

SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE LARVAS DO MOLUSCO DE AREIA *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) EM LABORATÓRIO*

Francisco José LAGREZE Squella¹; Marcos Caivano Pedroso de ALBUQUERQUE¹; Jaqueline ARAUJO¹; Simone SÜHNEL¹; Claudio Manoel Rodrigues de MELO¹

RESUMO

A elevada extração em estoques naturais e as alterações no meio ambiente têm comprometido as populações do molusco de areia *Anomalocardia brasiliana*, tornando cada vez mais necessário o desenvolvimento de tecnologias para a produção de sementes desse bivalve em laboratório. Com o objetivo de contribuir com a tecnologia de produção de sementes do berbigão em ambiente controlado, foram avaliadas a densidade e a dieta no cultivo larval e o tempo de larvicultura de *A. brasiliana*. Nas densidades de 10 e 30 larvas mL⁻¹ foram obtidos os melhores valores de sobrevivência de larvas de *A. brasiliana*. Avaliando o tempo de larvicultura para assentamento, conclui-se que as larvas podem ser transferidas com cinco dias de cultivo e mantidas no assentamento na densidade de 25 larvas cm⁻². Adicionalmente, larvas de *A. brasiliana*, alimentadas com dietas bialgais com as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Nannochloropsis oculata* e *C. muelleri* e *Pavlova lutheri* apresentaram melhores resultados de crescimento e sobrevivência.

Palavras chave: berbigão; vôngole; marisco; densidade; tempo de larvicultura; assentamento; alimentação.

SURVIVAL AND GROWTH OF THE NATIVE CLAM *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) LARVAE IN LABORATORY

ABSTRACT

High exploitation of natural stocks and changes in the environment has affected the populations of the native clam *Anomalocardia brasiliana*, becoming necessary the development of technologies for seeds production in laboratory. Aiming to contribute to the seeds production technology of the native clam *A. brasiliana*, the density and diet of larval cultivation and time for larviculture was evaluated. In the densities 10 and 30 larvae mL⁻¹ were obtained the better survival of *A. brasiliana* larvae. Evaluating the larviculture time for settlement, the larvae can be transferred with five days of culture and maintained in the settlement in a density of 25 larvae cm⁻². Additionally, bialgal diets with the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Nannochloropsis oculata*, and *C. muelleri* and *Pavlova lutheri* showed better growth and survival of *A. brasiliana* larvae.

Keywords: berbigão; vôngole; marisco; density; larviculture; settlement; feeding

Artigo Científico: Recebido em 18/02/2014 – Aprovado em 16/01/2015

¹ Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Beco dos Coroas s/n – Barra da Lagoa – CEP: 88061-600 – Florianópolis – SC – Brasil. e-mail: francisco_lagreze@yahoo.com.br (autor correspondente)

* Apoio financeiro: Ministério de Pesca e Aquicultura (projeto “Gente da Maré”, Termo de Convênio 056/2008); CNPq (processo 477309/2011-9); CAPES (Bolsa de Doutorado).

INTRODUÇÃO

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

Na costa brasileira, a comercialização desse molusco de areia está baseada no extrativismo em estoques naturais. Essa atividade é realizada em diferentes escalas e principalmente por comunidades litorâneas, sendo, em alguns casos, a fonte de proteína mais importante na alimentação familiar. Os principais fatores que podem afetar a disponibilidade de *A. brasiliana* no ambiente são antropogênicos (como poluição das águas e sobre-exploração) e ambientais (como enchentes). Desta forma, a disponibilidade deste recurso no ambiente passa a ter importância não somente ambiental, mas também social. Como alternativa a essa limitação, a produção de sementes desse molusco em laboratório torna-se promissora, principalmente para futuros trabalhos e estudos de repovoamento em populações no ambiente ou mesmo para o cultivo desta espécie.

Estudos sobre o berbigão *A. brasiliana* tem focado aspectos ecológicos (BOEHS *et al.*, 2008), reprodutivos (LUZ e BOEHS, 2011), patológicos (BOEHS *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2012) e morfológicos (MOUËZA *et al.*, 1999). Contudo, pouco ainda se conhece sobre a produção de sementes de *A. brasiliana* em laboratório, a qual envolve a obtenção de gametas, larvicultura e assentamento.

Fatores como temperatura (LIU *et al.*, 2011) e salinidade (HIS *et al.*, 1989) da água de cultivo, dieta dos animais (LIU *et al.*, 2011) e densidade larval (LIU *et al.*, 2006, 2011) podem afetar o assentamento e a metamorfose de moluscos bivalves. A densidade pode ser facilmente ajustada em sistemas de produção em laboratório e apresenta uma grande influência na

sobrevivência de larvas de moluscos bivalves (DEMING e RUSSELL, 1999; LIU *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006).

No cultivo de larvas de moluscos, a variabilidade no crescimento dos animais é mais afetada pela alimentação do que pela temperatura ou salinidade (MARSHAL *et al.* 2010). Avaliando o efeito da temperatura, salinidade e da dieta no crescimento das larvas de *Ostrea edulis* (ROBERT *et al.*, 1988), *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* (HIS *et al.*, 1989), mais de 70% da variância no crescimento foi explicada pelo estado nutricional das mesmas. Consequentemente, é fundamental, na alimentação de moluscos, considerar a espécie de microalga a ser fornecida (MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004), pois nem todas são ingeridas ou digeridas pelas larvas. Além disso, aspectos como idade das larvas para assentamento também devem ser determinados, uma vez que larvas com sete dias de vida já iniciam as diferenciações morfológicas para metamorfose (MOUËZA *et al.*, 1999) e mantê-las no sistema de larvicultura pode aumentar o custo financeiro e comprometer o assentamento.

Neste sentido, para contribuir com a tecnologia da produção de sementes de *A. brasiliana*, foram avaliadas a densidade de cultivo larval, o tempo de cultivo e a dieta para alimentação de larvas do berbigão em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das larvas "D"

Foram realizados quatro experimentos de larvicultura. Para cada experimento, animais adultos ($24,65 \pm 1,36$ mm) de *A. brasiliana* foram coletados na zona entre marés da praia da Daniela, Florianópolis, Brasil ($27^{\circ}27'25,40''S$; $48^{\circ}32'31,51''W$) e transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) (Universidade Federal de Santa Catarina).

Ao chegarem ao LMM, os animais foram lavados em solução de hipoclorito de sódio (2%) e aclimatados em tanque de corpo cilíndrico-cônico de 200 L, contendo água do mar filtrada (1 μ m), esterilizada com ultravioleta (UV), salinidade de 35 e temperatura de 24 °C. Os animais foram acondicionados em quatro sacos de malha com 0,5 kg de berbigão em cada saco, totalizando 2 kg (180 animais) em 200 L. Após 24 h de aclimação,

os animais foram induzidos à eliminação dos gametas por choque térmico, transferindo-os de um tanque, com água a 24 °C, para outro com água a 28 °C; onde foram mantidos por 15 h ("overnight"). Após a desova, os embriões foram coletados e transferidos para um tanque (100 L) contendo água do mar filtrada a 1 µm, esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25 °C, onde foram mantidos por 24 h até o estágio de larva "D". Após este período, as larvas foram coletadas com peneira (35 µm) e utilizadas nos experimentos.

Experimento 1: Avaliação da densidade de cultivo de larvas

Foram avaliadas quatro densidades (tratamentos): 10, 15, 30 e 50 larvas mL⁻¹ (larva "D") em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Para cada densidade, as larvas "D" foram contadas (por amostragem) e colocadas em 12 tanques (volume útil de 12 L) com água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25 °C. Foi utilizado sistema estático de cultivo das larvas com aeração constante para manter a oxigenação e circulação da água nos tanques.

No manejo da larvicultura, a renovação total da água dos tanques foi realizada a cada 24 h, sem retirada das larvas. Para, esse procedimento, foi instalado em cada tanque um filtro tipo banjo (ver HELM *et al.*, 2004). O banjo utilizado foi composto por uma secção transversal de 5 cm de cano de PVC (100 mm de diâmetro) tampado com malha (35 µm) de cada lado e com uma saída em PVC (20 mm de diâmetro) até a lateral do nível superior da água do tanque.

O peneiramento foi realizado a cada 48 h utilizando malhas de 35, 55, 70, 100 e 120 µm, sendo eliminadas as larvas mal formadas ou mortas. A malha de 120 µm é indicada para separar larvas em processo de metamorfose no sétimo dia de cultivo, momento em que começam a mudar o seu hábito planctônico para bentônico. A higienização de todo sistema foi realizada a cada 48 h utilizando solução de hipoclorito de sódio (2%). A temperatura e a salinidade da água no tanque de larvicultura foram monitoradas diariamente com termômetro e refratômetro, respectivamente.

A alimentação diária foi composta pela microalga *Isochrysis galbana*, na concentração de

2 x 10⁴ células mL⁻¹ nos dois primeiros dias, e pelas microalgas *I. galbana* e *Chaetoceros muelleri* (1:1), na concentração de 5 x 10⁴ células mL⁻¹, dividida em duas alimentações ao dia, até larva pedivéliger, de acordo com pré-testes anteriores com a mesma espécie (dados não publicados).

Após sete dias de larvicultura, foi avaliada, visualmente, a presença de larvas retidas em malha de 120 µm. Em seguida, todas as larvas presentes nas malhas de 100 e 120 µm, de cada repetição, foram colocadas em 12 recipientes de 500 mL e foi avaliada a sobrevivência, por amostragem. Para isso, a mistura de água do mar e larvas foi previamente homogeneizada e foram retiradas três amostras de 1 mL de cada recipiente, sendo as larvas vivas contabilizadas com o auxílio de câmara de "Seddewick Rafter", em microscópio de luz. A sobrevivência média foi calculada pela média das três contagens de cada repetição.

Experimento 2: Avaliação da densidade de larvas no assentamento, cultivadas por cinco e sete dias de larvicultura

Neste experimento foi avaliado o assentamento de larvas com idade de cinco (5d; larvas planctônicas) e de sete dias (7d; larvas em início de metamorfose) em duas densidades: 25 larvas cm⁻² (D25) e de 50 larvas cm⁻² (D50), em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 fatores: tempo e densidade), com três repetições. Larvas "D" foram contadas (por amostragem) e colocadas em dois tanques (100 L) na densidade de 10 larvas mL⁻¹ até atingirem as idades avaliadas (cinco e sete dias). A água do mar (salinidade de 35, temperatura de 25 °C) foi filtrada (1 µm), esterilizada com UV, e mantida sob aeração constante. Em cada tanque foi instalado um "banjo" lateral para renovação de água. O manejo da larvicultura e a alimentação das larvas foi realizado como descrito anteriormente para o experimento 1.

Após cada tempo de larvicultura, cinco e sete dias, as larvas foram transferidas para os tanques de assentamento utilizando peneira com malha de 100 µm (no quinto dia) e de 120 µm (no sétimo dia). Estas foram quantificadas e colocadas para assentamento em 12 cilindros de PVC (200 mm de diâmetro e 200 mm altura, com área útil para assentamento de 314 cm²), com malha (90 µm) no

fundo, acomodados em quatro tanques de 100 L. No assentamento foram utilizadas 7.850 larvas cilindro⁻¹ para densidade D25 e 15.700 larvas cilindro⁻¹ para densidade D50. Cada tanque continha três cilindros e funcionava com sistema de "airlift" para a circulação da água e do alimento, em fluxo descendente ("downwelling"). Nesse sistema, foi utilizada água do mar filtrada (1 µm), esterilizada com UV, salinidade de 35 e temperatura de 25 °C. A alimentação durante o assentamento foi diária, composta pelas microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* (1:1) a uma concentração de 7×10^4 células mL⁻¹, dividida em duas alimentações ao dia.

No manejo do assentamento foi realizada a troca total de água a cada 48 h, retirando as presenças do tanque com o auxílio de peneiras, e realizada a higienização de todo sistema, utilizando solução de hipoclorito de sódio (2%). Após 12 dias de assentamento, os animais, já em fase juvenil, foram retirados dos cilindros e contabilizados para avaliação da sobrevivência.

A determinação da sobrevivência das presenças foi realizada conforme descrito para o experimento 1, com o auxílio de câmara de "Seddewick Rafter" e microscópio de luz.

Experimentos 3 e 4: Avaliação da dieta de microalgas

As microalgas escolhidas para realização deste experimento são as mais utilizadas na produção comercial de bivalves (NELL e O'CONNOR, 1991; NELL *et al.*, 1994).

No experimento 3 foi avaliada a dieta unialgal na larvicultura de *A. brasiliiana*, sendo cinco espécies de microalgas testadas: *I. galbana* (Iso), *Rhodomonas salina* (Rh), *Chaetoceros calcitrans* (Cc), *C. muelleri* (Cm) e *Nannochloropsis oculata* (Na). Além das microalgas, foi utilizado um grupo controle, com larvas mantidas sem o fornecimento de alimento (SA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (24 unidades experimentais).

No experimento 4, foram avaliadas oito dietas bialgais, na proporção 1:1, compostas pelas seguintes microalgas:

Tratamento Iso-Cc: *I. galbana* e *C. calcitrans*;

Tratamento Iso-Cm: *I. galbana* e *C. muelleri*;

Tratamento Rh-Cc: *R. salina* e *C. calcitrans*;

Tratamento Rh-Cm: *R. salina* e *C. muelleri*;

Tratamento Na-Cc: *N. oculata* e *C. calcitrans*;

Tratamento Na-Cm: *N. oculata* e *C. muelleri*;

Tratamento Pav-Cc: *Paolova lutheri* e *C. calcitrans*;

Tratamento Pav-Cm: *P. lutheri* e *C. muelleri*;

Tratamento controle (SA): sem alimento.

O experimento 4 foi realizado em delineamento inteiramente, casualizado com três repetições (27 unidades experimentais).

Para ambos os experimentos, 2.000 larvas "D" com $104,25 \pm 4,15$ µm de comprimento médio de concha (n = 30) foram colocadas em beckeres (unidade experimental) de vidro (5 larvas mL⁻¹), contendo 400 mL de água do mar (salinidade de 35) filtrada (1 µm), esterilizada com UV. Os beckeres foram colocados em "banho-maria" (tanque de 50 L) para manter a temperatura (25 °C) em todas as unidades. A troca total de água foi realizada a cada 48 h, com o peneiramento das larvas utilizando malha 35 µm (sem descarte de larvas com baixo crescimento ou com má formação) e o alimento foi fornecido diariamente. A quantidade de células de cada espécie de microalga testada foi ajustada a cada troca de água de acordo com o crescimento (comprimento de concha) dos animais, observado em amostras de dez larvas de cada unidade experimental, conforme metodologia de alimentação descrita para *Tapes philipinarum* por HELM *et al.* (2004). A alimentação no primeiro e segundo dias foi de $2,2 \times 10^4$ células mL⁻¹; no terceiro e quarto dias de $3,5 \times 10^4$ células mL⁻¹; e do quinto ao sétimo dias, de 5,5 células mL⁻¹, sendo este último valor dividido em duas alimentações ao dia.

O tempo de larvicultura foi fixado em sete dias [período em que a larva ainda é planctônica (MOUËZA *et al.*, 1999)] para os experimentos 1, 3 e 4. Após este período, todas as larvas de cada repetição foram retiradas, fixadas (formol 10%) e armazenadas em tubos eppendorff (2 mL), separados por repetição, para posterior avaliação. Para avaliação, o conteúdo líquido de cada eppendorff foi homogeneizado, pipetado 1 mL, em triplicata, e as larvas contadas em câmara de "Seddewick Rafter", com microscópio de luz. No encerramento do experimento, de cada tubo foram quantificadas, aleatoriamente, 100 larvas, sendo posteriormente contabilizado, desse total, o

número total de larvas consideradas “vivas” (com os órgãos intactos) e “mortas” (com concha vazia e/ou tecido em processo de necrose), seguindo metodologia descrita por O’CONNOR *et al.* (2011). Das larvas “vivas” foi medido ($n = 30$) o comprimento (μm) de concha (SL). As medições foram realizadas em microscópio ótico acoplado à câmera digital (Leica DS50) utilizando software de medição (Leica, Camera Software).

Microalgas

As microalgas foram cultivadas em sistema semicontínuo com meio Guillard F/2 modificado pelo LMM, utilizando água filtrada ($0,2 \mu\text{m}$) e esterilizada (UV), aeração filtrada ($0,2 \mu\text{m}$) com CO_2 (aproximadamente 0,2%), temperatura de 22°C , salinidade 35 e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram colhidas na fase exponencial de crescimento.

Para determinar a quantidade de células necessárias para cada dieta, foi utilizada a correção por volume celular das microalgas descrita por HELM *et al.* (2004), que se baseia em: *Isochrysis* sp. e *P. lutheri* com fator 1; *N. oculata* e *C. calcitrans*, com fator de 2,25; *C. muelleri* com fator 0,75; e *R. salina*, com fator 0,1.

Antes de iniciar os experimentos, foi avaliada a presença/ausência do *Vibrio* sp. nas algas, utilizando Agar TCBS (“Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose”) (O’CONNOR *et al.*, 2011) e a presença de protozoários.

Análise estatística

Realizaram-se testes de homogeneidade (Teste de Bartlett) de variância entre as médias dos tratamentos e distribuição normal dos erros para as variáveis estudadas (sobrevivência e comprimento da concha). Posteriormente, os dados de sobrevivência (experimento 1, 3 e 4) e comprimento de concha (experimentos 3 e 4)

foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de um fator. Quando observadas diferenças entre os tratamentos (havendo mais de dois tratamentos), foi aplicado o teste de Tukey. Os dados de sobrevivência (experimento 2) foram submetidos à Análise de Variância fatorial (dois fatores: tempo e densidade) e, posteriormente, realizou-se o desdobramento da interação (tempo vs. densidade). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS® (SAS, 2003).

RESULTADOS

Análise bacteriológica

As análises bacteriológicas mostraram ausência do *Vibrio* sp. nas microalgas utilizadas em todos os experimentos. Pela presença de protozoários na microalga *P. lutheri*, esta não foi utilizada no experimento 3.

Teste de homogeneidade de variância e normalidade

Não se observou heterogeneidade de variância entre os tratamentos ou desvio da normalidade dos erros nos dados analisados em todos os experimentos; assim, não houve necessidade de transformação dos dados estudados.

Experimento 1

Ao final do experimento, não foram observadas larvas retidas na malha de $120 \mu\text{m}$ para as densidades de 30 e 50 larvas mL^{-1} . Já para os tratamentos de 10 e 15 larvas mL^{-1} , observou-se a presença de larvas retidas na malha de $120 \mu\text{m}$. A sobrevivência após sete dias de larvicultura não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. A maior sobrevivência ($77,78 \pm 10,39\%$) foi observada na densidade de 10 larvas mL^{-1} , e a menor ($37,78 \pm 14,99\%$), no tratamento 50 larvas mL^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1. Sobrevivência de larvas de *Anomalocardia brasiliiana* em quatro densidades de cultivo.

Densidade inicial (larvas mL^{-1})	Densidade final (larvas mL^{-1})	Sobrevivência final (%)
10	7,78	$77,78 \pm 10,39$
15	8,33	$55,56 \pm 14,70$
30	16,94	$56,48 \pm 16,97$
50	18,89	$37,78 \pm 18,36$

Experimento 2

Na análise de variância fatorial da sobrevivência, não houve diferença estatística entre as densidades de cultivo, contudo, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tempo e a interação (densidade vs. tempo) (Tabela 2). No desdobramento da interação, observou-se que, para cinco dias de larvicultura, a sobrevivência das larvas cultivadas na D25 foi superior ($75,16 \pm 16,57\%$) àquela observada na D50 ($45,64 \pm 4,25\%$).

No tempo de sete dias, a sobrevivência na D50 foi superior ($38,42 \pm 5,92\%$) àquela observada na D25 ($19,39 \pm 4,25\%$). Analisando o tempo em cada densidade, verificou-se que no tratamento D25, a sobrevivência das larvas foi superior ($75,16 \pm 16,57\%$) com cinco dias em relação a sete dias de larvicultura ($19,39 \pm 4,25\%$). Contudo, não houve diferença na sobrevivência larval entre 5d ($45,64 \pm 4,25\%$) e 7d ($38,42 \pm 5,92\%$) quando a densidade de cultivo foi de 50 larvas mL⁻¹ (D50).

Tabela 2. Resumo da análise de variância da sobrevivência média de *Anomalocardia brasiliiana* entre os tratamentos. D25 = Densidade de 25 larvas cm⁻²; D50 = Densidade de 50 larvas cm⁻².

Fonte de variação	Graus de liberdade		F	P valor
Tempo	1		34,43	0,0004*
Densidade	1		0,95	0,3579
Tempo*Densidade	1		20,46	0,0019*
Erro	8		-	-

Desdobramento da interação entre tempo e densidade				
	Tempo e densidade		Diferença entre médias	P valor
D25	5 dias	7 dias	55,76	<0,001*
D50	5 dias	7 dias	7,21	0,3694
5 dias	D25	D50	29,50	0,0046*
7 dias	D25	D50	19,04	0,0365*

* indica diferença significativa

Experimentos 3 e 4

Após sete dias de larvicultura, não foi observada diferença significativa na sobrevivência das larvas entre os tratamentos com dieta unialgal (Figura 2A). A maior sobrevivência foi verificada para a dieta Na ($46,42 \pm 10,87\%$), e as menores ocorreram para as dietas Rh e Cm ($22,47 \pm 6,63\%$ e $23,54 \pm 15,81\%$, respectivamente). No experimento com dieta bialgal foram observadas diferenças significativas (Figura 2B) na sobrevivência de larvas entre a dieta Pav-Cm ($72,67 \pm 18,58\%$) e as dietas Na-Cc e Rh-Cc ($12,00 \pm 1,73\%$ e $13,00 \pm 7,00\%$, respectivamente). A sobrevivência das larvas no tratamento sem alimento (Sa) no experimento com dietas unialgais foi de $38,00 \pm 13,00\%$ e para o experimento 4 (dietas bialgais), $23,00 \pm 11,00\%$.

Quando avaliado o comprimento de concha após sete dias de larvicultura no experimento com dietas unialgal, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) dos animais alimentados com a dieta Cc

em relação às demais (com a exceção da Iso), com comprimento médio de $160,15 \pm 18,03 \mu\text{m}$ (Figura 3A). Não foi observada diferença no crescimento das larvas entre as dietas Iso e Na ($142,63 \pm 8,10 \mu\text{m}$ e $134,02 \pm 10,61 \mu\text{m}$, respectivamente) e Iso e Cc, contudo, estas dietas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no crescimento larval em relação às demais dietas testadas. O menor comprimento de concha foi observado em larvas alimentadas com Cm, sendo inferior ao das larvas mantidas sem alimento. Para as dietas bialgais, os melhores resultados de comprimento de concha foram observados para as larvas alimentadas com as dietas de Na-Cm, Pav-Cm e Pav-Cc ($168,72 \pm 6,22 \mu\text{m}$, $164,65 \pm 2,30 \mu\text{m}$ e $165,67 \pm 2,09 \mu\text{m}$, respectivamente) que destacaram-se ($p < 0,05$) em relação às demais dietas (Figura 3B). As larvas que apresentaram menor comprimento de concha foram aquelas alimentadas com Rh-Cm e Rh-Cc e as que não receberam alimento, sendo estas diferentes significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

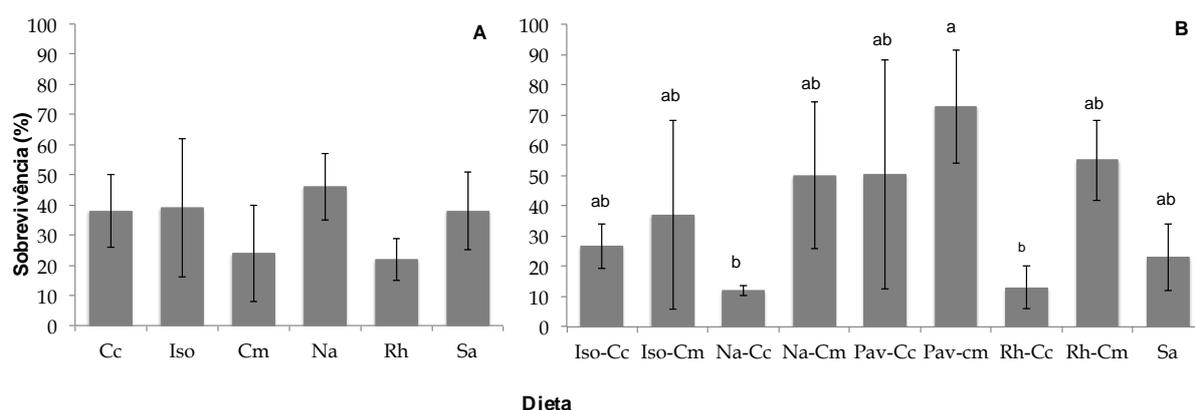


Figura 2. Média e desvio-padrão da sobrevivência das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais (A) e com mistura de duas algas (B) após 7 dias de larvicultura. Cc: *Chaetoceros calcitrans*; Iso: *Isochrysis galbana*; Cm: *Chaetoceros muelleri*; Na: *Nannochloropsis oculata*; Rh: *Rhodomonas salina*; Pav: *Paolova lutheri*; e Sa: sem alimento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística na sobrevivência entre as dietas avaliadas para cada experimento ($p < 0,05$).

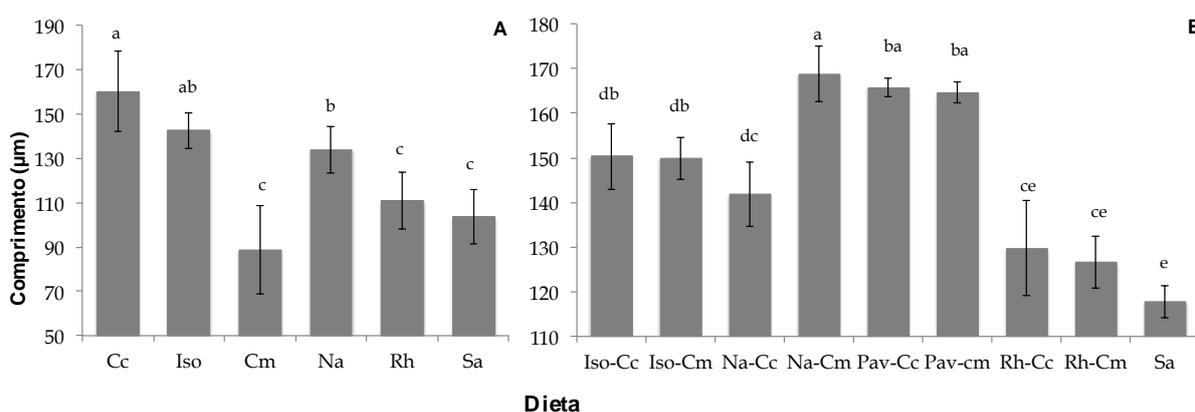


Figura 3. Média e desvio-padrão do comprimento de concha das larvas do berbigão *Anomalocardia brasiliana* alimentadas com dietas unialgais (A) e com mistura de duas algas (B) após sete dias de larvicultura. Cc: *Chaetoceros calcitrans*; Iso: *Isochrysis galbana*; Cm: *Chaetoceros muelleri*; Na: *Nannochloropsis oculata*; Rh: *Rhodomonas salina*; Pav: *Paolova lutheri*; e Sa: sem alimento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística no comprimento de concha entre as dietas avaliadas para cada experimento ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Apesar de não haver diferença significativa, a redução na sobrevivência das larvas, conforme o aumento da densidade de cultivo (experimento 1), pode estar relacionada com a colisão entre as mesmas, a produção de metabólitos secundários e, principalmente, com a menor disponibilidade de alimento.

LOOSANOFF e DAVIS (1963) observaram que, em alta densidade, há efeito deletério no crescimento e na sobrevivência causado pelas frequentes colisões entre as larvas, resultando em

consumo descontínuo de alimento, pois, diante do choque, as larvas fecham as valvas e não se alimentam.

URIARTE *et al.*, (2001) observaram, em altas densidades de cultivo larval de *Argopecten purpuratos*, o aumento do nível de metabólitos (como a amônia), a competição por alimento entre as larvas e a susceptibilidade às doenças. Para as espécies de moluscos de areia *Meretrix meretrix* (LIU *et al.*, 2006) e *Ruditapes philippinarum* (YAN *et al.*, 2006), densidades próximas de 10 larvas mL⁻¹ apresentaram melhores resultados de

sobrevivência e de crescimento em sistemas estáticos de cultivo. Desta forma, observa-se que o alimento é um fator limitante no crescimento de larvas em altas densidades de cultivo.

No experimento 2, que avaliou o tempo de larvicultura e a densidade de cultivo no assentamento, a densidade de 25 larvas cm⁻² e com larvas cultivadas por cinco dias, apresentaram melhores resultados de sobrevivência, provavelmente pela maior disponibilidade de área para o desenvolvimento. A densidade no assentamento está relacionada, entre outros fatores, com o sistema de cultivo utilizado. No assentamento de moluscos de areia são sugeridas densidades de 100 a 150 larvas cm⁻² (HELM *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 1993) para larvas de *Tapes philippinarum*. Segundo LIU *et al.* (2011), as densidades de 20 a 320 larvas cm² não afetaram a taxa de metamorfose de larvas de *Clinocardium nutallii*. Contudo, estes autores sugerem que a taxa de ocupação da superfície da malha não seja maior que 100% da área em sistema descendente ou “downwelling”. Esta taxa de ocupação nos sistemas de fluxo descendente é importante para evitar o aparecimento de zonas mortas de fluxo de água, o que pode afetar o crescimento das pré-sementes ou causar mortalidades (Lagreze F., observação pessoal). Outro aspecto importante é a característica das larvas que se fixam umas às outras na fase de assentamento (MOUËZA *et al.*, 1999), o que em altas densidades de cultivo pode levar a maior mortalidade das mesmas por sufocamento.

Na avaliação do tempo de larvicultura para assentamento, observou-se, no presente estudo, maior sobrevivência após 12 dias de assentamento em densidade de 25 larvas cm⁻² para larvas transferidas com cinco dias de vida. Apesar do processo de metamorfose de *A. brasiliiana* iniciar no sétimo dia de larvicultura (MOUËZA *et al.*, 1999), é possível antecipar a transferência das larvas para assentamento antes do início do processo de metamorfose. As larvas pédiveliger de *A. brasiliiana* não necessitam de substrato para metamorfose (MOUËZA *et al.*, 1999), não passando por atraso no desenvolvimento decorrente da busca de um substrato para se fixar. Esse atraso na metamorfose causa mortalidades em outras espécies de bivalves, como *Mytilus edulis* (BAYNE, 1965, 1976), *Scrobicularia plana* e

Donax vittatus (FRENKIEL e MOUËZA, 1979) e *Codakia orbicularis* (GROS *et al.*, 1997). Neste sentido, a antecipação da transferência das larvas para o assentamento, além de gerar melhores resultados de sobrevivência de pré-sementes, facilita o processo de manejo de limpeza diário das larvas e das unidades de cultivo.

A maior mortalidade das larvas observadas para aquelas transferidas com sete dias de vida pode estar relacionada com a mudança de hábito das mesmas (passam de planctônicas para bentônicas). Nesta fase, as larvas passam a ocupar o fundo do tanque onde, em geral, estão depositados resíduos biológicos (células de algas e larvas mortas, excretos, entre outros), o que pode provocar fragilidade ou mortalidade das larvas.

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

Na dieta unialgal, o crescimento observado no sétimo dia não atingiu o comprimento de concha correspondente para o início da metamorfose (170 µm), o que confirma a falta de nutrientes necessários para maximizar o crescimento até esta etapa. Já com as dietas bialgais, foi possível que as larvas atingissem o tamanho de início de metamorfose.

Na alimentação de moluscos, a ingestão das células está relacionada diretamente com o tamanho da larva (LORA-VILCHIS e MAEDA-

MARTÍNEZ, 1997). Por exemplo, larvas véliger menores de 150 µm podem se alimentar com algas de até 16 µm e larvas véliger maiores (com mais de 200 µm), com microalgas de até 30 µm (SOMMER *et al.*, 2000; BALDWIN e NEWELL, 1995). No presente estudo, as larvas alimentadas com a dieta unialgal *R. salina* apresentaram baixo crescimento, provavelmente, pelo tamanho ou digestibilidade dessa microalga em relação às outras algas avaliadas. LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ (1997) observaram que larvas de *Argopecten ventricosus-circularis*, com altura aproximada de 95 µm, não conseguem ingerir as algas que possuem espículas como *C. calcitrans* e *C. muelleri* e, por sua vez, até o sétimo dia de vida, as larvas não conseguiram ingerir *Tetraselmis suecica* (8-9 µm) ou *Thalassiosira pseudonana* (10-11 µm).

Além do tamanho da célula, deve ser considerada a digestibilidade da microalga, a qual está relacionada com a estrutura da parede celular e a morfologia da alga. Em geral, as espécies flageladas são de fácil digestão, como é o caso de *P. lutheri* e *I. galbana* (LE PENNEC e RANGEL-DAVALOS, 1985; LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ, 1997). O gênero *Nannochloropsis* é citado como microalgas de baixa digestão, ainda que ingerida facilmente, possivelmente pela presença da parede celular de glicoproteína (LORA-VILCHIS e MAEDA-MARTÍNEZ, 1997; MARTÍNEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2004). Contudo, RONQUILLO *et al.* (2012) observaram que juvenis da ostra *Ostrea edulis* apresentaram maior crescimento quando alimentados com uma mistura de *P. lutheri* e *N. oculata*. Da mesma forma, O'CONNOR *et al.* (2011) observaram que as melhores taxas de crescimento e metamorfose de larvas da ostra *Ostrea angasi* foram obtidas utilizando dietas contendo *N. oculata*. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com esses autores, e as microalgas *N. oculata*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* e *C. muelleri*, fornecidas como dietas bialgais, proporcionaram bom crescimento das larvas. Apesar das espécies do gênero *Isochrysis*, *Paolova* e *Chaetoceros* serem as mais utilizadas na larvicultura de bivalves (SOUTHGATE, 2008), a espécie *N. oculata* apresentou bons resultados de sobrevivência de larvas de *A. brasiliana*.

Utilizando dietas bialgais compostas por microalgas de diferentes tamanhos (menores e

maiores), como é o caso de *N. oculata* com *C. muelleri* e de *P. lutheri* com *C. calcitrans*, as larvas podem se alimentar das células menores nos primeiros dias de vida e, conforme seu crescimento, passar a ingerir células maiores. A maior disponibilidade e diversidade de espécies de microalgas que as larvas possam ingerir contribuirá para suprir suas necessidades nutricionais.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a larvicultura de *A. brasiliana*, em sistema estático com trocas de água diárias e peneiramentos a cada 48 h, seja realizada com densidades iniciais entre 10 e 30 larvas mL⁻¹. Após o quinto dia, as larvas podem ser transferidas para o assentamento e cultivadas em densidade de 25 larvas cm⁻².

Recomenda-se utilizar na larvicultura de *A. brasiliana* as dietas mistas *N. oculata* com *C. muelleri*, *P. lutheri* com *C. calcitrans* e *P. lutheri* com *C. muelleri*, fornecidas na concentração de 2,2 x 10⁴ células mL⁻¹ (primeiro e segundo dias) e 3,5 x 10⁴ células mL⁻¹ (terceiro e quarto dias).

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- BALDWIN, B.S. e NEWELL, R.I.E. 1995 Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Marine Ecology Progress Series*, 120: 135-145.
- BAYNE, B.L. 1965 Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2: 1-47.
- BAYNE, B.L.; THOMPSON R.J.; WIDDOWS, J. 1976 Physiology: I. In: BAYNE, B.L. (ed.) *Marine mussels: their ecology and physiology*. London: Cambridge University Press. 506p.

- BOEHS, G.; ABSHER, T.M.; CRUZ-KALED, A.C. 2008 Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia:Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(2): 259-270.
- BOEHS, G., VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. 2010 Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilheus, Bahia, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 43-47.
- DA SILVA P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. 2012 Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. *Journal of Marine Biology*, 92: 571-579.
- DEMING, C.J. e RUSSELL, M.P. 1999 Assessing manipulations of larval density and culling in hatchery production of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Shellfish Research*, 18: 99-105.
- FRENKIEL, L. e MOUËZA, M. 1979 Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Marine Biology*, 55: 187-195.
- GALLAGER, S.M. e MANN, R. 1986 Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56: 105-121
- GROS, O.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. 1997 Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology*, 116: 86-101.
- HELM, M.M. e LAING, I. 1987 Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti Isochrysis" to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62: 281-288.
- HELM, M.M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. 2004 *Hatchery Culture of Bivalves. A Practical Manual*. FAO Fisheries Technical Paper No. 471. FAO, Rome. 177p.
- HIS, E.; ROBERT, R.; DINET, A. 1989 Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100: 455-463.
- JONES, G.G.; SANFORD, C.L.; JONES B.L. 1993 Manila Clams: Hatchery and Nursery Methods. Innovative Aquaculture Products Ltd.. 70p. Disponível em: <<http://www.innovativeaqua.com/Publication/clam.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2013.
- LE PENNEC, M. e RANGEL-DAVALOS, C. 1985 Observations en microscopie a epifluorescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez des jeunes larves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia). *Aquaculture*, 47: 39-51.
- LIU, B.Z.; DONG, B.; TANG, B.J.; ZHANG, T.; XIANG, J.H. 2006 Effect of stocking density on growth, settlement and survival of clam larvae, *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 258: 344-349.
- LIU, W.; PEARCE, C.M.; ALABI, A.O.; BEERENS, A.; GURNEY-SMITH, H. 2011 Effects of stocking density, ration, and temperature on growth of early post-settled juveniles of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, 320(1-2): 129-136.
- LOOSANOFF, V. e DAVIS, H.C. 1963 Rearing of bivalve larvae. *Advances in Marine Biology*, 1: 1-136.
- LORA-VILCHIS, M.C. e MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. 1997 Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*, 28(12): 905-910.
- LUZ, J.R. e BOEHS, G. 2011 Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilheus, Bahia. *Brazilian Journal of Biology*, 71(3): 679-686.
- MARSHAL, R.; MCKINLEY, S.; PEARCE, C.M. 2010 Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2: 33-55.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; RANGEL-DÁVALOS, C. 2004 Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*, 230: 417-423.
- MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. 1999 Embryonic, larval and postlarval development

- of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). *Journal of Molluscan Studies*, 65: 73-88.
- NARCHI, W. 1972 Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). *Bulletin of Marine Science*, 22: 643-670.
- NELL, J.A. e O'CONNOR, W.A. 1991 The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99: 277-284.
- NELL, J.A.; O'CONNOR, W.A.; HEASMAN, M.P.; GOARD, L.J. 1994 Hatchery production for the venerid clam *Katelsysia rhytiphora* (Lamy) and the Sydney cockle *Anadara trapezia* (Deshayes). *Aquaculture*, 119: 149-156.
- O'CONNOR, S.; MOLSCHANIWSKYJ, N.; BOLCH, C.J.S.; O'CONNOR, W. 2011 Dietary influence on growth and development of flat oyster, *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871), larvae. *Aquaculture Research*, 43(9): 1-11.
- PERNET, F.; TREMBLAY, R.; BOURGET, E. 2003 Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: larval growth, competency, and settlement. *Journal of Shellfish Research*, 22: 377-388.
- RIOS, E.C. 2009 *Compendium of Brazilian Sea Shells*. Rio Grande, RS: Evangraf. 676p.
- ROBERT, R.; HIS, E.; DINET, A. 1988 Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 97: 95-100.
- RONQUILLO, J.D.; FRASER, J.; McCONKEY, A. 2012 Effect of mixed microalgal diets on growth and polynsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. *Aquaculture*, 360-361: 64-68.
- SOMMER, F.; STIBOR, H.; SOMMER, U.; VELIMIROV, B. 2000 Grazing by mesozooplankton from Kiel Bight, Baltic Sea, on different sized algae and natural seston size fractions. *Marine Ecology Progress Series*, 199: 43-53.
- SOUTHGATE, P.C. 2008 Pearl oyster culture. In: SOUTHGATE, P.C. e LUCAS, J. (eds.) *The pearl oyster*. Elsevier 1st Ed., p.231-272.
- SAS Institute Inc. 2003 *SAS OnlineDoc® 9.1*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- THOMPSON, P.A.; GUO, M.; HARRISON, P.J. 1993 The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 117: 259-268.
- URIARTE, I.; FARIAS, A.; CASTILLA, J.C. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture Engineering*, 25: 139-147.
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N.; GINTHE, N.G. 1990 Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Biology*, 106: 239-244.
- YAN, X.; ZHANG, G.; YANG, F. 2006 Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253(1): 350-358.
- YAN, X.; ZHANG, Y.; HUO, Z.; YANG, F.; ZHANG, G. 2009 Effects of starvation on larval growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 29: 327-334.