtidos resultados coincidentes com a bibliografia (Zorrilla *et al.*, 2003; Buller, 2004; Rico *et al.*, 2008).

Ao terem sido obtidos os resultados esperados, confirma-se a presença do *V. harveyi* nos linguados mortos do circuito infectado. Este resultado permite afirmar que os linguados foram sensíveis à presença do *Vibrio* numa concentração bacteriana $>10^8$, de acordo com Rico *et al.*, (2008).

No circuito controlo foram também recolhidos indivíduos para análise microbiológica. No entanto, a espécie ou espécies bacterianas recuperadas não foram identificadas, confirmando-se apenas pelos resultados obtidos que não se tratava de *V. harveyi*.

No ensaio de infecção bacteriana foi induzida a concentração de *V.harveyi* em dois circuitos, C3 e C4 sendo que um deles (C4) possuía, no sistema de filtragem de água, uma componente biológica adicional, a poliqueta filtradora *Sabellaria alveolata*. No C1 e C2 encontram-se os circuitos controlo, com poliqueta e sem poliqueta no filtro, respectivamente (esquema do sistema utilizado na figura 9).

A taxa de mortalidade de 35% registada no C3, circuito infectado e sem poliqueta, não atingiu o valor esperado ao ser administrada a LD₅₀ (tabela VI). O facto de a bactéria ser oportunista em situações de debilidade dos peixes, não se manifestando por isso muito patogénica poderá estar na origem deste resultado (Austin & Zhang, 2006). Outra possibilidade pode dever-se ao facto dos peixes terem sido anteriormente expostos a este agente patogénico, muito comum em ambientes marinhos, no local onde cresceram até à aquisição, criando assim alguma imunidade. Esta capacidade pode ser relacionada com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que no ensaio de sensibilidade os linguados demonstraram ser susceptíveis à LD₅₀ de *V. harveyi* aplicada, enquanto no ensaio de infecção seguinte, peixes da mesma desova dos anteriores, mas adquiridos posteriormente no mesmo local (IPMA), manifestaram resistência à mesma concentração bacteriana, aplicada nas mesmas condições de cultivo. Este facto fundamenta a hipótese de que os linguados, em contacto com o *V. harveyi* em concentrações insuficientes para se manifestar, têm capacidade para adquirir uma resposta imune adaptativa. Deste modo estariam aptos a oferecer resistência a uma infecção induzida numa concentração suficiente para causar mortalidade a 50% da população.

Na tabela VI encontram-se também as taxas de mortalidade obtidas nos restantes circuitos. A menor taxa de mortalidade registada corresponde ao C2, com 2,1% (circuito controlo com poliqueta no filtro). As diferenças de mortalidade registadas entre o C1 (10,4%) e C2 foram estatisticamente significativas, demonstrando que a presença da poliqueta poderá ter influenciado na redução da taxa de mortalidade registada no C2. Muito embora se tratem de circuitos controlo, as bactérias presentes na água de cultivo, para além da carga bacteriana introduzida experimentalmente, poderão ter sido eficazmente filtradas pelo biofiltro. Este resultado coincide com a referência de Dubois *et al.*, (2009) que sugere a capacidade de filtração constante como modo de alimentação, estando a espécie adaptada para sistemas de elevada carga de partículas suspensas na água. O C4 registou a segunda maior taxa (20%), como seria de esperar, uma vez que também foi sujeito a infecção. No entanto, comparando o C3 com o C4, não foram detectadas diferenças de mortalidade estatisticamente significativas, como se pode ver na figura 11, o que impede o relacionamento da actividade da poliqueta com a maior ou menor sobrevivência dos linguados. Dubois *et al.*, (2009) sugere que o estado fisiológico da *S. alveolata*, mais precisamente o estado reprodutivo, possa ter influenciado a sua estimativa da taxa média de depuração da poliqueta, uma vez que realizou dois estudos em épocas temporais diferentes, permitindo a sua comparação. O primeiro foi realizado no inverno (quando os indivíduos estavam sob actividade e necessidade fisiológicas mínimas) e mais tarde (2009) com

recurso a amostras recolhidas na primavera, obteve uma estimativa sete vezes superior à anterior. Deste modo é possível sugerir que a ausência de diferenças estatisticamente significativas obtidas na taxa de mortalidade possam ter sido influenciadas pelo estado fisiológico das poliquetas, uma vez que o presente estudo foi realizado no período de inverno. Comparando as taxas de mortalidade obtidas nos quatro circuitos, é possível associar maiores taxas de mortalidade aos circuitos infectados. Entre os demais circuitos existiram diferenças estatisticamente significativas entre o C1 e o C3 e ainda entre o C2 e o C3 (figura 11). Estas diferenças são expectáveis, pois a comparação surge nos três casos entre um circuito controlo e um circuito infectado. Ainda assim, relacionando-se mortalidade *versus* circuito (figura 12) verificou-se que existe dependência entre estes dois factores, demonstrando que os circuitos 3 e 4 obtiveram maior ocorrência de número de mortos em relação aos circuitos controlo. Isto indica que a maior mortalidade observada foi dependente dos locais com infecção.

Antes de induzir a infecção, bem como durante e no final do período de ensaio, foram recolhidos linguados para análise microbiológica em todos os circuitos em estudo. Foram utilizados apenas os meios de cultivo TCBS, TSA (1,5%NaCl) e meio de Luminescência (Buller, 2004), onde foram obtidos resultados positivos para todos os circuitos, nos três períodos de análise (tabela VII). Os resultados positivos indicam a possibilidade de se tratar do crescimento de um *Vibrio*. Com os resultados obtidos expôs-se a possibilidade da bactéria em estudo já se encontrar presente antes do ensaio.

Os órgãos internos dos linguados em estudo foram ainda submetidos a análise molecular, pela técnica de PCR (tabela VIII). A amostragem efectuada antes da infecção resultou da recolha de indivíduos vivos, indica a presença de *V. harveyi* nos peixes amostrados em todos os circuitos, sem excepção. O que indica fortemente para a possibilidade anteriormente mencionada, que os linguados já poderiam ter estado em contacto com a bactéria em estudo e assim ter adquirido resistência à mesma. A amostragem efectuada durante o período de infecção revela também a presença de *V. harveyi* nos órgãos internos de indivíduos mortos recolhidos dos respectivos circuitos. Este facto aponta para a necessidade de mais testes para poder apurar a causa de morte dos linguados, uma vez que o *Vibrio* em causa já se encontrava presente em indivíduos aparentemente saudáveis. Com o finalizar da infecção foram novamente recolhidos aleatoriamente linguados vivos para recolha dos órgãos internos, confirmando-se a presença do *V. harveyi*, ainda que sem causar mortalidade.

As poliquetas em estudo foram também aleatoriamente seleccionadas dos circuitos onde se encontravam para análise molecular. Os resultados são similares comparando o circuito infectado com o circuito controlo, onde se verifica que as poliquetas não apresentavam *V. harveyi* na sua constituição celular (tabela IX). O que indica que esta bactéria não ficou retida na poliqueta. Sabe-se porém que o género *Vibrio* se encontra numa escala de tamanho entre 4 a 12 μm , e que este poderá ter sido um factor importante na capacidade retenção da bactéria para nutrição ou formação de pseudofezes. Este diferencial de tamanho era conhecido à partida. No entanto o sistema de captura de partículas de *S. alveolata* envolve um processo de formação de pseudofezes. Trata-se de agregados de partículas capturadas que acabam por ser novamente expelidas pela poliqueta. Este processo de captura analisado por Dubois *et al.*, (2005) não parece ser influenciado pelo tipo de partícula (orgânica ou inorgânica), pelo tamanho (10-60 μm) ou pela morfologia da partícula. Caso tivessem ocorrido diferenças estatisticamente significativas na redução da carga bacteriana presente na água de cultivo, muito embora as análises moleculares pudessem confirmar que a retenção de bactéria não ocorria nos tecidos da poliqueta, seria possível especular sobre a possibilidade do agente bacteriano *V. harveyi* ser envolvido no processo de formação de pseudofezes da poliqueta *S. alveolata*. Mas tal facto também não se verificou. Na figura 13 é possível confirmar os resultados da análise de PCR em gel de agarose de onde foram extraídos os resultados apresentados pelas tabelas VIII e IX, mencionadas anteriormente.

Histologicamente observa-se na figura 15, um resultado que contribui também para fundamentar a hipótese de resistência dos linguados à concentração de *V. harveyi* introduzida no cultivo. Os linguados recolhidos vivos de todos circuitos para análise, bem como os linguados recolhidos mortos dos circuitos infectados demonstraram a ausência de danos nas constituições celulares observadas. Uma vez tendo sido efectuada a recuperação bacteriana do *V. harveyi* nas análises microbiológicas aos linguados dos quatro circuitos (tabela VII), indica que provavelmente este já se encontrava presente na flora bacteriana dos indivíduos sem causar doença.

A produção ou expressão dos parâmetros de defesa inatos, quer humorais quer celulares, é geralmente amplificada ou sobrerregulada durante a resposta imunitária, mas acredita-se não haver memória. Isto significa que um segundo encontro com o mesmo agente patogénico não resultará numa melhor resposta imediata como se verifica na resposta imunitária adaptativa (Esteban, 2012). Magnadottir (2010) refere que o parâmetro humoral chave do sistema adaptativo são as imunoglobulinas (anticorpos) expressas por linfócitos B receptores ou secretados no plasma. Os linfócitos T e B são responsáveis pelo

reconhecimento específico do patógeno e pelo desencadeamento da resposta imune adaptativa. É ainda referido por diferentes autores, que as células B estão envolvidas na resposta humoral enquanto as células T são responsáveis pela resposta celular. Após a activação por um antigénio específico, ditas células B proliferam e diferenciam-se em células de memória de longa duração e em células plasmáticas, que segregam o anticorpo específico (Magnadottir, 2010; Kiron, 2012)

No entanto, sabe-se que o nível de protecção de um peixe imunizado é geralmente relacionado com a resposta de anticorpos presentes no soro e na mucosa associada a tecidos linfóides (Zhen *et al.*, 2009). Os anticorpos são o principal indicador de imunidade adquirida contra patógenos. Seria de todo o interesse neste trabalho, a realização de um teste ELISA (Alonso *et al.*, 2005; Shuang Cheng *et al.*, 2010; Yong-hua & Li, 2011; Yong-hua *et al.*, 2012; Zhen *et al.*, 2009), ao soro de linguados dos quatro circuitos em estudo, para avaliar a produção de anticorpos.

Para além da indicação de defesa adquirida mediada por anticorpos, Uribe *et al.*, (2011) refere que os peixes desenvolvem memória imunológica antes de uma segunda exposição a um antigénio. A capacidade de produzir resposta de memória já foi observada na espécie *Oncorhynchus mykiss*, ao responder a doses subóptimas de ambos os linfócitos T de um modo dependente e independente de um antigénio, depois de uma exposição inicial ao mesmo (Arkoosh & Kaattari, 1991; Whittington *et al.*, 1994). Quanto ao processo ou estrutura molecular responsável, Kaattari (1992) sugere que a resposta secundária é causada pela expansão de um conjunto de células B e não por uma diferença específica nos anticorpos. No entanto, a resposta das células B a níveis subóptimos de antigénios sugerem, segundo Morrison & Nowak (2002), que talvez as células B com receptores de alta afinidade sejam seleccionadas como células B memória.

Posto isto, sabe-se que existe a capacidade de memória em diferentes espécies de hospedeiro, para diferentes espécies de agente invasor, mas ainda não se conhece concretamente que tipo de estrutura molecular desempenha esta função nem durabilidade da imunidade desenvolvida. Contudo, e embora não se tenha verificado a actividade de estruturas moleculares envolvidas na resposta imune no presente trabalho, existe a possibilidade da espécie *S. senegalensis* possuir a capacidade de reconhecimento específico, neste caso de *V. harveyi*, dada a rápida resposta emitida pelo sistema adaptativo. Toda esta especulação em redor da resistência desenvolvida contra *V. harveyi*, se fundamenta no facto dos linguados adquiridos pela segunda vez ao IPMA, possuírem na sua ficha clínica um registo que comprova o contacto (antes da aquisição) com a bactéria

em questão. A procura da origem dos resultados obtidos foi levada a cabo pela necessidade de compreender os mesmos, tendo sido por isso analisado o percurso dos linguados antes de serem submetidos às condições controladas do trabalho experimental.

Em relação à análise microbiológica da água dos quatro circuitos, os resultados foram analisados também nas duas fases do ensaio, antes e depois de induzir a infecção (figura 16) e durante o decorrer da mesma (figura 17). A amostragem realizada nos momentos antes e depois da infecção revela que em meio TSA (1,5% NaCl) antes da indução da infecção (figura 16 A) existia aparentemente uma maior concentração bacteriana na água, que diminuiu em todos os circuitos após a infecção. O mesmo já não se visualiza para o meio TCBS (figura 16 B), onde as contagens assumem um padrão esperado. Isto é, as contagens revelam uma concentração bacteriana superior após a indução da infecção, sendo os valores mais elevados correspondentes aos circuitos 3 e 4 (circuitos de infecção). As variações observadas nas contagens microbiológicas da água, para ambos os meios de cultura podem ser justificadas não só pela variação inerente das amostras, mas também com a própria análise em si. Quando se retira uma amostra de cada tabuleiro, é necessário decidir o número de diluições decimais a efectuar de forma a garantir contagens, entre 30 e 300 unidades formadoras de colónias. O material disponível, assim como a dificuldade no cálculo anterior, levaram a que em várias situações as contagens fossem inaceitáveis, levando a resultados de difícil interpretação. Também o facto do *V. harveyi* ter como característica de crescimento o *swarming* tornava difícil a contagem de colónias individualizadas.

Os elevados valores obtidos nos circuitos controlo (C1 e C2) poderão também ter sido influenciados pela ausência de trocas de água durante o ensaio, que contribuiu para a proliferação de microrganismos evidenciados nas contagens obtidas. Nestes dois circuitos onde não houve infecção intencional, verificou-se ainda crescimento em meio específico, TCBS, o que indica a possibilidade de estarem presentes na água bactérias do género *Vibrio* (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994), ou outras bactérias como *Aeromonas* ou *Photobacterium*, com capacidade para crescer em TCBS (Hispano *et al.*, 1997). No entanto, a existência de características específicas de *V. harveyi* em meio TSA (1,5 NaCl), como a luminescência (Defoirdt *et al.*, 2007) e formação de *swarming* (Karunasagar & Otta, 1996), indicam que esta estaria presente nos circuitos controlo, e até mesmo nos circuitos infectados antes da indução da infecção, como se pode constatar na figura 16 A. Uma vez que *V. harveyi* é uma bactéria que se encontra naturalmente no meio marinho existe a possibilidade de já se encontrar na água quando esta foi adicionada nos circuitos, explicando assim o surgimento da bactéria onde não seria esperado.

Com as amostras recolhidas nos dias seguintes até terminar o ensaio em meio TSA (figura 18 A), é possível observar uma constante diminuição bacteriana ao longo dos três dias analisados nos circuitos controlo. Nos circuitos infectados, do primeiro para o segundo dia de amostragem ocorre um aumento da concentração bacteriana, que diminui ao terceiro dia de amostragem. Tendo as contagens sido realizadas de dois em dois dias (à excepção do intervalo entre o dia 1 e 4), o terceiro dia de amostragem corresponde ao sexto dia de ensaio, em que se recomeçou o processo de alimentação de linguados - uma vez que estes começavam a morrer nos circuitos controlo. Dada a adição de alimento na água é evidente a crescente concentração de bactérias na água. As contagens obtidas nos dias seguintes foram incontáveis, não se encontrando deste modo os valores disponíveis no gráfico. Em TCBS (figura 18 B) os resultados são muito semelhantes entre circuitos ao longo do tempo. No início do ensaio ocorre uma diminuição da concentração de bactérias em todos os circuitos, mas ao terceiro dia de ensaio verifica-se um ligeiro aumento da concentração bacteriana nos circuitos 1 e 4, correspondentes ao controlo sem poliqueta e à infecção com poliqueta, respectivamente. Nos dias seguintes, a concentração bacteriana aumenta mais provavelmente devido à adição de alimento, voltando a diminuir ao quinto dia em circuitos com e sem poliqueta.

Em análise geral verifica-se que tanto as contagens microbiológicas efectuadas em meio TSA (1,5% NaCl) como em meio TCBS, demonstram a ausência de um padrão concreto em relação à presença de bactérias na água. Fazendo uma análise mais pormenorizada da figura 18 B, na última contagem, o circuito que apresenta uma maior diminuição do número de bactérias corresponde ao C4, circuito infectado onde se encontravam as poliquetas. No entanto, relacionando este facto com os resultados obtido na figura 19 B, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre circuitos. No C2 e no C4, onde se encontrava localizada a poliqueta, era esperada uma visível diminuição da concentração de bactérias significativa em relação aos restantes circuitos. Porém, existiram diferenças estatisticamente significativas entre os dias de amostragem em que decorreu o ensaio, o que indica que a diminuição de bactérias registada nos primeiros dias, não se deveu à acção de filtração do biofiltro *S. alveolata* (figura 19 B).

6. Considerações Finais

Os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental permitem retirar algumas conclusões sobre a eficiência da *S. alveolata* na retenção de *V. harveyi*. Estatisticamente foram revelados resultados entre os circuitos controlo, que indicam que a presença da poliqueta foi significativa na taxa de mortalidade obtida. Ou seja, embora nos circuitos controlo não se tenham observado diferenças entre análises microbiológicas à água dos circuitos controlo, a mortalidade registada evidenciou diferenças estatisticamente significativas quanto à presença da poliqueta no biofiltro. Quanto à mortalidade de linguados registada nos circuitos infectados, por ausência de resultados estatisticamente significativos não é possível afirmar que se deva à presença da poliqueta. Em conjunto com as análises microbiológicas obtidas à água dos circuitos infectados a poliqueta aparenta não ser eficaz na redução da carga bacteriana introduzida experimentalmente no cultivo.

No entanto, este é um trabalho com potencial para ser continuado no futuro, durante mais tempo, com uma bactéria mais patogénica de forma a garantir que os resultados obtidos são reais e aplicáveis ao melhoramento do cultivo de várias espécies em aquacultura, permitindo uma melhor qualidade da água e um aumento e bem-estar dos peixes de cultivo. É também importante perceber se a condição fisiológica das mesmas poderá influenciar o nível de energia dispensada para funções como a filtração, bem como a necessidade de realizar testes a diferentes temperaturas, para que se conheça se a actividade da poliqueta é influenciada por este factor, que não se fez variar ao longo deste estudo. Este factor revela importância pela necessidade de se encontrar num intervalo óptimo coincidente tanto para a actividade da poliqueta como para a manifestação da bactéria patogénica e ainda, dentro dos parâmetros aconselhados para o cultivo em questão.

Actualmente, os trabalhos científicos sobre *S. alveolata*, procuram conhecimentos sobre os seus processos fisiológicos de modo a alcançar a função da espécie como um habitat natural para outras espécies. Por este motivo existem alguns trabalhos com estimativas da taxa de retenção de partículas na coluna de água, como já referidos anteriormente. No entanto, nenhum dos trabalhos até agora publicados refere a filtração bacteriana por parte da espécie *S. alveolata*.

Existe também a possibilidade de recorrer a outras espécies de poliquetas para atingir os objectivos deste trabalho com eficácia, como a *Sabella spallanzanii*, com capacidade e eficiência na captura de vibrios. Esta capacidade é referida por Stabili *et al.*, (2010) num estudo que impulsionou a realização deste presente trabalho, aplicando a acção de um

biofiltro não para biorremediação, mas como medida preventiva a patologias em aquacultura.

Numa outra perspectiva, surge a necessidade de realizar um trabalho complementar ao actual, para esclarecer a razão pela qual os indivíduos da espécie *S. senegalensis* se manifestaram resistentes à exposição de uma concentração LD₅₀ de *V. harveyi*. A resistência imunológica compreende uma complementação entre mecanismos de defesa adquiridos e inatos, bem como possíveis factores genéticos. Actualmente, os trabalhos realizados sobre investigação do sistema imunológico dos peixes, incluem parâmetros imunes relevantes ou representativos de um subconjunto, para simultaneamente avaliar a sua contribuição quantitativa na resistência do hospedeiro, mas a maioria dos trabalhos centra-se na resposta imunitária inata. No controlo imunológico de doenças de peixes existe uma grande variação na susceptibilidade à doença, devido as características específicas de cada patogene para conseguir invadir o organismo hospedeiro, e às defesas imunitárias das diferentes espécies de peixes. Mais investigação sobre as origens desta variabilidade é deste modo necessária, para um melhor controlo de patologias.

Grande parte do conhecimento actual sobre sistema imunitário em peixes é centrado em espécies de elevado valor comercial em aquacultura, como é o caso das espécies *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* e *Sparus aurata*. Também o linguado branco, *S. senegalensis*, pelo seu valor comercial e por ser uma crescente aposta nos mercados, possui todo o interesse em que se desenvolvam pesquisas sobre a sua capacidade de resistência a possíveis agentes invasores, permitindo um melhor rendimento e qualidade na sua produção.

Referências Bibliográficas

- Alcaide, E., Gil-Sanz, C., Sanjuán, E., Esteve, D., Amaro, C., Silveira, L. (2001). *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *Journal of Fish Diseases*, 24, 311–313.
- Alonso, M., C., Cano, I., Garcia-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J., Borrego, J. (2005). Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Bruñnich). *Journal of Fish Diseases*, 28, 221–228.
- Alvarez, J., Austin, B., Alvarez, A., & Reyes, H. (1998). *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of fish diseases*, 21, 313–316.
- Anguis, V., & Cañavate, J. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*, 243, 133–145.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrilion, M., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M., Magarinos, B., Toranzo, A., Morinigo, M. (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28, 33–38.
- Arkoosh, M., Kaattari, S. (1991). Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology*, 15, 279–293.
- Austin, B., & Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43, 119–24.
- Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary microbiology*, 140, 310–7.
- Austin, B. (2005). Oceans and Health: pathogens in marine environment. *Bacterial Pathogens of Marine Fish*, Chapter 17, 391–413.
- Ayata, S.-D., Ellien, C., Dumas, F., Dubois, S., & Thiébaud, É. (2009). Modelling larval dispersal and settlement of the reef-building polychaete *Sabellaria alveolata*: Role of hydroclimatic processes on the sustainability of biogenic reefs. *Continental Shelf Research*, 29, 1605–1623.
- Balcázar, J., Rojas-Luna, T., Cunningham, D. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 147–150.
- Berger, C. (2000). Aportes de la bio- tecnología a la alimentación y a la inmuno- estimulación de camarones peneidos. Asociación Langostinera Peruana (ALPE), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola., 102–110.
- Bertone, S., Gili, C., Moizo, A. and Calegari, L. (1996) *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases*, 19, 429–434.

- Buller, N. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animal: a practical identification manual. CABI Publishing, 121-277.
- Cano-Gomez, A., Bourne, D., Hall, M., Owens, L., Høj, L. (2009). Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture*, 287, 1–10.
- Capa, M., Hutchings, P., & Peart, R. (2012). Systematic revision of *Sabellariidae* (Polychaeta) and their relationships with other polychaetes using morphological and DNA sequence data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 164, 245–284.
- Castanheira, M., Martins, C., Engrola, S., & Conceição, L. (2011). Daily oxygen consumption rhythms of Senegalese sole *solea senegalensis* (Kaup, 1858) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 1–5.
- Castelo branco, M., Ramos, M. 1998. Crescimento de pós-larvas de linguado branco (*solea senegalensis*, Kaup 1858) em pisciculturas do estuário do Sado. *Instituto português das pescas e do mar- Ipimar*, divulgação nº4.
- Castelo Branco, M., Moura, O., & Gamito, S. (2008). A growth equation for sole postlarvae (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) in earthen ponds in the region of Tagus and Sado Estuaries (Portugal). *Aquaculture Research*, 39(8), 795–800.
- Castelo Branco, M., Arruda, M., & Gamito, S. (2010). Feeding habits of *Solea senegalensis* in earthen ponds in Sado estuary. *Journal of Sea Research*, 64(4), 446–450.
- Colwell, R. & Grimes, D. (1984). Vibrio diseases of marine fish populations. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37, 265–287.
- COTEC Portugal - Associação empresarial para a Inovação. (2012). Blue growth for Portugal - uma visão empresarial da economia do mar.
- Defoirdt, T., Verstraete, W., Bossier, P. (2007). Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Dias, M. (1994). Contribuição para o Conhecimento da Aquacultura no Estuário do Sado Seminário Sobre Recursos Halêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade de Pescado da Península de Setúbal. *Instituto Português de Investigação Marítima*, 1, 155-166.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea Senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176, 27-38.
- Dubois, S., Barillé, L., & Retière, C. (2003). Efficiency of particle retention and clearance rate in the polychaete *Sabellaria alveolata* L. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 413–421.
- Dubois, S., Barillé, L., Cognie, B., & Beninger, P. (2005). Particle capture and processing mechanisms in *Sabellaria alveolata* (Polychaeta: Sabellariidae). *Marine Ecology Progress Series*, 301, 159–171.

- Dubois, S., Comtet, T., Retière, C., & Thiébaud, E. (2007). Distribution and retention of *Sabellaria alveolata* larvae (Polychaeta: Sabellariidae) in the Bay of Mont-Saint-Michel, France. *Marine Ecology Progress Series*, 346, 243–254.
- Dubois, S., Barillé, L., & Cognie, B. (2009). Feeding response of the polychaete *Sabellaria alveolata* (Sabellariidae) to changes in seston concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 376, 94–101.
- Esteban, M. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *International Scholarly Research Network Immunology*, 1-29.
- Fauvel, P. (1927). Faune de France – Polychètes Sedentaires. Fédération Française des sociétés de Sciences Naturelles – Office Central de Faunistique, 16, 494.
- Ferguson, H. Systemic Pathology of Fish- a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses to disease. *Scotian Press*, 91-114.
- Food and agriculture organization of the united nations- Fisheries and Aquaculture Department. (2010). The state of world fisheries and aquaculture. FAO Corporate Document Repository.
- Food and agriculture organization of the united nations- Fisheries and Aquaculture Department. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. FAO Corporate Document Repository.
- Focardi, S., Corsi, I., & Franchi, E. (2005). Safety issues and sustainable development of European aquaculture: new tools for environmentally sound aquaculture. *Aquaculture International*, 13, 3–17.
- Gao, Q.-F., Shin, P., Xu, W., & Cheung, S. (2008). Amelioration of marine farming impact on the benthic environment using artificial reefs as biofilters. *Marine pollution bulletin*, 57, 652–61.
- Gauger, E., Smolowitz R., Uhlinger K., Casey J., Gómez-Chiarri M. (2006). *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*, 260, 10–20
- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panziera, C., Lauro, L., Ciappelloni, R. and Petracca, G. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Veterinary Research Communications*, 27, 471-479.
- Gifford, S., Dunstan, R., O'Connor, W., Roberts, T., & Toia, R. (2004). Pearl aquaculture-profitable environmental remediation? *The Science of the total environment*, 31, 27–37.
- Gifford, S., Dunstan, R., O'Connor, W., Koller, C. E., & MacFarlane, G. R. (2006). Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends in biotechnology*, 25, 60–5.
- Grimes, D., Gruber, S. and May, E. (1985). Experimental infection of lemon sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. *Journal of Fish Diseases* 8, 173–180.

- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191, 259–270.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F., Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150, 1769–77.
- González-Párraga, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. (2011). Marine microorganisms: the world also changes. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 1281–1292.
- Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C., Heo, M. (2012). Vaccination effect of liposomes entrapped whole cell bacterial vaccine on immune response and disease protection in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 317, 1-15.
- Hettiarachchi, M., Pathirage, S., Hettiarachchi, D. (2005). Isolation of the bacterium, *Vibrio harveyi* from cultured shrimp, *Penaeus monodon* and production of vaccines against the bacterium. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 33, 257- 263.
- Hispano, C., Nebra, Y. and Blanch, A. (1997). Isolation of *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 17, 104-107.
- Howell, B., Cañavate, P., Prickett, R., Conceição, L. (2006). The Cultivation Of Soles. Report of a 3rd workshop held at CIFPA el Toruño, Cadiz, Spain, 22-23 March.
- Imsland, A., Foss, A., Conceição, L., Dinis, M., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, 13, 379-407.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) ; Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura (DGPA). (2009). Estatísticas da pesca 2009. Publicação anual do Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 0377-225-X.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) ; Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura (DGPA). (2010). Estatísticas da pesca 2009. Publicação anual do Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 0377-225-X.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) ; Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura (DGPA). (2011). Estatísticas da pesca 2010. Publicação anual do Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 0377-225-X.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) ; Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura (DGPA). (2012). Estatísticas da pesca 2010. Publicação anual do Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 0377-225-X.
- Irianto, A., Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- Ishimaru, K. and Muroga, K. (1997). Taxonomical reexamination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathology*, 32,59–64.

- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., Limsuwan, C. (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6, 27–35.
- Jun, L., & Woo, N. (2003). Pathogenicity of Vibrios in Fish : an Overview. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2, 117–128.
- Karunasagar, I., & Otta, S. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture*, 140, 241–245.
- Kaattari, S. (1992). Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review of Fish Disease*, 2, 161–180.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1–14.
- Kiron, W. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 111– 133.
- Korun, J. (2008). Marine Vibrios Associated With Diseased Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) IN TURKEY. *Journal of Fisheries Sciences*, 2, 66–76.
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey D, Grier, H. and Lim, D. (1990). *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, 13, 557-560
- Larsen, P., & Riisgård, H. (2000). Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter feeding , essence of current knowledge. *Journal of Sea Research*, 44,169-193
- Le Cam, J.-B., Fournier, J., Etienne, S., & Couden, J. (2011). The strength of biogenic sand reefs: Visco-elastic behaviour of cement secreted by the tube building polychaete *Sabellaria alveolata*, Linnaeus, 1767. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91, 333–339.
- Lee, H. W., Bailey-brock, J. H., & Mcgurr, M. M. (2006). Temporal changes in the polychaete infaunal community surrounding a Hawaiian mariculture operation. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 175–185.
- Lee, K., Liu, Chuang, W. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*, 4, 267-277.
- Leslie, A., Rathinam, A., Balasingh A. (2012). Distribution profile of *Vibrio harveyi* in *Panulirus homarus*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1, 61–64.
- Li M., Wang, C., Sun, L. (2011). A pathogenic *Vibrio harveyi* lineage causes recurrent disease outbreaks in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and induces apoptosis in host cells. *Aquaculture*, 319, 30–36
- Licciano, M., Stabili, L., Giangrande, A., & Cavallo, R. A. (2007a). Bacterial accumulation by *Branchiomma luctuosum* (Annelida: Polychaeta): a tool for biomonitoring marine systems and restoring polluted waters. *Marine environmental research*, 63(3), 291–302.

- Licciano, M., Terlizzi, A., Giangrande, A., Cavallo, R., & Stabili, L. (2007b). Filter-feeder macroinvertebrates as key players in culturable bacteria biodiversity control: a case of study with *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae). *Marine environmental research*, 64, 504–13.
- Liu, P., Chuang, W. and Lee, K.(2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19, 59–61.
- Liu, P., Lin, J., Chuang, W. and Lee, K.(2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 495-499.
- Magnadottir, B., (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, 12, 361–379.
- Marinho, G., Peres, H., Carvalho, A. P. (2012). Effect of feeding time on dietary protein utilization and growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Research*, 1-6.
- Morrison, R., Nowak, B. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11, 46–54.
- Nicolas, J., Basuyaux, O., Mazurié, J., Thébault, A. (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 35–43.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., Wakabayashi, H. (1998). *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*, 33,495–502.
- NIEA- Northern Ireland Environment Agency. (2005). Northern Ireland Habitat Action Plan - *Sabellaria alveolata* reefs.
- Oakey, H., Levy, N., Bourne, D., Cullen, B., & Thomas, A. (2003). The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1293–1303.
- Ostroumov, S. (2005). Some aspects of water filtering activity of filter-feeders. *Hydrobiologia*, 542, 275–286.
- Pass, D., Dybdahl, R. and Mannion, M. (1987). Investigation into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture*, 65, 149-169.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Rkpratanpom, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Sithigorngul, P. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*, 63,161-8.
- Pujalte, M., Sitjà-Bobadilla, A, Macián, M., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., Uruburu, F., Garay, E. (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi*

- strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Systematic and applied microbiology*, 26, 284–92.
- Pang, L., Zhang, X.-H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., & Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in applied microbiology*, 43, 249–55.
- Parra, G., Yufera, M., (1999). Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture Research*, 30, 857–863.
- Programa operacional Pescas 2007-2013. (2007). DGPA-direcção geral das pescas e aquicultura.
- Qin, Y., Wang, J., Su, Y., Wang, D. and Chen, X. (2006). Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. *Acta Oceanology Sinica*, 25, 154–159.
- Qin, Y., Su, Y., Wang, S., Yan, Q. (2009). Immunogenicity and protective efficacy of *Vibrio harveyi* *pcFlaA* DNA vaccine in *Epinephelus awoara*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 769-774.
- Ransangan, J., Lal, T., Al-harbi, A. (2012). Characterization and experimental infection of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*, 8, 104–115.
- Ren, J., Stenton-Dozey, J., Plew, D. , Fang, J., & Gall, M. (2012). An ecosystem model for optimising production in integrated multitrophic aquaculture systems. *Ecological Modelling*, 246, 34–46.
- Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-López F., Toro-Ascuy, D., Sandino, A., Imarai, M. (2012). New Advances and Contributions to Fish Biology. Fish Cytokines and Immune Response. *InTech*, chapter 1, 3-58
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Dinis, M., (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kraup 1858. *Aquaculture*, 179, 465–473.
- Rico, R., Tapia-Paniagua, S., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M., & Moriñigo, M. (2008). Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of applied microbiology*, 105, 752–60.
- Riisgård, H., Larsen, P. (2001). Minireview : Ciliary filter feeding and bio-fluid mechanics — present understanding and unsolved problems. *American Society of Limnology and Oceanography*, 46, 882–891.
- Robertson, P., Xu, H., Austin, B. (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *Journal of Microbiological Methods*, 34, 31–39.
- Rodríguez, J., Quintáns, Souto, B., Quintáns, J. (2005). Preengorde de lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 sometido a diferentes regímenes de alimentación. Boletín. Instituto Español de Oceanografía, 21 , 89-93.
-

- Saeed, M. (1995). Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture*, 136, 21-29.
- Sáez, D., López, F., Guerrero, A. (2011). Efectos de la administración del probiótico shewanella pdp 11 en juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, kaup 1858) y desarrollo de un método para su microencapsulación. Escuela Superior de Ingeniería- Universidad de Almería . Proyecto fin de carrera .
- Sánchez, P., Ambrosio, P., & Flos, R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 300, 93–101.
- Shuang, C., Wei-wei, Z., Min, Z., Li, S. (2010). Evaluation of the vaccine potential of a cytotoxic protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Vaccine*, 28, 1041–1047.
- Słomińska, M., Konopa, G., Wegrzyn, G., & Czyz, A. (2002). Impaired chromosome partitioning and synchronization of DNA replication initiation in an insertional mutant in the *Vibrio harveyi* *cgtA* gene coding for a common GTP-binding protein. *The Biochemical journal*, 362, 579–584.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D., Specker, J., Mauel, M., Gómez-Chiarri, M. (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38, 201–210.
- Soto-Rodriguez, S., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A., & Romalde, J. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of invertebrate pathology*, 109, 307–17.
- Stabili, L., Schirosi, R., Licciano, M., Mola, E., & Giangrande, A. (2010). Bioremediation of bacteria in aquaculture waste using the polychaete *Sabella spallanzanii*. *New biotechnology*, 27, 774–81.
- Talpur, A., Memon, A., Khan, M., Ikhwanuddin, M., Danish, D., Abol-Munafi, A. (2011). Pathogenicity and Antibiotic Sensitivity of Pathogenic Flora Associated with the Gut of Blue Swimming Crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1857). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 2106-2119.
- Tejada, M., De las Heras, C., Kent, M. (2007). Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese Sole (*Sole Senegalensis*). *European Food Research and Technology*, 225, 225-232.
- Tendencia, E. (2002). *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquaculture Research*, 33, 455-458.
- Tendencia, E. (2004). The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines. *Aquaculture Research*, 3, 1292–1294.

- Themptander, K. (2005). Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. BSc Biomedical Sciences, School of Biological Sciences, Dublin Institute of Technology, 8-14.
- Teresa, M., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176, 27-38.
- Thompson, F., Hoste,, B., Vandemeulebroecke, K., Engelbeen, K., Denys, R., Swings, J. (2002). *Vibrio trachuri* Iwamoto et al . 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,52, 973–976.
- Thompson, F., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios, *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 68, 403–431.
- Toranzo, A., Magariños, B., & Romalde, J. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37–61.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56, 486–503.
- Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. and Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169, 121–132.
- Vinod, M., Shivu, M., Umesha, K., Rajeeva, B., Krohne, G., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255, 117–124.
- Whittington, R., Munday, L, Akhlaghi, M., Reddacliff, G., Carson, J. (1994). Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish and Shellfish Immunology*, 4, 475–488.
- Won, K., & Park, S. II. (2008). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*, 285, 8–13.
- Yoder, M., Tandingan De Ley, I., King, I., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., De Ley. (2006). DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, 8, 367-376.
- Yii, K., Yang, T. and Lee, K. (1997). Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Current Microbiology*, 35, 109-115.
- Yong-hua, H., Li, S. (2011). A bivalent *Vibrio harveyi* DNA vaccine induces strong protection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine*, 29, 4328–4333.
- Yong-hua, H., Tian, D., Bo-guang, S., Li, S. (2012). Development and efficacy of an attenuated *Vibrio harveyi* vaccine candidate with cross protectivity against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32, 1155-1161.

- Zaccone, R., Mancuso, M., Modica, a., & Zampino, D. (2005). Microbiological indicators for aquaculture impact in Mar Piccolo (Taranto, Italy). *Aquaculture International*, 13,167–173.
- Zhang, X.-H., & Austin, B. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23, 93–102.
- Zhen, X., Chang-Fu, C., Zhi-Juan, M., Wu-Ying, Z. (2009). Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes. *Aquaculture*, 287, 243–247.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrilion, M., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M., Morinigo, M. (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, 26, 103–108.
- Vilar, P., Faílde, L., Bermúdez, R., Vigliano, F., Rianza, A., Silva, R., Santos, Y., Quirog, M. (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 35, 437-45.

Anexos:

Anexo I: Composição nutricional da ração distribuída no sistema de recirculação de água em estudo.

Tabela X- Ficha de composição fornecida pela empresa SPAROS, LDA

<i>Dry matter basis</i>	<i>Percentil (%)</i>
<i>Fishmeal 70 LT</i>	<i>20,00</i>
<i>Fishmeal 60 LT</i>	<i>17,00</i>
<i>Krill meal</i>	<i>9,00</i>
<i>CPSP G</i>	<i>8,00</i>
<i>Squid meal</i>	<i>7,00</i>
<i>Soybean meal 48</i>	<i>10,00</i>
<i>Wheat meal</i>	<i>13,00</i>
<i>Wheat DDGS</i>	<i>3,00</i>
<i>Fish oil</i>	<i>10,30</i>
<i>Vit & Min Premix With Asta</i>	<i>1,00</i>
<i>Algatrium DHA 70%</i>	<i>1,70</i>
<i>TOTAL</i>	<i>100,00</i>

Anexo II: Procedimento de análise histológica

Tabela XI - Tempos atribuídos durante o processamento de tecidos e posterior coloração dos mesmos.

Desidratação, clareamento e parafinação (<i>Leica TP 1020</i>)	Desparafinação, re-hidratação e desidratação
Álcool 50%- 6h	
Álcool 70%- 6h	
Álcool 85%- 6h	
Álcool 90%- 6h	
Álcool 100%- 6h	
Álcool 100%- 6h	
Xilol I- 3h	
Xilol II- 3h	
Xilol + Parafina (1:1)- 12h	
Parafina- 18h	
	Histolemon- 5 min
	Histolemon- 5 min
	Álcool 100%- 5 min
	Álcool 100%- 5 min
	Álcool 85%- 5 min
	Álcool 70%- 5 min
	Álcool 50%- 5 min
	Água destilada- 5 min
	Hematoxilina de Harris- 5 min
	Eosina- 3 min
	Álcool 70%- 1 min
	Álcool 85%- 1 min
	Álcool 100%- 1 min
	Álcool 100%- 1 min
	Histolemon- 5 min
	Histolemon- 5 min

