

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E SOBRE A QUALIDADE SANITÁRIA DE OSTRAS
(*Crassostrea* spp.) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Doutoranda: MSc. Aline Horodesky

Orientador: Dr. Antonio Ostrensky

Coorientadora: Dra. Gisela G. Castilho-Westphal

CURITIBA

2017

ALINE HORODESKY

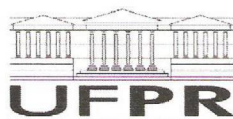
**INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E SOBRE A QUALIDADE SANITÁRIA DE OSTRAS
(*Crassostrea* spp.) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Tese apresentada ao Curso de Pós- Graduação
em Ciências Biológicas - Zoologia da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutora em
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky
Coorientadora: Dra. Gisela G. Castilho-Westphal

CURITIBA

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALINE HORODESKY** intitulada: **INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E/OU SOBRE A QUALIDADE SANITÁRIA DE OSTRAS (CRASSOSTREA SPP.) CULTIVADAS E COMERCIALIZADAS NO BRASIL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

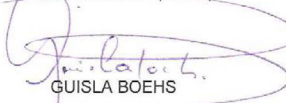
Curitiba, 21 de Fevereiro de 2017.


GISELA GERALBINE CASTILHO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


CARLOS EDUARDO BELZ
Avaliador Externo (UFPR)


LUCIENE CORREA LIMA
Avaliador Externo (UFPR)


FRANCISCO JOSÉ LAGREZE SOUELLA
Avaliador Externo (UFPR)


GUISLA BOEHS
Avaliador Externo (UESC)

Superar o fácil não tem mérito, é obrigação;
Vencer o difícil é glorificante;
Ultrapassar o que até então era impossível é esplendoroso!

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio Ostrensky pela orientação e oportunidade de trabalhar em sua equipe, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais.

À professora Gisela G. C. Westphal pela coorientação e por compartilhar suas experiências durante todo o período de trabalho.

À Pós Graduação em Zoologia pela oportunidade de ser aluna do programa. E a Capes pela concessão da bolsa.

À Fundação Araucária e ao SEBRAE, pelo financiamento do projeto, e ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) pela execução do mesmo.

Aos professores Luciene Lima, Guisla Boehs, Francisco Lagreze, Carlos Belz e Ubiratan Silva que atenderam ao nosso pedido de compor a banca de defesa, compartilhando seus conhecimentos e experiências para avaliação deste trabalho.

À Associação Guaratubana de Maricultores (AGUAMAR), por ceder as ostras utilizadas no trabalho, em especial, ao Nereu Oliveira por disponibilizar seu espaço para a realização das atividades.

Ao Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos da UFPR pelas contribuições científicas sobre genética. Em especial agradeço a Patrícia Ströher pelo auxílio no processamento e análise das amostras.

Ao Laboratório de Bioquímica da UFPR pelo sequenciamento das amostras, em especial à Michelle Zibetti, Eduardo Balsanelli e Helisson Faoro, que me incentivaram durante todo o período de análise.

Aos estagiários Patrícia Vargas, Marcelo Souza e Renan Rodrigues por todo auxílio durante os experimentos.

Ao GIA por ceder toda a sua estrutura para a realização do trabalho e à sua equipe que se tornou uma família para mim.

APRESENTAÇÃO

Os representantes do gênero *Crassostrea* apresentam grande interesse e exploração comercial no Brasil. No ambiente, esses animais formam bancos na zona entremarés e de infralitoral, fixando-se em substratos rochosos e raízes do mangue.

Duas espécies de ostras desse gênero, encontradas naturalmente no litoral brasileiro, destacam-se em função do seu interesse econômico: *C. rhizophorae* e *C. gasar* (sinonímia *C. brasiliiana*). Uma terceira espécie, *C. gigas*, originária da região do Pacífico, também é cultivada e comercializada no litoral brasileiro, principalmente no estado de Santa Catarina.

O destaque econômico dessas ostras, ocorre devido à alta fecundidade, rápido crescimento e rentabilidade comercial, além do alto valor nutricional da carne e da possibilidade de uso da concha como matéria-prima na fabricação de produtos por processos industriais.

Essas ostras são geralmente cultivadas em ambientes estuarinos, zona de transição entre água doce e marinha, que apresentam variações sazonais e diárias dos fatores ambientais e estão sujeitos a diversas alterações antrópicas, dentre elas o aporte de matéria orgânica de origem urbana e rural. Excessos de matéria orgânica, por sua vez, provocam aumento da atividade microbiana, com consequentes alterações na macro e microbiota local, redução da qualidade da água que, por conseguinte, afeta o desenvolvimento e até mesmo a qualidade microbiológica e comercial dos animais cultivados.

No caso do cultivo de ostras, características ambientais, biogeográficas e interações biológicas podem influenciar diretamente no desenvolvimento dos animais, afetando variáveis zootécnicas e biológicas como o seu crescimento, reprodução e sobrevivência. Além disso, as ostras são animais filtradores, que se alimentam de plâncton. Micro-organismos patogênicos presentes na água podem ser filtrados e concentrados no trato gastrointestinal dos moluscos. Caso as etapas de transporte, armazenamento e manipulação sejam realizadas inadequadamente, o consumo de ostras pode representar riscos à saúde pública.

O objetivo da tese foi avaliar e compreender a influência de fatores físicos, químicos e biológicos sobre a sobrevivência e sobre a qualidade sanitária de ostras produzidas e comercializadas em diferentes regiões brasileiras.

Espera-se que o trabalho contribua para a compreensão da influência que os fatores ambientais exercem nas diferentes fases de produção e de comercialização de ostras.

Especificamente em relação à produção, o que se busca é gerar informações que possam levar ao aumento da eficiência produtiva na ostreicultura, e, como consequência, reduzir impactos ambientais associados à atividade. Já em relação à fase de comercialização, o trabalho está focado na qualidade sanitária das ostras e, como consequência, na saúde dos consumidores. Neste caso, o trabalho foca na quantificação de micro-organismos patogênicos presentes em ostras, a partir do uso de um método inovador, que possibilita o completo mapeamento dos micro-organismos presentes nas amostras analisadas.

A tese foi estruturada em cinco capítulos, que abordam os seguintes temas:

Capítulo I: Efeitos da salinidade sobre a sobrevivência e sobre o tecidos de ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757);

Capítulo II: Avaliação de métodos para redução do número de epibiontes em ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), durante cultivo;

Capítulo III: Análise metagenômica da microbiota bacteriana de ostras cultivadas (*Crassostrea* sp.) na região Nordeste do Brasil;

Capítulo IV: Avaliação metagenômica dos efeitos das condições de armazenamento sobre a microbiota bacteriana de ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757);

Capítulo V: Caracterização metagenômica da microbiota bacteriana de ostras (*Crassostrea* spp.) comercializadas no estado do Paraná.

RESUMO GERAL

Esta tese foi dividida em cinco capítulos relacionados à cadeia produtiva brasileira de ostras do gênero *Crassostrea*. No Capítulo I avaliou-se, em condições laboratoriais, a sobrevivência e a histopatologia de *C. gasar* expostas a diferentes salinidades. Ostras foram submetidas à aclimação gradual a 14 salinidades entre 0 e 65 UPS e sua sobrevivência foi monitorada diariamente por até 365 dias. Foram definidas três faixas de tolerância à salinidade (ótima: 4 a 40 UPS; tolerável: 2,1 a 3,9 e 41 a 49 UPS; e, intolerável: 0 a 2 e > 50 UPS), a partir dos dados de sobrevivência. A salinidade não induziu alterações teciduais. No Cap. II analisou-se a eficácia de seis métodos de redução de organismos epibiontes em ostras (exposição à água doce; à água hipersalina; à água com hipoclorito de sódio; à água contendo solução de amônia quaternária; exposição ao ar e limpeza por hidrojateamento). Foram identificados 56.407 organismos epibiontes, pertencentes a nove filos, principalmente Arthropoda, Mollusca e Annelida. Os tratamentos com água doce e hidrojateamento foram os mais eficazes na redução de epibiontes e resultaram em uma menor mortalidade de ostras. No Cap. III avaliou-se a microbiota bacteriana de ostras cultivadas em sete estados do Nordeste brasileiro, a partir da metagenômica, durante períodos de seca e de chuvas. Foram identificados 106 gêneros de bactérias pertencentes a 103 famílias, 70 ordens, 39 classes e 21 filos. Dos gêneros identificados, 40 foram de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos e seis para ostras, sendo os mais prevalentes *Mycoplasma*, *Propionigenium*, *Psychrilyobacter* e *Arcobacter*. No Cap. IV abordou-se a influência das condições de armazenamento sobre a microbiota bacteriana de ostras vivas. Ostras foram expostas a dois tratamentos (TI=imersão em água; TII=exposição ao ar), em cinco temperaturas entre 5 e 25°C, por 10 dias. As ostras imersas em água apresentaram maior quantidade de gêneros bacterianos (n=163) quando comparadas àquelas expostas ao ar (n=104). Foram identificados 59 gêneros potencialmente patogênicos para os seres humanos (TI=56 e TII=45). Recomenda-se que durante o armazenamento e a comercialização, as ostras vivas sejam expostas ao ar entre 5 e 25°C, em substituição a técnica de imersão em água, por ser esse um método mais eficaz e seguro. No Cap. V caracterizou-se a microbiota bacteriana em ostras comercializadas no estado do Paraná, em diferentes formas de apresentação comercial, por metagenômica. Foram analisadas amostras de ostras *in natura*, minimamente processadas (congeladas inteiras) e ultraprocessadas (carpaccio, ostras prontas para gratinar ou ostras com molho branco) provenientes de supermercados, peixarias e fazendas de cultivo de cinco mesorregiões do estado do Paraná. Foram identificados 88 gêneros bacterianos pertencentes a 80 famílias, 45 ordens, 24 classes e 15 filos. Havia bactérias relacionadas à qualidade da água de cultivo (*Vibrio*, *Bacteroides*), a forma de armazenamento (*Shewanella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter* e *Pseudoaltermonas*), aos ingredientes utilizados nas amostras ultraprocessadas (*Lactobacillus*) e à manipulação (*Streptococcus*). A microbiota bacteriana das ostras comercializadas no Paraná esteve associada à apresentação desse alimento. Também foram identificadas bactérias potencialmente patogênicas e que não são alvo de monitoramento pela legislação sanitária brasileira. A partir dos resultados pode-se afirmar que fatores físicos, químicos e biológicos, testados no presente estudo, tiveram influência direta sobre a sobrevivência e a qualidade microbiológica de ostras cultivadas e comercializadas em diferentes regiões brasileiras.

Palavras-chave: cultivo; ostreicultura; patogenicidade; microbiologia; metagenômica.

GENERAL ABSTRACT

This thesis is divided in five chapters related to the Brazilian productive chain of oysters of the genus *Crassostrea*. In Chapter I, the survival and histopathology of *C. gasar* exposed to different salinities were evaluated under laboratory conditions. Oysters underwent gradual acclimatization at 14 salinities between 0 and 65 UPS and their survival was monitored daily for up to 365 days. Three ranges of tolerance to salinity were identified (optimal: 5 to 35 UPS, tolerable: 3, 4 and 40 UPS, and intolerable: 0 to 2 and 45 to 65 UPS). Salinity did not induce tissue changes. The effectiveness of six methods of reducing biofouling in oysters (exposure to fresh water, hypersaline water, water with sodium hypochlorite, water containing quaternary ammonia solution, air exposure and cleaning by Hydro blasting). We identified 56.407 biofouling organisms belonging to nine phyla, mainly Arthropoda, Mollusca and Annelida. Freshwater and hydro blasting treatments were the most effective in reducing biofouling and resulted in lower oyster mortality. In Chapter III the bacterial microbiota of oysters framed in seven Brazilian Northeast states was evaluated by sequencing of next generation during periods of drought and rainfall. We identified 106 genera of bacteria belonging to 103 families, 70 orders, 39 classes and 21 phyla. Of the genera identified, 40 were from bacteria potentially pathogenic to humans and six to oysters, the most prevalent being *Mycoplasma*, *Propionigenium*, *Psychrilyobacter* and *Arcobacter*. In Chapter IV the influence of the storage conditions on the bacterial microorganism of live oysters was discussed. Oysters were exposed to two treatments (TI = immersion in water; TII = air exposure), at five temperatures between 5 and 25 °C, for 10 days. Oysters immersed in water had a higher amount of bacterial (n = 163) compared to those exposed to air (n = 104). Fifty-nine genera were identified as potentially pathogenic for humans (TI = 56 and TII = 45). It is recommended that during live storage and marketing live oysters are exposed to air at 5 to 25 °C, replacing the immersion technique in water, as this is a more effective and safe method. In Chapter V the bacterial microbiota was characterized in oysters commercialized in the state of Paraná, in different forms of commercial presentation, by sequencing of new generation DNA. Samples of live, minimally processed (whole frozen) and ultraprocessed oysters (carpaccio, oysters ready for gratin or oysters with white sauce) were analyzed from supermarkets, fishmongers and farms of five mesoregions from the state of Paraná. We identified 88 bacterial genera belonging to 80 families, 45 orders, 24 classes and 15 phyla. There were bacteria related to the quality of cultured water (*Vibrio*, *Bacteroides*), the storage form (*Shewanella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudoaltermonas*), the ingredients used in the samples ultraprocessed (*Lactobacillus*) and manipulation (*Streptococcus*). The bacterial microbiota of oysters marketed in Paraná was associated with the presentation of this food. Potentially pathogenic bacteria have also been identified and are not subject to monitoring by Brazilian sanitary legislation. Our results suggest that physical, chemical and biological factors, tested in the present study, display a direct influence on survival and microbiological quality of oysters farmed and commercialized in different Brazilian regions.

Keywords: cultivation; oyster farming; pathogenicity; microbiology; metagenômica.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
APRESENTAÇÃO	VI
RESUMO GERAL.....	VIII
GENERAL ABSTRACT	IX
SUMÁRIO	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
 1CAPÍTULO I - EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E A HISTOPATOLOGIA DE OSTRAS-DO-MANGUE <i>CRASSOSTREA GASAR</i> (ADANSON, 1757)	 1
1.1 RESUMO.....	2
1.2 ABSTRACT	2
1.3 INTRODUÇÃO	3
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	4
1.4.1 Obtenção dos animais	4
1.4.2 Procedimentos comuns aos experimentos 1 e 2	4
1.4.3 Experimento 1	5
1.4.4 Experimento 2	6
1.5 RESULTADOS.....	8
1.5.1 Experimento 1 – efeitos da salinidade sobre a sobrevivência de ostras	8
1.5.2 Experimento 2 – efeito da salinidade sobre a histopatologia de ostras....	11
1.6 DISCUSSÃO.....	13
1.7 REFERÊNCIAS	15
 2CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA REDUÇÃO DO NÚMERO DE EPIBIONTES EM OSTRAS-DO-MANGUE, <i>CRASSOSTREA GASAR</i> (ADANSON, 1757), DURANTE CULTIVO.....	 19
2.1 RESUMO.....	20
2.2 ABSTRACT	20
2.3 INTRODUÇÃO	21
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22

2.4.1	Obtenção dos animais	22
2.4.2	Tratamentos para ostras colonizadas por epibiontes	23
2.4.3	Período pós-exposição aos tratamentos	24
2.4.4	Avaliação de epibiontes.....	26
2.4.5	Índices biométricos.....	26
2.4.6	Análise de dados.....	27
2.5	RESULTADOS.....	27
2.5.1	Variáveis abióticas	28
2.5.2	Epibiontes	29
2.5.3	Mortalidade das ostras pós-exposição.....	32
2.5.4	Variáveis biométricas e índice de condição	33
2.6	DISCUSSÃO.....	35
2.7	REFERÊNCIAS	39

3CAPÍTULO III - ANÁLISE DA MICROBIOTA BACTERIANA DE OSTRAS CULTIVADAS (*CRASSOSTREA* SP.) UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO..... 43

3.1	RESUMO.....	44
3.2	ABSTRACT	44
3.3	INTRODUÇÃO.....	45
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.4.1	Área de estudo	47
3.4.2	Variáveis abióticas	47
3.4.3	Amostragem	48
3.4.4	Processamento das amostras.....	48
3.4.5	Análise de dados.....	50
3.5	RESULTADOS.....	50
3.5.1	Microbiota bacteriana	50
3.5.2	Variáveis abióticas	56
3.6	DISCUSSÃO.....	57
3.7	REFERÊNCIAS	61

4CAPÍTULO IV - UTILIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE NOVA GERAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A MICROBIOTA BACTERIANA DE OSTRAS *CRASSOSTREA GASAR* (ADANSON, 1757)..... 65

4.1	RESUMO.....	66
4.2	ABSTRACT	66
4.3	INTRODUÇÃO.....	67
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.4.1	Obtenção dos animais	68
4.4.2	Experimentação	69

4.4.3	Extração de DNA.....	70
4.4.4	Análise de dados.....	71
4.5	RESULTADOS.....	71
4.5.1	Mortalidade	71
4.5.2	Microbiota bacteriana	72
4.6	DISCUSSÃO.....	82
4.7	REFERÊNCIAS	84
 5CAPÍTULO V - CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE OSTRAS COMERCIALIZADAS (<i>CRASSOSTREA</i> SPP.) UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO		88
5.1	RESUMO.....	89
5.2	ABSTRACT	89
5.3	INTRODUÇÃO	90
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	92
5.4.1	Área de estudo	92
5.4.2	Amostragem	93
5.4.3	Processamento das amostras.....	94
5.4.4	Análise de dados.....	96
5.5	RESULTADOS.....	96
5.6	DISCUSSÃO.....	105
5.7	REFERÊNCIAS	109
 6 EPÍLOGO		122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sobrevivência e faixas de tolerância das ostras expostas as diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos experimentais (salinidades), utilizando o teste de Kruskal-Wallis.....	10
Figura 2: Alterações teciduais e patógenos encontrados nas ostras expostas às diferentes salinidades. A: <i>Brown cells</i> ; B: Hiperplasia no tecido branquial; B: Hipertrofia de células do tecido branquial; D: <i>Rickettsia-like organism</i> ; E: <i>Nematopsis</i> sp.; F: parasito metazoário.	12
Figura 3: Disposição das lanternas no cultivo contendo as ostras de cada tratamento.	25
Figura 4: Média da variação das variáveis abióticas da água mensurada durante o período experimental (30 dias) no local de instalação das estruturas de cultivo. T (superfície): 1º andar da lanterna; T (fundo): 4º andar da lanterna.	29
Figura 5: Relação entre o número de epibiontes identificados nas conchas das ostras expostas aos diferentes tratamentos, nos períodos pós-tratamento (15 e 30 dias). Linha contínua e tracejada apresentando, respectivamente, a média e o erro padrão do número de epibiontes no Tempo 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis.....	31
Figura 6: Percentagem de ostras mortas no grupo controle e nos respectivos tratamentos utilizados para combate aos organismos epibiontes. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de 15 e de 30 dias.	33
Figura 7: Índice de condição de ostras expostas aos diferentes tratamentos, nos períodos pós-tratamento (15 e 30 dias). Linha contínua e tracejada apresentando, respectivamente, a média e o erro padrão do índice de condição no Tempo 0. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os períodos pós-tratamento (15 e 30 dias), ambos analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.	35
Figura 8: Localização dos pontos de coleta de ostras para a determinação da microbiota bacteriana.....	47
Figura 9: Média e erro padrão dos gêneros bacterianos prevalentes (> 5%), em %, nas amostras de ostras expostas aos tratamentos de imersão em água (tratamento I) e exposição ao ar (tratamento II).....	80
Figura 10: Percentual de bactérias prevalentes identificado em cada tempo analisado para as diferentes temperaturas de exposição. (A) Tratamento de imersão em água (I) e (B) tratamento de exposição ao ar (II).....	81
Figura 11: Localização geográfica dos municípios e das mesorregiões onde se comercializam ostras no estado do Paraná, Brasil.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios (mín-máx) das variáveis abióticas mensuradas nos diferentes tratamentos (salinidades) ao longo do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....	9
Tabela 2: Número total de ostras analisadas e mortas durante o período experimental nos diferentes tratamentos (salinidades).....	11
Tabela 3: Valores médios (mín-máx) para o índice do órgão (I_{org}), segundo Bernet et al. (1999), obtido para as alterações registradas em 5 filamentos branquiais por ostra exposta às diferentes salinidades. w = fator de importância.....	13
Tabela 4: Tratamentos empregados para redução da colonização de ostras por epibiontes.	23
Tabela 5: Mensuração das variáveis abióticas durante a exposição das ostras aos métodos de tratamento. T1: temperatura da água; T2: temperatura do ar; OD: oxigênio dissolvido; S: salinidade.	28
Tabela 6: Abundância de epibiontes presentes nas conchas das ostras expostas aos diferentes tratamentos nos tempos 0, 15 e 30 dias.	30
Tabela 7: Análise da eficácia dos diferentes tratamentos sobre os filos de epibiontes encontrados nas conchas das ostras em relação ao grupo controle (Sim – existência de diferenças significativas; Não – inexistência de diferenças significativas, NC – não comparável, $\alpha = 0,05$).	32
Tabela 8: Variáveis biométricas (média e mín-máx) das ostras expostas aos diferentes tratamentos, no tempo 0 e durante todo o período experimental. Letras	

diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Kruskal-Wallis.....	34
Tabela 9: Percentual médio de filos e gêneros de bactérias encontradas nas ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil. * Bactérias potencialmente patogênicas para as ostras; ** Bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos; *** Bactérias que podem ser causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos.....	51
Tabela 10: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner para as amostras de ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil.....	54
Tabela 11: Bactérias prevalentes (> 5%) nas amostras de ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil.....	55
Tabela 12: Variáveis abióticas mensuradas durante as quatro campanhas amostrais nos pontos de coleta das ostras na região Nordeste do Brasil.	56
Tabela 13: Tempo de sobrevivência (dias) e número de ostras analisadas durante todo o período de exposição aos diferentes tratamentos.....	71
Tabela 14: Quantidade de categorias taxonômicas identificada nos diferentes tratamentos.	72
Tabela 15: Percentual médio de filos e gêneros bacterianos identificados em ostras expostas a diferentes temperaturas, imersas (tratamento I) ou não em água (tratamento II). * Filos/gêneros com espécies potencialmente patogênicas para os seres humanos; ** Filos/gêneros com espécies causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) em humanos.	73

Tabela 16: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner no início (dia 0) e no final do experimento para as amostras de ostras expostas aos diferentes tratamentos.....	78
Tabela 17: Descrição das amostras de ostras adquiridas nos pontos de venda no estado do Paraná, Brasil.	94
Tabela 18: Percentual de filos e gêneros de bactérias encontradas em ostras comercializadas no estado do Paraná. * Bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos; ** Filos/gêneros com espécies causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs).	98
Tabela 19: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner para as amostras de ostras comercializadas no estado do Paraná.....	103
Tabela 20: Bactérias prevalentes (presença > 5%) nas amostras de ostras comercializadas no estado do Paraná.	104

**1 CAPÍTULO I - EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E SOBRE O
TECIDO DE OSTRAS *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)**

EFFECTS OF SALINITY ON SURVIVAL AND TISSUE OF THE OYSTER *Crassostrea gasar*
(Adanson, 1757)

1.1 RESUMO

A ostra *Crassostrea gasar* é cultivada em ambientes estuarinos que sofrem variações sazonais e diárias de diversos fatores ambientais. A salinidade da água está entre os fatores de maior influência na distribuição, abundância, crescimento e sobrevivência dessa ostra. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevivência e o tecido da ostra *C. gasar* exposta a diferentes salinidades, em condições laboratoriais. Foram realizados dois experimentos com ostras provenientes de cinco fazendas marinhas localizadas na baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. No experimento 1 as ostras foram submetidas à aclimação gradual a salinidades variando de 0 a 65 UPS (Unidade Prática de Salinidade) e mantidas em laboratório por até 365 dias. Durante esse período, a sobrevivência foi monitorada diariamente. No experimento 2, as ostras foram expostas a salinidades de 0, 10, 25, 40 e 50 UPS por até 30 dias. Periodicamente, amostras de cada tratamento eram coletadas para processamento histológico. Foram definidas três faixas de tolerância da ostra *C. gasar* à salinidade: ótima (4 a 40 UPS), tolerável (2,1 a 3,9 e 41 a 40 UPS) e intolerável (0 a 2 e > 50 UPS). Não foram encontradas evidências de alterações histopatológicas em função da variação de salinidade a que as ostras foram submetidas.

Palavras-chave: mortalidade; histologia; estuário; cultivo.

1.2 ABSTRACT

The *Crassostrea gasar* oyster is farmed in estuarine environments that undergo daily and seasonal variations of several environmental factors. The water salinity displays major influence on the distribution, abundance, growth and survival of this species. The aim of this study was to evaluate the survival capacity and tissue of *C. gasar* exposed to different salinities under laboratory conditions. Two experiments were carried out with oysters from different marine farms located in the bay of Guaratuba, Paraná, Brazil. In the first experiment, oysters were submitted to a gradual acclimatization to salinities varying from 0 to 65 PSU (Practical Salinity Unit) and kept in laboratory conditions up to 365 days. During this period survival was monitored daily. In experiment 2, oysters were exposed to salinities 0, 10, 25, 40 and 50 UPS for 30 days. Periodically, samples from each treatment were collected for histological processing. Three ranges of *C. gasar* tolerance to salinity were defined: excellent (4 to 40 PSU), tolerable (2,1 to 3,9 and 41 to 49 PSU) and intolerable (0 to 2 and > 50 PSU). No histopathological changes were observed as a result of the salinity variation.

Keywords: mortality; histology; estuary; cultivation.

1.3 INTRODUÇÃO

Crassostrea gasar (sinonímia = *C. brasiliiana*) está presente na costa ocidental da África, desde o Senegal até Angola (Afinowi, 1984), assim como na costa Atlântica da América do Sul, da Guiana Francesa até o sul do Brasil (Lapègue *et al.*, 2002; Baldan e Bendhack, 2009). É popularmente conhecida como ostra-do-mangue por se fixar às raízes de mangue na zona entremarés ou assentada diretamente no fundo da zona infralitoral (Areias, 2012).

A ostra *C. gasar* é cultivada em ambientes estuarinos, que apresentam grandes flutuações sazonais e até diárias de diversas variáveis ambientais (Vilanova e Chaves, 1988; Pereira, 2003), dentre as quais a salinidade, é a mais importante na distribuição, abundância, crescimento e sobrevivência de ostras (Wells, 1961; Tolley *et al.*, 2006).

A salinidade pode afetar diretamente os processos fisiológicos de larvas de moluscos, interferindo na sua capacidade de alimentação, duração da fase planctônica e na habilidade para selecionar locais de fixação (Siddall, 1982). Em ostras juvenis e adultas, a capacidade de sobreviver às variações de salinidade está relacionada à sua eficiência osmoconformadora (Galtsoff, 1964; Shumway, 1996).

Assim como a maioria dos bivalves, as ostras não possuem mecanismos sofisticados de osmorregulação (Cormier Méthé, 2015). Aliás, elas não regulam, mas sim diluem/concentram a osmolaridade extracelular, pelo rápido aumento/diminuição do volume celular em resposta ao fluxo de água produzido pelo estresse osmótico (Pierce, 1982). Desta forma, o fluido extracelular permanece isosmótico em relação ao fluido presente na cavidade do manto (Loosanoff, 1953).

A capacidade de equilíbrio osmótico com o ambiente difere significativamente entre as ostras de uma mesma espécie que habitam diferentes biótopos aquáticos, devido principalmente ao seu polimorfismo populacional (Pierce, 1982). Sabe-se que, apesar da ampla tolerância que apresentam, dependendo da amplitude e da velocidade de variação da salinidade, podem ocorrer alterações teciduais e uma drástica redução nas taxas de sobrevivência e crescimento das ostras (La Peyre, 2003; Downs *et al.*, 2009; Levinton *et al.*, 2011; Parada *et al.*, 2012).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar, em condições laboratoriais, a sobrevivência e o tecido da ostra *C. gasar* exposta a diferentes salinidades.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos independentes: Experimento 1 - efeitos da salinidade sobre a sobrevivência das ostras; Experimento 2 - efeitos da salinidade sobre o tecido das ostras.

1.4.1 Obtenção dos animais

As ostras destinadas aos experimentos foram obtidas de cinco fazendas marinhas localizadas na baía de Guaratuba (Lat. 25°83'S, Long. 48°57'W), litoral do estado do Paraná, Brasil.

No momento da retirada dos animais das estruturas de cultivo (lanternas japonesas), foram aferidas a temperatura da água (termômetro analógico Incoterm, Brasil) e a salinidade (refratômetro óptico Instrutemp, Brasil). Os valores registrados para esses parâmetros foram posteriormente utilizados como referência para a aclimação dos animais em laboratório.

Após a coleta, as ostras foram lavadas com uma lavadora de alta pressão para remoção de sedimento e de epibiontes. Em seguida, os animais foram acondicionados em caixas térmicas e transportados até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil (Lat. 25°24'47.70"S, Long. 49°14'52.82"O).

1.4.2 Procedimentos comuns aos experimentos 1 e 2

As ostras foram aclimatadas em tanques com capacidade para até 500 L, preenchidos com água do mar na mesma salinidade (27 UPS) observada no momento da coleta dos animais das estruturas de cultivo. Nestes tanques as ostras foram mantidas durante cinco dias, a título de aclimação às condições laboratoriais. Após esse período, a cada dois dias a salinidade da água era reduzida, adicionando-se água

doce, ou elevada, adicionando-se sal marinho (Romani S/A, Brasil), em 5 UPS. A aclimação foi realizada sob aeração constante e temperatura de $25\pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Os animais não foram alimentados durante o experimento. Diariamente era realizada a mensuração das variáveis físicas e químicas da água e, em seguida, renovada 100% da água nas unidades experimentais. A água utilizada no experimento era previamente clorada com hipoclorito de sódio 12%, neutralizada com tiosulfato de sódio e filtrada em uma rede com abertura de malha de 20 μm . As seguintes variáveis abióticas foram monitoradas diariamente ao longo do experimento: oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (oxímetro digital YSI® Pro 20, USA); salinidade (UPS) (refratômetro Instrutemp®, Brasil); pH (pHmetro Sensoglass® SP1400, Brasil); concentração de amônia total (mg/L de $\text{N}-(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$) e nitrito (mg/L de $\text{N}-\text{NO}_2^-$), obtidas pelo método colorimétrico (Apha, 2005), mediante leitura das amostras por espectrometria em fluorímetro (Molecular Devices® – ExpectraMax M2, USA).

1.4.3 Experimento 1

Foram utilizados nos experimentos animais com médias de peso vivo de $52,5\pm 13,8$ g, altura (eixo dorsoventral) de $6,8\pm 0,8$ cm, comprimento (eixo anteroposterior) de $4,8\pm 0,7$ cm e largura (eixo transversal) de $2,2\pm 0,4$ cm, sendo que as medidas foram baseadas em Galtsoff (1964).

Os experimentos foram realizados em 42 unidades experimentais compostas por bacias plásticas com capacidade para 5 L de água, que eram mantidas em sistemas de banho-maria montados em tanques com capacidade para 1.000 L de água. Esses sistemas permitiam, com o auxílio dos aquecedores e termostatos, a manutenção da temperatura da água durante todo o experimento ($25\pm 1,0^{\circ}\text{C}$).

Foram testados 14 tratamentos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 35, 40, 45, 50, 55 e 65 UPS), todos em triplicata. Em cada unidade experimental foram colocadas quatro ostras, totalizando 12 ostras por tratamento e 168 animais testados neste experimento.

As ostras eram observadas três vezes ao dia (8h, 13h e 19h) para registro de mortalidade. Eram consideradas mortas as ostras que apresentassem valvas abertas e que não demonstravam nenhuma reação a uma leve batida em sua concha utilizando

um objeto sólido, como por exemplo, a concha de outra ostra. Constatada a morte do animal, registrava-se a data e retirava-se imediatamente o exemplar morto.

A duração máxima do experimento foi de 365 dias. Após esse período, as ostras que ainda encontravam-se vivas eram descartadas.

A análise dos dados foi realizada com o software Statistica 10.0 (StatSoft®). Os dados foram agrupados e a normalidade de sua distribuição testada pelo método de Shapiro & Wilk. Confirmada a distribuição não-paramétrica dos dados ($p > 0,05$), realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliar a influência das diferentes salinidades sobre a sobrevivência das ostras.

A curva de sobrevivência das ostras expostas as diferentes salinidades, foi realizada a partir da média de dias de sobrevivência dos animais. Já, a definição das faixas de tolerância das ostras às salinidades foi baseada na Lei da Tolerância Ecológica (Shelford, 1913), que descreve que os organismos têm um mínimo e um máximo ecológico e a amplitude entre esses intervalos representa os limites de tolerância daquele organismo. Entre esses limites se encontra o ótimo ecológico, ponto no qual o desenvolvimento e a sobrevivência atingem intensidade máxima. Dessa maneira, foram determinadas três classes de tolerância, de acordo com as diferenças significativas do tempo de sobrevivência das ostras: ótima (≥ 50 dias), tolerável (≥ 25 ou ≤ 50 dias) e intolerável (≤ 25 dias).

1.4.4 Experimento 2

Foram utilizadas 15 unidades experimentais, contendo 18 ostras cada (total de 270 animais), com peso médio de $62,7 \pm 10,8$ g, altura média de $7,1 \pm 0,7$ cm, comprimento médio de $4,9 \pm 0,7$ cm e largura média de $2,2 \pm 0,7$ cm (média $\pm$ desvio padrão).

Foram testados cinco tratamentos (0, 10, 25, 40 e 50 UPS), todos realizados em triplicata. Nos tempos 0, 5, 15 e 30 dias de exposição, seis ostras de cada unidade experimental foram coletadas e submetidas ao processamento histológico de rotina. Seis ostras recém-retiradas das estruturas de cultivo foram utilizadas como referência (Controle) para avaliação das alterações observadas posteriormente nos tratamentos experimentais.

Diariamente, as unidades experimentais eram inspecionadas para avaliar a presença de ostras mortas. Como as alterações *post-mortem* comprometem a qualidade das amostras, inviabilizando as análises teciduais por alterarem a morfologia celular, causarem desorganização tecidual ou até mesmo mascararem lesões, comprometendo a acurácia do método, todos os animais mortos durante o experimento foram descartados.

As ostras coletadas foram inicialmente submetidas à biometria para determinação da altura (cm), largura (cm), comprimento (cm) e peso total (g). Após medidas e pesadas, as conchas foram abertas e os tecidos foram coletados e fixados por 48 horas em ALFAC – Solução de Davidson (33% etanol 95°, 22% formol, 11,5% ácido acético e 33,5% água destilada). Fragmentos com aproximadamente 1 cm³ de gônada, brânquias, manto e trato digestório (palpos labiais, glândula digestiva e estômago) foram coletados e processados. Os tecidos foram submetidos a uma série crescente de álcoois, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a 56°C. Posteriormente, foram seccionados em micrótomo rotativo, com cortes de 5 µm de espessura. As lâminas permanentes foram coradas em hematoxilina de Harris e eosina (HE), segundo (Behmer *et al.*, 1976).

A área total de cinco campos da lâmina para cada órgão e cinco filamentos das brânquias, de cada animal, definidos aleatoriamente, foram analisados em microscópio óptico (Olympus® CX40, USA), sob aumento total de 400x. As alterações foram fotomicrografadas com o auxílio de câmera digital (ToupCam LCMOS14000KPA, ToupTek®, China) e do software de captura de imagens (ToupView 3.7, ToupTek®, China).

Após a confirmação da distribuição não-paramétrica dos dados ($p > 0,05$), através do software Statistica 10.0, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliar se houve diferença entre as alterações teciduais e a presença de patógenos nos diferentes tratamentos.

Para avaliar o efeito da salinidade sobre a histopatologia branquial, todas as lamelas de cada filamento foram analisadas e as alterações registradas para avaliação quantitativa. Para tanto, utilizou-se, com adaptações para ostras, o cálculo de Gill Index (I_{org}), descrito por Bernet *et al.* (1999).

$$Gill\ Index\ (Iorg) = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{rp} \times w_{rp})$$

Onde:

a = extensão da lesão

alt = alteração

rp = reação padrão para cada alteração observada

w = fator de importância

Para a aplicação desse índice, as alterações teciduais observadas foram classificadas de acordo com o tipo de reação padrão de 1 a 5, sendo: (1) distúrbios circulatórios; (2) alterações regressivas (atrofia e necrose); (3) alterações progressivas (hiperplasia e hipertrofia); (4) inflamação (*brown cells*) e (5) tumores (benignos e malignos).

Para cada reação padrão foi incluído um valor de importância (w) variando de 1 a 3, sendo (1) importância patológica mínima para lesões reversíveis, quando o agente é retirado; (2) importância patológica moderada, quando a lesão é reversível na maioria dos casos, à medida que a exposição é finalizada e (3) importância patológica elevada para lesões geralmente irreversíveis, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

Utilizou-se também uma pontuação (a) que variou de 0 a 6, de acordo com o grau de extensão do dano, em que: 0 = inalterado, 2 = alteração leve, 4 = alteração moderada e 6 = lesão grave.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Experimento 1 – efeitos da salinidade sobre a sobrevivência de ostras

1.5.1.1 Variáveis abióticas

As variáveis abióticas mensuradas na água de exposição das ostras apresentaram uma grande oscilação durante o período experimental, com diferenças significativas ($p < 0,05$) para todas as variáveis entre os diferentes tratamentos.

Entretanto, estas variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para a sobrevivência de moluscos bivalves (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios (mín-máx) das variáveis abióticas mensuradas nos diferentes tratamentos (salinidades) ao longo do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Tratamento (UPS)	Amônia total (mg/L de N-AT)	Nitrito (mg/L de N-NO ₂ ⁻)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH
	Valor de referência			
	<7,2*	<345,1**	> 3***	6,7-8,7****
0	1,1 ^{cd} (0,01-5,5)	0,2 ^{bcd} (0,00-2,2)	6,9 ^{bc} (5,5-8,3)	7,4 ^{abc} (6,4-8,6)
1	1,2 ^{cd} (0,04-5,8)	7,3 ^{cd} (0,6-22,1)	7,2 ^{bcd} (6,3-8,3)	7,6 ^{abc} (6,9-8,1)
2	0,7 ^{bcd} (0,00-2,2)	9,9 ^{cd} (0,1-24,2)	7,2 ^{abcd} (6,2-8,3)	7,6 ^{abc} (7,0-8,0)
3	0,8 ^{bc} (0,01-6,7)	11,1 ^{cd} (0,06-20,6)	7,8 ^{cd} (6,3-8,9)	7,5 ^{abc} (6,7-8,4)
4	0,5 ^{bc} (0,01-6,0)	6,6 ^{cd} (0,01-20,5)	7,7 ^{cd} (6,2-8,9)	7,3 ^{ab} (6,3-8,2)
5	0,6 ^{bc} (0,01-5,6)	1,4 ^{cd} (0,01-10,2)	7,3 ^{bc} (5,0-9,9)	6,9 ^{cd} (6,0-9,9)
10	0,7 ^{bc} (0,01-6,4)	1,6 ^{cd} (0,01-13,3)	7,2 ^{bc} (5,1-8,9)	7,1 ^{cd} (5,5-8,8)
25	0,3 ^{abc} (0,03-2,9)	0,2 ^{cd} (0,00-9,6)	7,3 ^{bc} (5,1-8,3)	7,3 ^{bc} (6,5-8,2)
35	0,2 ^{abc} (0,02-1,7)	0,2 ^{abc} (0,00-0,8)	7,3 ^{bc} (5,5-8,3)	7,5 ^{bc} (6,4-8,7)
40	0,2 ^{abc} (0,03-3,2)	0,2 ^{abc} (0,00-0,9)	7,2 ^{abc} (4,8-8,3)	7,7 ^{bc} (6,5-8,7)
45	0,4 ^{bcd} (0,04-3,1)	0,3 ^{bc} (0,01-1,0)	7,1 ^{abc} (5,2-8,9)	7,9 ^{bcd} (6,6-8,8)
50	0,2 ^{cd} (0,02-1,4)	0,2 ^{bc} (0,01-0,8)	7,1 ^{abc} (5,3-8,2)	7,8 ^{bcd} (6,7-8,9)
55	0,5 ^{bcd} (0,03-3,4)	0,2 ^{bc} (0,01-1,0)	7,1 ^{abc} (5,5-7,9)	7,3 ^{cd} (6,4-8,6)
65	0,6 ^{bcd} (0,02-3,8)	2,2 ^{bcd} (0,01-4,6)	7,2 ^{abc} (6,2-8,6)	7,3 ^{cd} (6,7-8,0)

* Guzinski (1996) para *C. rhizophorae*

** Widman *et al.* (2008) para *Argopecten irradians*

*** Mello (2007) para *Crassostrea* sp.

**** Morales (1986) para *Crassostrea gigas*

1.5.1.2 Sobrevivência

Durante o período experimental, 23,2% dos indivíduos expostos à salinidade de 5 UPS e 25% dos indivíduos expostos à salinidade de 10 UPS permaneceram vivos, apesar de não terem recebido qualquer alimento durante o experimento.

Com base nas diferenças significativas entre os tempos médios de sobrevivência em cada tratamento, foram definidas as três faixas de tolerância das ostras expostas às diferentes salinidades. A faixa de salinidade ótima variou de 4 a 40 UPS, a tolerável foi 2,1 a 3,9 e 41 a 49 UPS e a intolerável 0 a 2 UPS e ≥ 50 UPS (Figura 1).

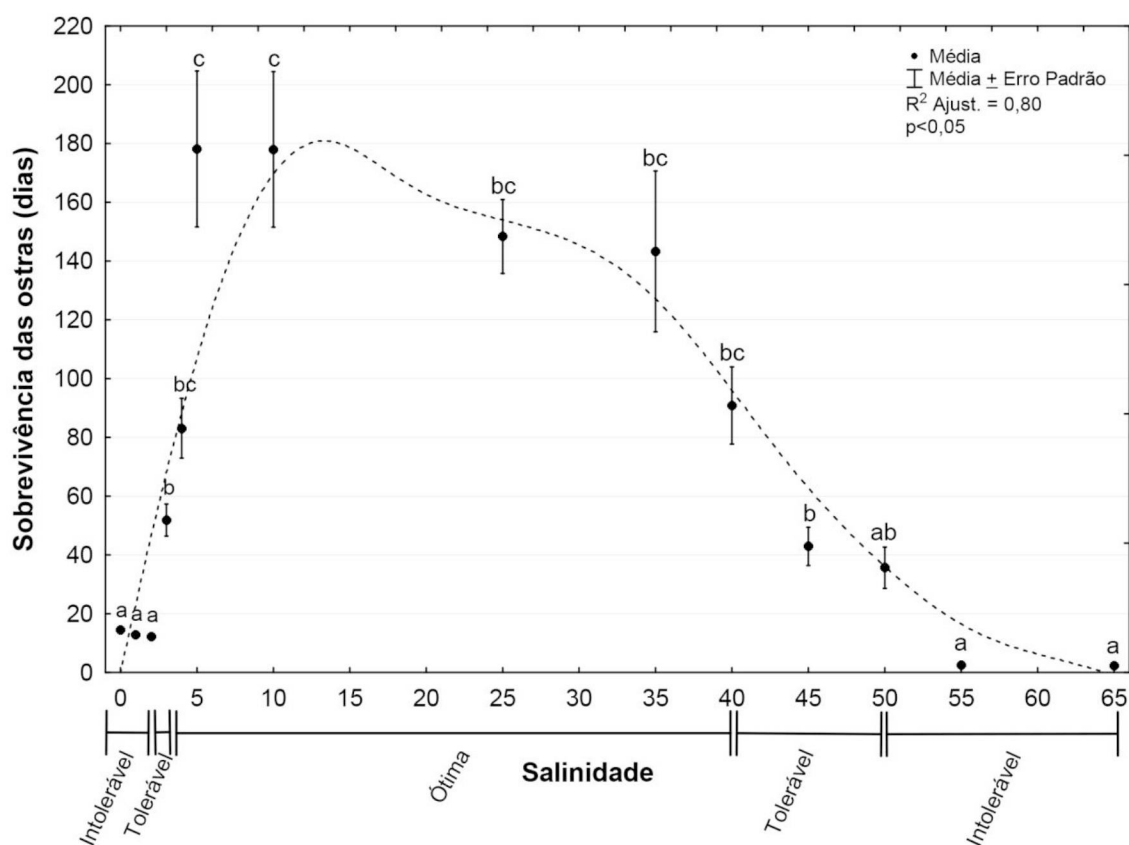


Figura 1: Curva de sobrevivência e faixas de tolerância das ostras expostas as diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos experimentais (salinidades), utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

1.5.2 Experimento 2 – efeito da salinidade sobre o tecido de ostras

Em todos os tratamentos foi registrada morte de animais durante o experimento, impossibilitando que a totalidade dos animais testados tivessem seus tecidos analisados através da histologia (Tabela 2).

Tabela 2: Número total de ostras analisadas e mortas durante o período experimental nos diferentes tratamentos (salinidades).

Salinidade (UPS)	Período											
	Dia 0 Controle			1 a 5 dias			6 a 15 dias			16 a 30 dias		
	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A
0	6	0	6	15	39	15	0	0	0	0	0	0
10	6	0	6	54	0	18	36	0	18	14	4	14
25	6	0	6	54	0	18	36	0	18	6	12	6
40	6	0	6	54	0	18	36	0	18	10	8	10
50	6	0	6	54	0	18	8	28	8	0	0	0

V = viva; M = morta; A = analisada

Foram observadas duas alterações teciduais nos animais analisados: hiperplasia no tecido branquial ($n = 113$ lamelas alteradas de um total de 10.819 lamelas analisadas, o equivalente a 1%) e hipertrofia das células do tecido branquial ($n = 36$ lamelas alteradas de um total de 10.819 lamelas analisadas, o equivalente a 0,3%). Foram, também, registrados três patógenos: *Rickettsia-like Organism* (RLO) ($n = 4.011$ inclusões bacterianas), *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinidae) ($n = 819$ indivíduos) e *Urastoma* sp. (Platyhelminthes: Turbellaria: Urostomidae) ($n = 45$ indivíduos) (Figura 2).

Observou-se também que o número de alterações teciduais não variou ($p > 0,05$) entre as salinidades testadas, tampouco entre os órgãos analisados e os períodos de exposição. Entretanto, ao se avaliar separadamente as alterações, constatou-se ter havido diferença significativa ($p < 0,05$) para o número total de *Nematopsis* sp., quantificadas nos diferentes tratamentos (salinidades). Houve também diferença ($p < 0,05$) no número total de RLO entre as salinidades de 25 UPS e de 50 UPS.

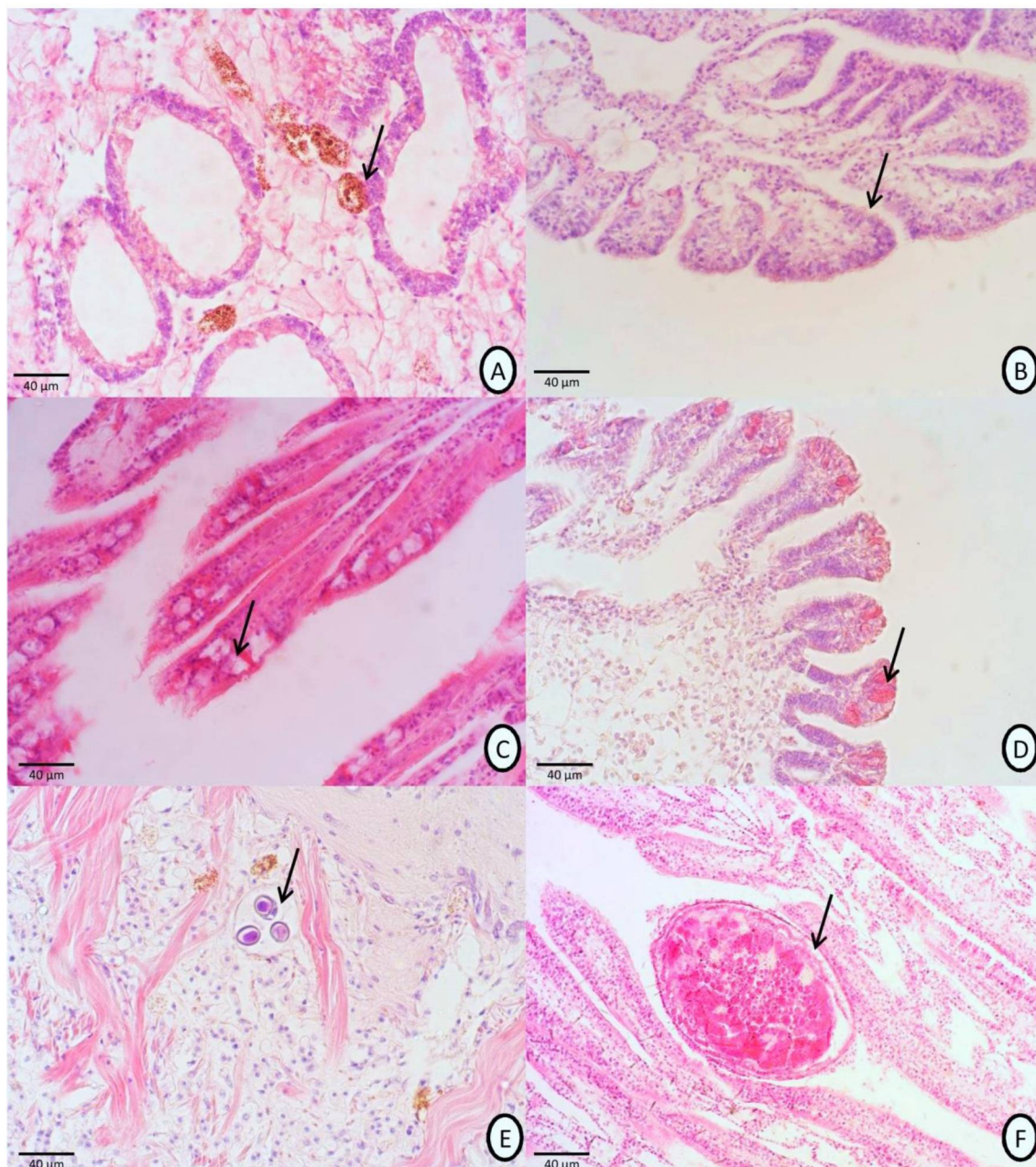


Figura 2: Alterações teciduais e patógenos encontrados nas ostras expostas às diferentes salinidades. A: *Brown cells*; B: Hiperplasia no tecido branquial; C: Hipertrofia de células do tecido branquial; D: *Rickettsia-like organism*; E: *Nematopsis* sp.; F: *Urastoma* sp..

Em relação ao I_{org} aplicado às alterações branquiais, observou-se que as ostras do grupo controle e da salinidade 0 apresentaram o maior valor do índice ($I_{org} = 14$), decorrente do elevado número de *brown cells* (alto fator de importância quando comparada com as demais alterações, por ser considerada como um processo inflamatório do tecido), além de baixo número de alterações com menor fator de importância (hiperplasia, aumento do número de células, e hipertrofia, aumento do volume celular). Foi também constatada uma grande variação do I_{org} nos diferentes

tratamentos, havendo uma tendência de redução do grau de dano das brânquias com o aumento da salinidade (Tabela 3).

Tabela 3: Valores médios (mín-máx) para o índice do órgão (I_{org}), segundo Bernet *et al.* (1999), obtido para as alterações registradas em 5 filamentos branquiais por ostra exposta às diferentes salinidades. w = fator de importância

Tratamento	Nº de ostras analisadas	Brown cells ($w = 4$)	Hiperplasia ($w = 2$)	Hipertorfia ($w = 1$)	I_{org}
Controle	6	70	0	4	14 (8-26)
0 UPS	15	76	2	2	9 (8-24)
10 UPS	50	209	32	19	8 (8-16)
25 UPS	42	146	34	10	8 (2-24)
40 UPS	46	188	24	1	7 (4-16)
50 UPS	26	103	21	0	7 (4-12)

1.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, *Crassostrea gasar* se mostrou intolerante a baixas salinidades apenas na faixa entre 0 e 2 UPS. Esse resultado é compatível com o estudo realizado por Dpiwe (2004), com *C. gigas*, que registrou mortalidade de 90% das ostras cultivadas nas baías de George e Moulting, Austrália, após um período de chuvas no verão, quando houve a redução da salinidade para 2 UPS por 10 dias consecutivos.

Em relação às faixas consideradas toleráveis (2,1 a 3,9 e 41 a 49 UPS) e ótimas (de 4 a 40 UPS), foram observadas algumas diferenças em relação aos resultados encontrados por Funo *et al.* (2015). Estes autores registraram que a faixa de tolerância de *C. gasar* à salinidade estendeu-se de 10 a 50 UPS, porém, com maior tempo de sobrevivência em 25 UPS. Já, Wakamatsu (1973) e Pereira *et al.* (2001), concluíram que *C. gasar* tolera condições de salinidade entre 8 e 34 UPS, porém, com maior taxa de sobrevivência entre 15 e 25 UPS.

A rápida mortalidade das ostras expostas às menores (0, 1 e 2 UPS) e às maiores (50, 55 e 65 UPS) salinidades, possivelmente ocorreu em decorrência de um processo de acidose metabólica. Isto porque, segundo Lombardi *et al.* (2013), as ostras ao serem expostas em faixas de salinidade intoleráveis fecham suas valvas por tempo indeterminado, ocasionando acúmulo de dióxido de carbono nos tecidos, o que promove acidose respiratória e evolui para a morte do animal.

Já a sobrevivência de *C. gasar* nas salinidades ótimas e toleráveis, durante vários dias, mesmo sem alimentação, pode estar relacionada a um possível armazenamento de reservas energéticas que estes animais realizam. Segundo Li et al. (2007), as ostras armazenam glicogênio em seus tecidos e quando necessário o degradam e as unidades de glicose são utilizadas como principal fonte de energia, sendo esta responsável pela oxidação de glicose para o fornecimento de energia ao animal.

Através das análises histopatológicas realizadas foram encontradas duas alterações teciduais (presença de hiperplasia do tecido branquial e hipertrofia das células do tecido branquial), além da ocorrência de *brown cells* e de três patógenos (RLO, *Nematopsis* sp. e *Urastoma* sp.). Esses resultados diferem bastante dos encontrados por Knowles et al. (2014), que identificaram várias outras alterações teciduais decorrentes da diminuição da salinidade da água (para 3 UPS) em cultivos da ostra *C. gigas*, no noroeste da Tasmânia. Dentre as alterações identificadas naquele estudo destacam-se: vacuolização intracitoplasmática e infiltração de hemócitos no trato digestório, erosão do manto, expansão de espaços intracelulares renais, assim como, necrose gonádica e das células de Leydig. Winstead (1995), por sua vez, constatou que a ostra *C. virginica* apresentou atrofia da glândula digestiva devido ao fechamento das valvas após a exposição a baixas salinidades na baía de Apalachicola, Flórida.

Dentre as anomalias aqui observadas, somente o parasito *Nematopsis* sp. e a bactéria RLO apresentaram algum tipo de relação com a salinidade. A prevalência de *Nematopsis* sp. foi baixa, não havendo, neste caso, lesões que pudessem ser relacionadas à presença deste organismo na ostra. Este protozoário é geralmente encontrado nas brânquias, manto, glândula digestiva e palpos labiais de ostras e apresenta baixa patogenicidade, por não provocar danos significativos aos tecidos (Winstead et al., 2004; Cremonte et al., 2005), desde que em baixa quantidade. Sabry et al. (2007) evidenciaram que a elevada prevalência de *Nematopsis* sp. em *C. rhizophorae* (60 a 100% de todos os órgãos) esteve relacionada à ocorrência de infiltração hemocítica. Além de também ser responsável pela destruição de tecido conjuntivo (Boehs et al., 2010). Entretanto, os efeitos da salinidade sobre esse parasito ainda não são conhecidos.

Houve predominância de infecção por RLO em todos os tratamentos, com exceção da salinidade 50, na qual houve tendência de diminuição desta bactéria nos tecidos entre os períodos analisados. Estudos realizados com outras espécies de moluscos relataram que após eventos de aumento da salinidade da água, ocorreram aumentos da colonização por RLO. Esse fenômeno foi descrito em *C. gigas* exposta à 29 UPS, em um cultivo realizado no Alasca (Meyers *et al.* (1990) e no berbigão *Tegillarca granosa*, expostos a 30 UPS, na baía de Yueqing, China (Zewen *et al.* (2012).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que a salinidade teve influência direta sobre a sobrevivência das ostras *C. gasar* mantidas sob condições laboratoriais, mas não evidenciaram nenhum efeito da exposição aguda a diferentes salinidades sobre o tecido dessa espécie.

1.7 REFERÊNCIAS

AFINOWI, M. A. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 1984.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water** 2005. 541.

AREIAS, D. L. L. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova de ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)**. 2012. Departamento de Biologia, Universidade do Porto

BALDAN, A. P.; BENDHACK, F. Maricultura sustentável no litoral do Paraná- Brasil: Atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambiental**, v. 7, n. 4, p. 491-497, 2009.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1976.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BOEHS, G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2010.

CORMIER MÉTHÉ, D. **Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Productivity and physiology under varying temperature and salinity conditions.** . 2015. 148 Thesis University of Prince Edward Island

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic Coast. . **Diseases Aquatic Organisms**, v. 64, n. 1, p. 85-90, 2005.

DOWNS, C. A. et al. Cellular pathology and histopathology of hypo-salinity exposure on the coral *Stylophora pistillata*. **Science of the total environmental**, v. 407, n. 17, p. 4838-4851, 2009.

DPIWE. Oyster Mortalities in the Georges Bay Marine Farming Development Plan Area, February 2004. **Dpiwe Tasmânia**, p. 74, 2004.

FUNO, I. C. S. A. et al. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 41, n. 4, p. 837-847, 2015.

GALTSOFF, P. S. **The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin.** US Government Printing Office, 1964.

GUZENSKI, J. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias húmicas no crescimento de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828).** 1996. 101 Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

KNOWLES, G. et al. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 121, p. 78-84, 2014.

LA PEYRE, M. K. N., A. D.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, G. S.; LA PEYRE, J. F. . Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. **Marine Ecology Progress Series** v. 248, p. 165-176, 2003.

LAPÈGUE, S. et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v. 202, n. 3, p. 232-242, 2002.

LEVINTON, J. et al. Climate change, precipitation and impacts on an estuarine refuge from disease. **PLoS ONE** v. 6, n. 4, 2011.

LOMBARDI, S. A.; HARLAN, N. P.; PAYNTER, K. T. Survival, acid-base balance, and gaping responses of the Asian oyster *Crassostrea ariakensis* and the eastern oyster *Crassostrea virginica* during clamped emersion and hypoxic immersion. **Journal of Shellfish Research**, v. 32, n. 2, p. 409-415, 2013.

LOOSANOFF, V. L. Behavior of oysters in water of low salinities. Proceedings of the National Shellfisheries Association, 1953. p.135-151.

MELLO, G. L. Policultivo de ostras e camarões marinhos em viveiros de aquicultura. **FAEPE**, p. 23, 2007.

MEYERS, T. R.; SHORT, S.; EATON, W. Summer Mortalities and Incidental Parasitisms of Cultured Pacific Oysters in Alaska. **Journal Of Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 3, p. 172-176, 1990.

MORALES, J. **Acuicultura marina animal**. 1986.

PARADA, J. M.; MOLARES, J.; OTERO, X. Multispecies mortality patterns of commercial bivalves in relation to estuarine salinity fluctuation. **Estuaries and Coasts**, v. 35, p. 132-142, 2012.

PEREIRA, C. S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública – Contexto político-social e microbiológico**. 2003. Departamento de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

PEREIRA, O. M. et al. Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliana* em rios e gamboas da região estuarino-lagunar de Cananéia (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 85-95, 2001.

PIERCE, S. K. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. **The Biological Bulletin**, v. 163, n. 3, p. 405-419, 1982. ISSN 0006-3185.

SABRY, R. C.; GESTEIRA, T. C. V.; BOEHS, G. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 755-758, 2007.

SHUMWAY, S. E. **Natural environmental factors**. Amsterdam: Elsevier Science 1996. 467-513.

SIDDALL, S. E. Dispersal and recruitment of tropical mussel larvae as affected by temperature and salinity. **Journal Shellfish Research**, v. 2, n. 1, p. 106-107, 1982.

TOLLEY, S. G. et al. Impacts of salinity and freshwater inflow on oyster-reef communities in Southwest Florida. **Aquatic Living Resources**, v. 19, n. 4, p. 371-387, 2006. ISSN 0990-7440.

VILANOVA, M. F. V.; CHAVES, E. M. B. Contribuição para o conhecimento da viabilidade do cultivo de ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca:Bivalvia), no estuário do rio Ceará, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciência Marinha**, v. 27, p. 111-125, 1988.

WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e seu cultivo.** 1973.

WELLS, H. W. The fauna of oyster beds, with special reference to the salinity factor. **Ecological Monographs**, v. 31, n. 3, p. 239-266, 1961. ISSN 1557-7015.

WIDMAN, J. C. et al. Toxicity of Un-ionized Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Juvenile Bay Scallops, *Argopecten irradians irradians*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 54, p. 460-465, 2008.

WINSTEAD, J. T. Digestive tubule atrophy in Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) exposed to salinity and starvation stress. **Journal Shellfish Research**, v. 14, p. 105-111, 1995.

WINSTEAD, J. T.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, S. G. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. **Journal Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 831-840, 2004.

ZEWEN, Z. et al. Rickettsia-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*, in the Yueqing Bay in China. **Acta Oceanologica**, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2012.

2 CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA REDUÇÃO DE EPIBIONTES NA OSTRÁ *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), DURANTE CULTIVO

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS TO REDUCE BIOFOULING IN FARMING OYSTER

Crassostrea gasar (Adanson, 1757)

2.1 RESUMO

Organismos epibiontes podem afetar negativamente os índices zootécnicos e econômicos alcançados em empreendimentos de ostreicultura. Tais organismos podem competir com as ostras por alimento, espaço e oxigênio, além de provocar doenças ou mesmo a morte das ostras. Este estudo teve por objetivo avaliar a eficácia de seis métodos usualmente utilizados na ostreicultura para a redução de organismos epibiontes em conchas. O estudo foi realizado em uma fazenda de cultivo de ostras localizada na baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. Ostras mantidas durante três meses consecutivos em sistema de cultivo suspenso (*long lines* + lanternas japonesas), sem qualquer tipo de manejo de limpeza, foram separadas em grupos de 10 indivíduos e submetidas a um dos seguintes tratamentos de limpeza: exposição à água doce; à água hipersalina; à água com hipoclorito de sódio; à água contendo solução de amônia quaternária; exposição ao ar e limpeza através do método de hidrojateamento. Após o tratamento, as ostras foram recolocadas em três estruturas de cultivo (triplicata), onde permaneceram por 30 dias, sendo o número de epibiontes analisado no 15º e no último dia do experimento. Ao todo, foram identificados 56.407 organismos epibiontes, pertencentes a nove filos, sendo os mais abundantes numericamente Arthropoda (Subfilo Crustacea) (n=35.271; 62,5%), seguido por Mollusca (19.100; 33,8%) e Annelida (1.762; 3,1%). Os tratamentos com água doce e hidrojateamento foram os mais eficazes na redução de epibiontes das conchas e resultaram nas menores taxas de mortalidade das ostras durante o experimento.

Palavras-chave: bivalves; cultivo; ostreicultura; maricultura.

2.2 ABSTRACT

Biofouling organisms may reduce production parameters and economic indexes in oyster farming systems. These organisms compete with oysters for food, space and oxygen, and also cause disease or death to the oysters. In this study, we evaluate the efficacy of six methods frequently used in oyster farming to reduce biofouling organisms. The study was carried out in an oyster farm located in the bay of Guaratuba, Paraná, Brazil. Oysters maintained for three consecutive months in a suspended culture system (Japanese long lines), without any previously cleaning procedure, were separated in groups of 10 animals and exposure to one of the following cleaning procedures: fresh water; hypersaline water (21 g of NaCl/L); sodium hypochlorite solution (100 mg/L); quaternary ammonia solution (500 mg/L); air exposure; and cleaning by hydro blasting method. After treatment, the oysters were replaced in three culture structures (triplicate), and kept for 30 days. The number of biofouling organisms were analyzed in the 15th and the 30th day of experiment. We identify 56.407 organisms from nine phyla. The most abundant was Arthropoda (Subphylum Crustacea) (n=35.271; 62.5 %), followed by Mollusca (n=19.100; 33.8 %) and Annelida (n=1.762; 3.1 %). The freshwater exposure and hydro blasting procedure were the most effective treatments to reducing biofouling organisms. Both treatment also exhibit the lower mortality rate during the experiment.

Keywords: bivalve; cultivation; oyster farming; mariculture.

2.3 INTRODUÇÃO

Ostras são usualmente cultivadas em ambientes estuarinos, regiões com alta concentração de nutrientes e grande quantidade de material particulado em suspensão, decorrentes da produção primária, da lixiviação continental ou de fontes antrópicas (Walsh, 1991).

Em um sistema de cultivo, as estruturas utilizadas (telas, cordas e flutuadores, lanternas japonesas), além da grande quantidade de ostras confinadas em um espaço relativamente pequeno, criam condições ideais para que outros organismos se estabeleçam sobre as estruturas e sobre os animais (Adams et al., 2011). Esses organismos são conhecidos como epibiontes ou *biofouling* (Marshall e Dunham, 2013).

Arakawa (1990) considera os epibiontes competidores das ostras cultivadas, podendo causar-lhes danos por concorrerem por alimento, espaço, oxigênio e, até mesmo, provocarem doenças (Mohammad, 1976; Taylor, 1997; Guenther, 2006). Além disso, o excesso de epibiontes, geralmente provocado pelo manejo inadequado dos sistemas de cultivo pode afetar negativamente as taxas de crescimento, o rendimento em carne e as taxas de sobrevivência (Pauley, 1988), podendo ainda comprometer a aparência visual do produto comercializado com concha (Doroudi, 1996). Ao se fixarem sobre as estruturas de cultivo, os epibiontes podem ainda aumentar o peso dessas estruturas, comprometer a sua resistência e durabilidade, danificar o material, dificultar o manejo e a despesca (Fitridge et al., 2012). Todas essas consequências podem implicar, por sua vez, no comprometimento da viabilidade econômica do empreendimento (Pit e Southgate, 2003).

Para reduzir a quantidade de epibiontes presentes sobre as estruturas e principalmente sobre as próprias ostras, elas devem ser submetidas à limpeza periódica.

Os métodos e técnicas de limpeza de ostras durante os cultivos, por sua vez, precisam ser o mais simples, rápido, eficiente, seguro (tanto para o operador, quanto para as ostras ou para o ambiente) e não-residuais possível.

Atualmente, três métodos principais de manejo são aplicados na tentativa de redução da quantidade de organismos epibiontes em ostras: controle mecânico/físico (método de retirada manual, hidrojateamento, exposição ao ar, exposição a temperaturas elevadas) (Cheney, 2010), controle químico (com a exposição a água doce, hipersalina, hipoclorito de sódio, amônia quaternária, ácido acético, cal hidratada e hidróxido de sódio) (Piola et al., 2010; Rolheiser et al., 2012) e controle biológico (inserção de predadores de epibiontes dentro das estruturas de cultivo) (Mcennulty et al., 2001). O objetivo deste estudo foi testar a eficácia de métodos de limpeza de conchas, como forma de redução de organismos epibiontes em ostras cultivadas.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Obtenção dos animais

O estudo foi realizado em uma fazenda marinha de cultivo de ostras (*Crassostrea gasar*) localizada no rio dos Pinheiros (25°50'02.34"S 48°34'45.40"O), na baía de Guaratuba, litoral do estado do Paraná, Brasil.

Nesta fazenda, as ostras são cultivadas, desde o início da fase juvenil até atingirem o tamanho comercial, em lanternas japonesas (altura total = 60 cm; diâmetro = 40 cm; número de andares = 4; altura de cada andar = 13 cm; abertura de malha = 3 cm), mantidas suspensas através de *long-lines* flutuantes. Esse sistema consiste de um cabo-guia suspenso por flutuadores, que serve de suporte para as lanternas, que são fixadas neste cabo a um metro de distância entre si. Em cada andar, na fase final de cultivo, são usualmente estocadas cinco dúzias de ostras (de tamanho variável) e os animais são comercializados quando atingem aproximadamente 8 cm de altura.

O experimento foi realizado durante o outono, com ostras mantidas em lanternas que estavam sem qualquer tipo de manejo havia três meses. Deste grupo, 60 animais foram previamente separados, ao acaso, para avaliação quali-quantitativa dos epibiontes presentes originalmente em suas conchas (Tempo 0) e outro grupo, composto por 120 ostras, foi utilizado como controle.

2.4.2 Tratamentos para ostras colonizadas por epibiontes

Após a seleção, as ostras foram submetidas a sete tratamentos, sendo um deles o controle, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Tratamentos empregados para redução da colonização de ostras por epibiontes.

Nº do tratamento	Tratamento	Número de ostras testadas	Fórmula Química	Concentração utilizada do produto	Tempo de exposição (horas)
1	Água doce	120	NA	NA	24
2	Solução de hipoclorito de sódio	120	NaClO	100 mg/L	1
3	Água hipersalina (50 UPS)*	120	NaCl	21 g/L	24
4	Exposição ao ar	120	NA	NA	24
5	Solução à base de amônia quaternária 15%	120	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{N} + (\text{CH}_3)_2\text{Cl}$	500 mg/L	1
6	Hidrojateamento	120	NA	NA	NA
7	Controle	120	NA	NA	NA

(NA) Não se aplica

(*) Obtida a partir da dissolução de sal de cozinha iodado refinado

No tratamento à base de água doce, as ostras foram imersas na água oriunda de uma nascente existente no próprio local, por 24 horas, em tanques com capacidade para até 100 litros. O mesmo procedimento foi realizado no tratamento contendo hipoclorito de sódio 12%, diluído em água doce, em uma concentração de 100 mg/L. No tratamento com o sanitizante (Chemitec®) à base de amônia quaternária 15%, utilizou-se uma concentração de 500 mg/L. Porém, nesses dois últimos casos, as ostras foram expostas por apenas uma hora aos respectivos produtos. O tratamento em água hipersalina foi feito em um tanque contendo 70 L da própria água de cultivo

(salinidade 23 UPS), na qual foi dissolvido sal iodado até que a salinidade atingisse 50 UPS.

Durante a aplicação dos respectivos tratamentos, registrou-se em todos os tanques de exposição, a cada dez minutos, a temperatura da água (utilizando-se um *datalogger*, TagTemp Stick, Novus, Brasil) e a cada duas horas a concentração de oxigênio dissolvido (oxímetro digital YSI Pro 20, USA) e o pH (pHmetro Sensoglass SP1400, Brasil).

Para o tratamento de exposição das ostras ao ar, os animais foram mantidos em caixas plásticas tipo engradado e colocados em locais protegidos da incidência direta da luz solar. A temperatura do ar foi registrada a cada dez minutos (*datalogger*, TagTemp Stick, Novus, Brasil).

O hidrojateamento foi empregado com uma máquina lavadora de alta pressão de 10 mPa (Gong, Itália) até a retirada do máximo possível dos epibiontes da superfície externa das conchas.

Os animais do grupo controle não foram submetidos a qualquer tratamento de limpeza e tiveram seu tempo de manipulação e de exposição ao ar limitado ao mínimo necessário para a seleção e acondicionamento nas unidades experimentais.

2.4.3 Período pós-exposição aos tratamentos

Para facilitar a identificação das ostras e garantir que as condições experimentais pós-tratamento fossem iguais para todos os indivíduos, principalmente em relação à profundidade na coluna d'água, optou-se por separar as ostras em grupos de 10 animais de cada tratamento, testados em triplicata. Para isso, após a exposição aos respectivos tratamentos, os animais foram embalados em redes plásticas com abertura de malha de 0,5 cm, identificados com lacres numerados. Cada grupo foi colocado em um dos quatro andares da lanterna japonesa, totalizando 7 grupos/andar (n=70 animais), ou seja, 280 ostras/lanterna (n=840 animais) (Figura 3).

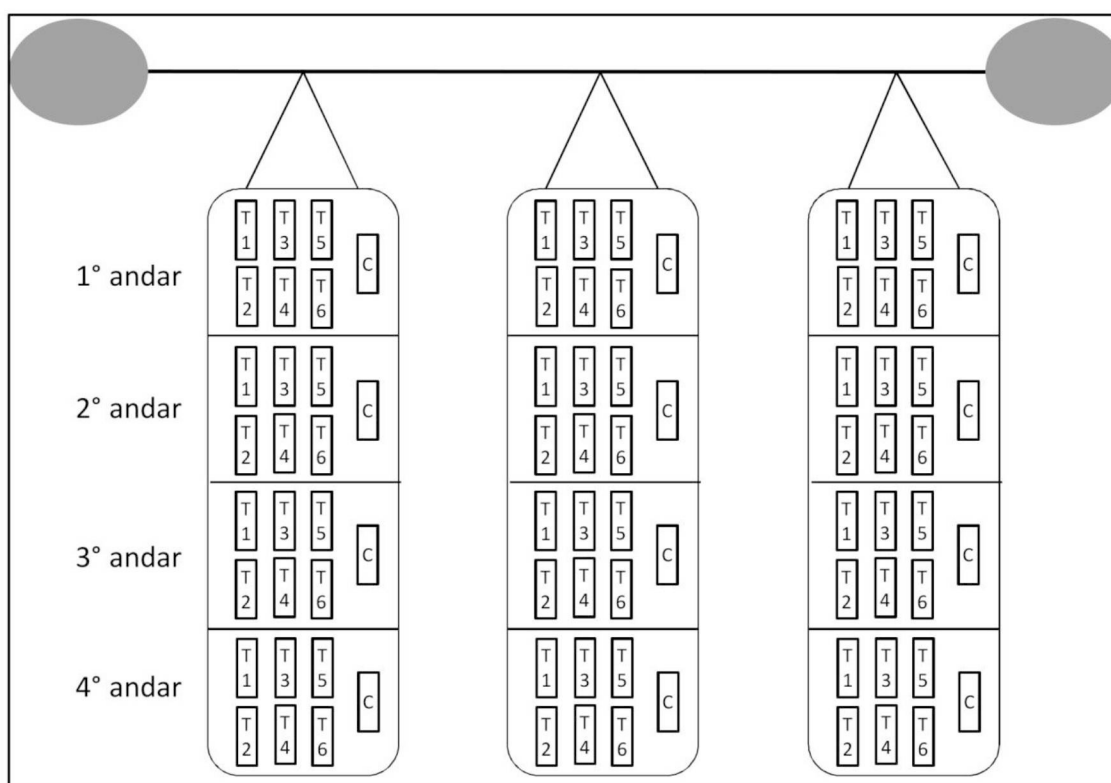


Figura 3: Disposição das lanternas no cultivo contendo as ostras de cada tratamento.

Diariamente, durante 30 dias, foi mensurada, uma vez ao dia, a salinidade e a temperatura da água. Além disso, foi realizada, para todo o período experimental, a estimativa da distância que as estruturas de cultivo foram mantidas em relação ao fundo da zona de canal onde foram instaladas. Nesse caso, como não existe uma tábua de maré específica para o local do experimento, foi utilizada como referência a tábua de maré disponibilizada no Banco Nacional de Dados Oceanográficos da Marinha do Brasil (Bndo, 2016) para a região da Barra de Paranaguá (Canal da Galheta), Paraná, Brasil. No início do experimento, foi mensurada a profundidade real do local no momento em que as lanternas foram instaladas. Posteriormente, a profundidade (X) foi calculada com base na profundidade medida inicialmente (P); na profundidade inicial apontada pela tábua de maré no início do experimento (m1) e em relação às variações diárias máximas e mínimas de maré (m2), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$X = \frac{P \cdot m1}{m2}$$

Onde:

X: profundidade diária (durante todo o período experimental)

P: profundidade inicial (medida no início do experimento)

m1: profundidade inicial (atribuída pela tábua de maré no início do experimento)

m2: profundidade diária (atribuída pela tábua de maré)

2.4.4 Avaliação de epibiontes

A coleta de ostras para a avaliação dos epibiontes no período de pós-tratamento foi feita em dois momentos, no 15º e no 30º dia. Nessas ocasiões, cinco ostras de cada tratamento e de cada réplica eram retiradas de cada um dos andares das lanternas, totalizando 60 ostras/tratamento, que foram analisadas.

Inicialmente, os epibiontes eram retirados da superfície da concha com auxílio de uma escova de cerdas macias e de água doce. Em seguida, o lavado era peneirado em malha de 90 μ m, fixado e preservado em formol 4%. Os epibiontes que se encontravam vivos e fixados sobre as conchas no momento da coleta, como, por exemplo, as cracas, foram quantificados imediatamente após o processo de limpeza. Todos os epibiontes de cada amostra foram separados de acordo com o grupo taxonômico ao qual pertencia, e quantificados, utilizando-se microscópio estereoscópico (Leica MZ6, Alemanha).

2.4.5 Índices biométricos

Após a retirada dos epibiontes das conchas, três ostras de cada tratamento eram acondicionadas em sacos plásticos, dentro de caixas térmicas refrigeradas que foram transferidas ao Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), localizado na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná.

Essas ostras foram então submetidas à biometria (com medição de altura (cm), comprimento (cm), largura (cm) e peso total (g)), à determinação do peso da carne úmida, e à determinação do peso seco, após a secagem dos tecidos moles em estufa à 60°C, por 48 horas.

O peso da concha foi calculado subtraindo-se o peso da carne úmida do peso total da ostra. Os dados obtidos foram utilizados para avaliação do índice de condição (IC) proposto por Rainer e Mann (1992):

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

2.4.6 Análise de dados

Os dados obtidos ao longo do experimento foram agrupados e a sua normalidade testada pelo método de Shapiro & Wilk. Após a confirmação da distribuição não-paramétrica de todos os dados ($p > 0,05$), optou-se pela logaritmização dos valores de abundância de epibiontes. Em seguida, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), com o objetivo de avaliar a influência de cada tratamento de limpeza sobre o número de epibiontes encontrados nas conchas 15 e 30 dias após o tratamento.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado também para avaliar a influência dos diferentes andares sobre o número de epibiontes; a eficácia dos tratamentos sobre cada filo; a influência dos tratamentos sobre as variáveis biométricas e sobre o índice de condição das ostras.

Para avaliar o grau de significância das diferenças observadas entre as taxas de mortalidade das ostras, nos diferentes tratamentos e nos diferentes períodos analisados (15 e 30 dias), foram realizados testes de proporção utilizando-se Qui-Quadrado.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 10.0 (StatSoft®).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Variáveis abióticas

Foram observadas variações entre as medições das variáveis abióticas durante a exposição das ostras aos tratamentos, apesar disto, todos os valores mensurados estiveram dentro das faixas ótimas ou dos limites toleráveis pelas ostras (Morales, 1986; Zhang *et al.*, 2006; Ansa e Bashir, 2007; Mello, 2007; Funo *et al.*, 2015), conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5: Mensuração das variáveis abióticas durante a exposição das ostras aos métodos de tratamento. T1: temperatura da água; T2: temperatura do ar; OD: oxigênio dissolvido; S: salinidade.

Tratamento	T1 (°C)	T2 (°C)	pH	OD (mg/L)	S (UPS)
Valor referência	23-31 ^a	5-25 ^b	6,7-8,7 ^c	> 3,0 ^d	10-50 ^e
Água doce	24,1 (23,6-25,2)	-	6,4 (6,4-6,6)	5,9 (4,7-6,2)	0
Água Hipersalina	26,3 (24,7-29,6)	-	6,9 (6,7-7,8)	6,5 (6,3-6,7)	50
Hipoclorito de sódio	26,3 (26,1-26,5)	-	6,8 (6,8-6,9)	6,2 (6,1-6,3)	0
Amônia quaternária	26,4 (26,3-26,6)	-	6,7 (6,7-6,8)	6,5 (6,4-6,5)	0
Hidrojateamento	-	-	-	-	0
Ar	-	24,6 (23,4-24,9)	-	-	-

^aAnsa e Bashir (2007); ^bZhang *et al.* (2006); ^cMorales (1986); ^dMello (2007); ^eFuno *et al.* (2015)

Durante o período experimental, a temperatura da água do local onde as estruturas de cultivo estavam instaladas apresentou média de 27,2°C no 1° andar e 26,8°C no 4° andar. A salinidade, entretanto, apresentou média de 23 UPS, variando entre 19 e 30 UPS (Figura 4).

As estruturas de cultivo permaneceram a uma profundidade média de 2,2 metros (1° andar) e 1,6 metros (4° andar) do fundo do canal, variando respectivamente entre 1,5 a 2,7 metros e 0,9 a 2,1 metros, durante os 30 dias de experimento.

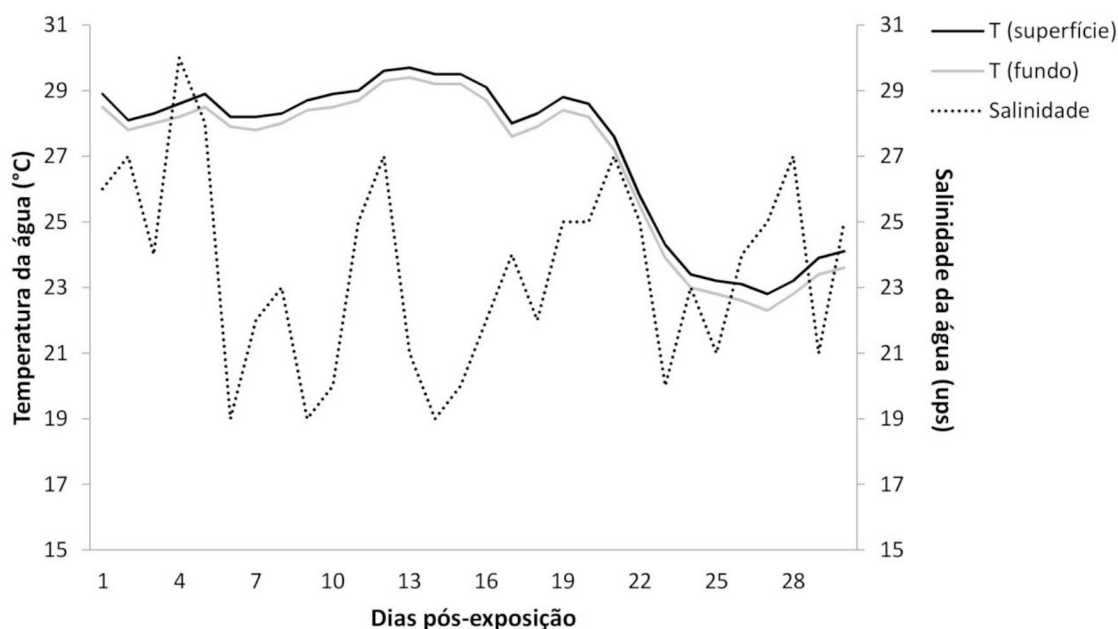


Figura 4: Média da variação das variáveis abióticas da água mensurada durante o período experimental (30 dias) no local de instalação das estruturas de cultivo. T (superfície): 1° andar da lanterna; T (fundo): 4° andar da lanterna.

2.5.2 Epibiontes

Ao longo de todo o experimento foram identificados no total 56.407 epibiontes, pertencentes a nove filos. Os filos mais abundantes numericamente foram Arthropoda (Subfilo Crustacea), com 35.271 animais (62,5%), seguido por Mollusca, com 19.100 organismos (33,8%) e Annelida, com 1.762 indivíduos (3,1%).

Houve maior prevalência de epibiontes no grupo controle ($n = 10.180$), seguido pelos tratamentos à base de amônia quaternária ($n = 9.107$), com hipoclorito de sódio ($n = 8.291$), de exposição ao ar ($n = 7.596$) e água hipersalina ($n = 7.367$). Já, os tratamentos com menor número de epibiontes foram hidrojateamento ($n = 4.239$) e tratamento com água doce ($n = 5.085$).

O número de epibiontes nas conchas das ostras nos dois períodos de análise (15 e 30 dias) foi menor que no Tempo 0, exceto para o grupo controle com 15 e 30 dias e para os tratamentos com amônia quaternária e com hipoclorito de sódio, ambos com 30 dias (Tabela 6).

Tabela 6: Abundância de epibiontes presentes nas conchas das ostras expostas aos diferentes tratamentos nos tempos 0, 15 e 30 dias.

Filo	Tempo 0	Controle		Amônia quaternária		Hipoclorito		Ar		Hipersalina		Água doce		Hidrojateamento	
		15	30	15	30	15	30	15	30	15	30	15	30	15	30
Arthropoda	3348	3103	2896	2730	2746	2504	2448	2312	2344	2591	2596	1813	1418	1411	1011
Mollusca	1146	1641	1890	1644	1754	1502	1587	1149	1417	1105	885	917	807	856	800
Annelida	30	177	429	50	129	65	153	117	212	128	22	73	31	108	38
Chordata	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Platyhelminthes	18	19	21	34	16	14	11	22	16	19	14	14	7	10	0
Cnidaria	0	0	3	0	4	0	7	0	7	6	0	5	0	3	1
Echinodermata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rodophyta	A	P	P	P	P	P	P	P	A	A	P	A	P	A	A
Ectoprocta	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Total Geral	4542	4940	5240	4458	4649	4085	4206	3600	3996	3850	3517	2822	2263	2389	1850

A: Ausente; P: Presente

O número de epibiontes diferiu ($p < 0,05$) entre os tratamentos, porém não diferiu ($p > 0,05$) entre as coletas (15^o e 30^o dias).

Apenas os métodos de hidrojateamento e de exposição dos animais à água doce possibilitaram uma redução significativa no número de epibiontes em relação ao controle (Figura 5).

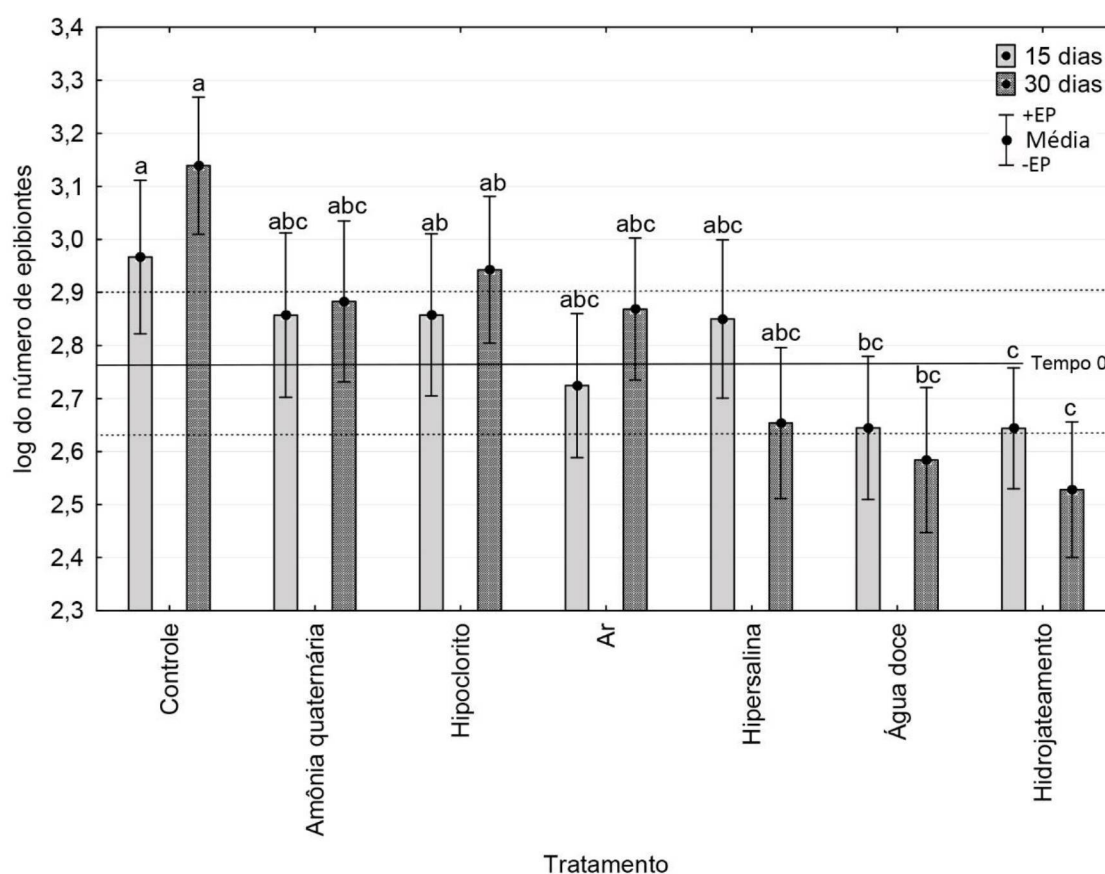


Figura 5: Relação entre o número de epibiontes identificados nas conchas das ostras expostas aos diferentes tratamentos, nos períodos pós-tratamento (15 e 30 dias). Linha contínua e tracejada apresentando, respectivamente, a média e o erro padrão do número de epibiontes no Tempo 0. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Ambos os métodos foram também os mais eficazes para a diminuição de organismos pertencentes aos filos Annelida, Mollusca e Arthropoda. Em contrapartida, a exposição ao ar não demonstrou eficácia para nenhum dos filos encontrados, quando comparada ao grupo controle.

Nenhum dos seis tratamentos foi eficaz na redução de Platyhelminthes, Rodophyta e Ectoprocta presentes nas conchas das ostras. Em três dos nove filos

identificados não foi possível testar a eficácia dos tratamentos em relação ao controle, em função do baixo número de animais identificados (Chordata (n = 2), Cnidaria (n = 36) e Echinodermata (n = 1)) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da eficácia dos diferentes tratamentos sobre os filós de epibiontes encontrados nas conchas das ostras em relação ao grupo controle (Sim – existência de diferenças significativas; Não – inexistência de diferenças significativas, NC – não comparável, $\alpha = 0,05$).

Filo	Tratamento					
	Hidrojateamento	Água Doce	Água Hipersalina	Hipoclorito de Sódio	Amônia Quaternária	Ar
Annelida	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Mollusca	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Arthropoda	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
Platyhelminthes	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Rodophyta	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Ectoprocta	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Chordata	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Cnidaria	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Echinodermata	NC	NC	NC	NC	NC	NC

O número total de epibiontes não diferiu ($p > 0,05$) entre os quatro andares das lanternas de cultivo. Entretanto, ao se avaliar separadamente a influência da posição na lanterna sobre a prevalência de cada filo, constatou-se haver maior prevalência de epibiontes do filo Mollusca (n = 4.984) no segundo andar, diferindo estatisticamente do primeiro (n = 3.712) ($p < 0,05$). Já, para os demais andares não houve diferenças em termos de prevalência de nenhum filo.

2.5.3 Mortalidade das ostras pós-exposição

Ao final do período pós-exposição (30 dias) a taxa de mortalidade das ostras tratadas foi de 8,8%, enquanto que no grupo controle foi de 22,5%. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) no número de ostras mortas entre 15 e 30 dias no grupo controle e nos tratamentos com exposição ao ar e hidrojateamento (Figura 6).

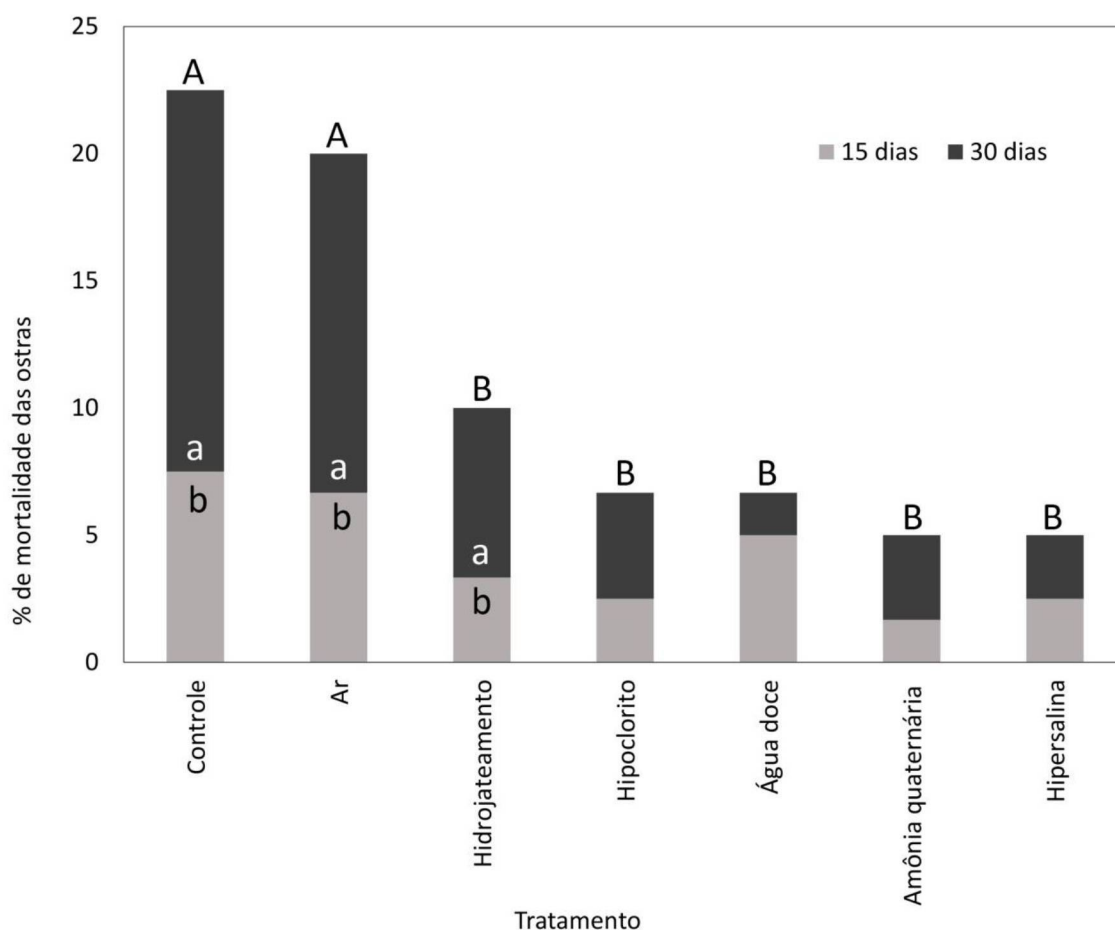


Figura 6: Percentagem de ostras mortas no grupo controle e nos respectivos tratamentos utilizados para combate aos organismos epibiontes. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de 15 e de 30 dias.

2.5.4 Variáveis biométricas e índice de condição

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os índices biométricos mensurados em todos os tratamentos e também em relação ao Tempo 0 (Tabela 8). Entretanto, as variáveis biométricas ($p > 0,05$) não sofreram influência dos tratamentos durante os 30 dias de estudo. Sugerindo-se, portanto, não ter havido influência do tempo total de experimentação sobre as taxas de crescimento ou sobre o ganho de peso dos animais.

Tabela 8: Variáveis biométricas (média e mín-máx) das ostras expostas aos diferentes tratamentos, no tempo 0 e durante todo o período experimental. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tratamento	Altura (cm)	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Peso total (g)
Tempo 0	6,8 ^d (5,7-7,5)	4,9 ^{ab} (4,0-5,4)	2,2 ^{ab} (1,9-2,5)	66,3 ^{abc} (47,3-91,2)
Controle	7,2 ^{cd} (5,7-8,5)	4,8 ^b (3,5-6,8)	2,2 ^{ab} (1,4-2,9)	65,3 ^{bc} (39,9-136,1)
Água doce	7,5 ^{abc} (6,1-8,8)	5,0 ^{ab} (4,0-6,3)	2,2 ^a (1,5-3,1)	72,4 ^a (53,6-93,3)
Amônia quaternária	7,5 ^{abcd} (5,3-9,0)	5,2 ^a (4,3-8,3)	2,2 ^a (1,6-3,2)	75,3 ^a (49,6-105,7)
Ar	7,3 ^{cd} (5,5-9,2)	5,0 ^{ab} (3,9-8,3)	2,2 ^{ab} (1,5-3,2)	69,0 ^{ab} (41,5-110,4)
Hidrojetamento	7,4 ^{bcd} (5,5-9,2)	4,8 ^b (2,6-6,3)	2,1 ^b (1,4-3,1)	60,7 ^c (38,6-96,3)
Hipersalina	7,8 ^a (5,6-9,2)	5,2 ^a (4,2-7,5)	2,1 ^{ab} (1,3-2,8)	75,4 ^a (50,8-108,9)
Hipoclorito de sódio	7,7 ^{ab} (6,0-9,3)	5,0 ^{ab} (3,7-6,4)	2,2 ^{ab} (1,5-3,3)	74,1 ^a (49,2-116,9)

O índice de condição calculado no tempo 0 não diferiu dos índices registrados nos tratamentos experimentais, com exceção do tratamento de exposição dos animais à água doce e à água hipersalina após 15 dias, que se mostraram mais elevados.

Já, o grupo controle foi o que apresentou o menor índice de condição durante todo o período experimental, diferindo estatisticamente dos tratamentos com água doce, água hipersalina, hipoclorito de sódio e também do Tempo 0.

Ao comparar o índice de condição entre os períodos pós-tratamento (15 e 30 dias), foi observado que somente no tratamento com exposição à água doce ocorreu redução dos valores após 15 dias. Nos demais tratamentos o índice manteve-se semelhante em ambos os períodos (Figura 7).

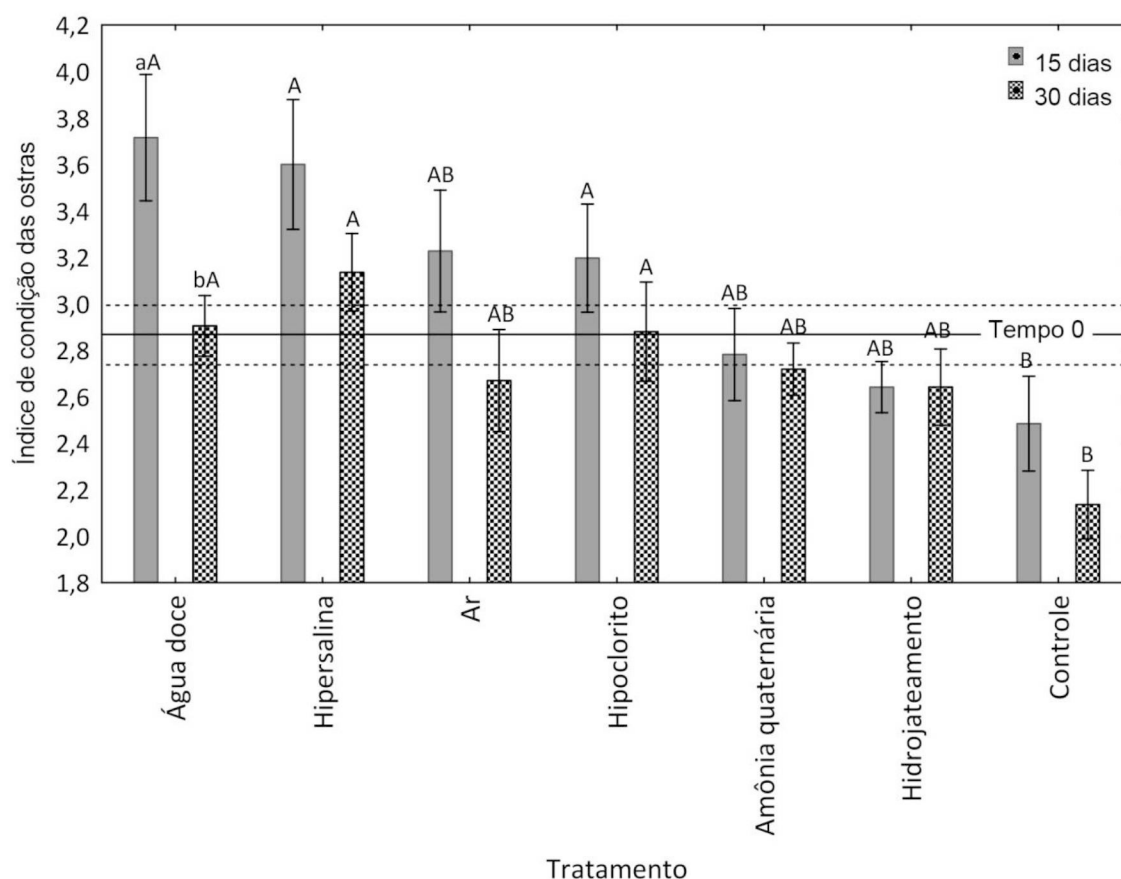


Figura 7: Índice de condição de ostras expostas aos diferentes tratamentos, nos períodos pós-tratamento (15 e 30 dias). Linha contínua e tracejada apresentando, respectivamente, a média e o erro padrão do índice de condição no Tempo 0. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os períodos pós-tratamento (15 e 30 dias), ambos analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

2.6 DISCUSSÃO

A identificação de nove filos de epibiontes nas conchas das ostras aqui avaliadas, com predominância de Arthropoda, Mollusca e Annelida, assemelharam-se aos resultados descritos por Schuster-Pinto (2007). No estudo, realizado há cerca de 10 anos, a autora identificou oito filos presentes nas conchas de *Crassostrea* sp. cultivadas, também com predominância de Mollusca ($n = 1.744$ indivíduos) e de Arthropoda ($n = 1.331$ indivíduos) na mesma baía (de Guaratuba) onde foi realizado o presente estudo. Esta similaridade evidencia uma relativa estabilidade entre os filos de epibiontes predominantes em ostras desta região.

O predomínio de Arthropoda é justificado pelo elevado número de cirripédios (cracas) sobre as conchas. Segundo Alvarenga e Nalesso (2006), as cracas podem afetar as taxas de filtração e de sobrevivência das ostras (*C. brasiliana*). Isto principalmente por se fixarem em superfícies sólidas (conchas e estruturas de cultivo, por exemplo), viverem em densas aglomerações nos mesmos locais ocupados pelas ostras, competirem por alimento e oxigênio (Ruwa e Polk, 1994). Além disso, esses organismos danificam a borda de crescimento e dificultam a abertura e o fechamento das valvas, quando fixadas sobre elas.

O filo Mollusca esteve entre os mais prevalentes nas conchas das ostras, devido ao elevado número de mitilídeos. Segundo Galvão *et al.* (2009), quando fixados em conchas de ostras ou em estruturas de cultivo, esses animais secretam uma substância de alta viscosidade produzida pela glândula bissogênica capaz de provocar acúmulo de lodo, levando as ostras à morte. No estudo realizado por Pereira *et al.* (1988), os autores constataram que a incrustação por mitilídeos, mesmo quando intensa, não provocou a mortalidade ou redução no crescimento de ostras cultivadas em mesas, devido a exposição desses animais ao ar, durante as marés baixas.

O terceiro filo de maior predominância nas ostras foi Anellida. Esse grupo apresentou um elevado número de poliquetas, principalmente, daqueles conhecidos como poliquetas errantes (geralmente de vida livre) e poliquetas tubícolas (vivem em pequenos tubos). Segundo Schuster-Pinto (2007) os poliquetas são organismos encontrados em abundância e são recorrentes em bivalves. Além disso, Figueras e Villalba (1988) relataram que esses animais são considerados predadores de ostras e podem ocasionar mortalidade, principalmente de indivíduos mais jovens.

As ostras que apresentaram o maior número de epibiontes sobre suas conchas foram aquelas do grupo controle, o que seria esperado, pois elas não passaram por nenhum tipo de manejo de limpeza durante os três meses que antecederam o experimento, mais os 30 dias experimentais. Além disso, as ostras do controle, assim como aquelas expostas ao ar, apresentaram taxas crescentes de mortalidade entre o 15° e o 30° dia. Esses dados corroboram com o registrado por Jakob e Wang (1994), que relataram uma maior mortalidade de indivíduos (*Crassostrea gigas*) quando estes não eram submetidos ao processo de limpeza. Já no estudo realizado por Schuster-Pinto (2007), a autora não encontrou diferenças nas taxas de mortalidade entre ostras

manejadas com maior frequência e aquelas sem limpeza, o que significa que, naquele caso, a quantidade de epibiontes presente nas conchas não afetou a sobrevivência das ostras.

Segundo Sala e Lucchetti (2008) os produtores de ostras relatam usualmente dificuldades e limitações para a aplicação de tratamentos de limpeza das ostras, uma vez que esses procedimentos exigem a retirada das estruturas de cultivo da água, seu transporte até os locais de manejo e só então a exposição ao tratamento de limpeza. Manzoni (2001) ressalta que tais práticas implicam em elevado esforço físico e gasto de tempo, fazendo com que os produtores estendam, o tanto quanto possível, o período entre manejos de limpeza. O autor ressalta ainda que uma frequência superior a 30 dias implica em prejuízos ao crescimento das ostras e ao rendimento econômico do empreendimento.

Para minimizar esses problemas, Rodriguez e Ibarra-Obando (2008) sugeriram o monitoramento das comunidades incrustantes e a aplicação de métodos de redução direcionados aos períodos de desenvolvimento de cada espécie. Desta forma, seria possível controlar as populações especificamente e reduzir a influência destes organismos sobre os bivalves cultivados.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram, entretanto, uma eficiência apenas relativa de todos os métodos empregados na limpeza das conchas de ostras, tanto em relação à redução numérica dos organismos epibiontes, quanto em relação aos grupos zoológicos identificados.

A exposição ao ar, método comumente utilizado pelos ostreicultores brasileiros, mostrou-se muito pouco eficiente em termos do combate aos epibiontes, além de não ter evitado a morte das ostras em relação ao que foi observado no grupo controle. Gervis e Sims (1992) relataram em seu estudo que a exposição ao ar pode apresentar diferentes respostas aos organismos, decorrente da composição da comunidade de epibiontes sobre as conchas (organismos rígidos ou organismos de corpo mole) e da sensibilidade de cada espécie de ostra. Segundo Fitridge *et al.* (2012), alguns organismos calcários, como por exemplo, as cracas, podem manter sua umidade interna por longos períodos e conseqüentemente não morrer durante a exposição ao ar.

Os tratamentos químicos (exposição à água hipersalina, ao hipoclorito de sódio e à amônia quaternária) provavelmente teriam apresentado melhores resultados, pelo menos em termos de eliminação de epibiontes, se o tempo de exposição ou as concentrações utilizadas tivessem sido maiores. Mas, isso implicaria também em maiores custos para os produtores, riscos ambientais (no caso dos dois últimos tratamentos) e maior probabilidade de morte de ostras. Em relação a água hipersalina, Rolheiser *et al.* (2012) observaram em seu estudo que ostras expostas às salinidades 40, 50 e 70 UPS não apresentaram diminuição de epibiontes sobre as conchas. Já, os efeitos do hipoclorito de sódio sobre os epibiontes foram observados por Denny (2008), o qual constatou que este produto químico, em uma concentração de 0,5% e durante uma exposição dos animais por 2 minutos, reduziu a propagação de ascídias *Didemnum vexillum*, porém não reduziu a presença de tunicados nas conchas do mexilhão *Perna canaliculus*. Segundo Williams e Schroeder (2004), o uso de hipoclorito de sódio para a redução de epibiontes de forma rápida deve ser um processo rigoroso, pois, este produto é capaz de matar toda a comunidade de um determinado ambiente.

O hidrojateamento e a imersão em água doce foram os métodos mais eficientes de redução do número de organismos dos filos Mollusca e Arthropoda. Este fato corrobora com o estudo de Mcennulty *et al.* (2001), que cita ambos os métodos como os mais utilizados mundialmente na redução de moluscos e de artrópodes (principalmente caranguejos) sobre as conchas de ostras.

A imersão das ostras em água doce apresentou eficiência relativamente elevada na redução de epibiontes, diferindo do relatado por Rolheiser *et al.* (2012), que avaliaram métodos para redução do *biofouling* em *C. gigas*. Naquele caso, os autores concluíram não ter havido redução no número de epibiontes sobre as conchas e registraram menor sobrevivência de ostras expostas por apenas dez minutos à água doce. No presente caso, como as ostras da espécie *C. gasar* apresentam elevada capacidade de sobrevivência em água doce (em média de 15 dias, como observado no Capítulo 1 desta tese), este é um método seguro e não-residual de controle de epibiontes.

O hidrojateamento é um método amplamente utilizado por ostreicultores do litoral de Santa Catarina, maior região produtora de ostras cultivadas do Brasil, tanto para a limpeza dos animais, quanto das estruturas de cultivo (Santana, 2005). Este

autor também cita como benefícios da técnica o aumento do fluxo de alimento pela limpeza das malhas, resultando em um maior crescimento e maior sobrevivência das ostras durante o cultivo. Forrest e Blakemore (2006) também evidenciaram que o hidrojateamento é um método não-seletivo de alta eficiência.

As variações biométricas e dos índices de condição das ostras registrados em todos os tratamentos durante o experimento provavelmente estão relacionadas às diferentes idades dos animais utilizados. Isto porque, apenas uma parte da ostreicultura brasileira emprega sementes produzidas em laboratório, utilizando lotes de idades homogêneas. Na maior parte do Brasil (e inclusive no Paraná) as sementes ou mesmo os juvenis utilizados em fazendas marinhas são obtidos através do extrativismo realizado no ambiente natural. Nesta prática, o critério de seleção adotado é o tamanho do animal e não a sua idade, já que a velocidade de crescimento de ostras selvagens pode variar de animal para animal devido às características ambientais e genéticas (Newkirk, 1988). Tais observações são evidenciadas por Lopes et al. (2013), que ressaltam que o extrativismo de ostras com diferentes idades pode resultar no crescimento rápido de indivíduos jovens ou lento de indivíduos mais velhos, quando todos são inseridos em um mesmo sistema de engorda.

A partir dos resultados encontrados, conclui-se que a exposição das ostras cultivadas (*C. gasar*) à água doce por 24 h e a limpeza das conchas através do método de hidrojateamento foram os métodos mais eficazes para controle do número de organismos epibiontes e para minimização das taxas de mortalidade das ostras.

2.7 REFERÊNCIAS

ADAMS, C. M. et al. Biofouling in marine molluscan shellfish aquaculture: A survey assessing the business and economic implications of mitigation. **Journal of the world aquaculture society**, v. 42, n. 2, p. 242-252, 2011.

ALVARENGA, L.; NALESSO, R. C. Preliminary assessment of the potential for mangrove oyster cultivation in Piraquê-açu river estuary (Aracruz, ES). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 163-169, 2006.

ANSA, E. J.; BASHIR, R. M. Fishery and culture potentials of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 392-394, 2007.

ARAKAWA, K. Y. Competitors and fouling organisms in the hanging culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Marine Behaviour and Physiology**, v. 17, p. 67-94, 1990.

BNDO. Banco Nacional de Dados Oceanográficos. Paraná, 2016. Disponível em: < <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/> >.

CHENEY, D. P. Bivalve shellfish quality in the USA: from the hatchery to the consumer. **Journal of the world aquaculture society**, v. 41, n. 2, p. 192-206, 2010.

DOROUDI, M. S. Infestation of pearl oysters by boring and fouling organisms in northern Persian Gulf. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 25, p. 168-169, 1996.

FITRIDGE, I. et al. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 649-669, 2012.

FORREST, B. M.; BLAKEMORE, K. A. Evaluation of treatments to reduce the spread of a marine plant pest with aquaculture transfers. **Aquaculture**, v. 257, p. 333-345, 2006.

FUNO, I. C. S. A. et al. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 41, n. 4, p. 837-847, 2015.

GUENTHER, J. S., P. C.; NYS, R. The effect of age and shell size on accumulation of fouling organisms on the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). **Aquaculture**, v. 252, p. 366-373, 2006.

JAKOB, G. S.; WANG, J. The effect of manual handling on oyster growth in land based cultivation. **Journal of Shellfish Research**, v. 13, n. 1, p. 183-186, 1994.

LOPES, G. R. et al. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 975-982, 2013.

MANZONI, G. **Ostras: aspectos bioecológicos e técnicas de cultivo**. Itajaí: 2001.

MARSHALL, R. D.; DUNHAM, A. Effects of culture media and stocking density on biofouling, shell shape, growth, and survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 406, p. 68-78, 2013.

MCENNULTY, F. R. et al. A literature review of rapid response options for the control of ABWMAC listed species and related taxa in Australia. **CSIRO Marine Research**, p. 13-56, 2001.

MELLO, G. L. Policultivo de ostras e camarões marinhos em viveiros de aquicultura. **FAEPE**, p. 23, 2007.

MOHAMMAD, M. B. M. Relationship between biofouling and growth of the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) in Kuwait, Arabian Gulf. **Hydrobiologia**, v. 51, n. 2, p. 129-138, 1976.

MORALES, J. **Acuicultura marina animal**. 1986.

NEL, R.; COETZEE, P. S.; VANNIEKERK, G. The evaluation of two treatments to reduce mud worm (*Polydora hoplura* Claparede) infestation in commercially reared oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture**, v. 141, p. 31-39, 1996.

NEWKIRK, G. On the development of commercial bivalve hatcheries. In: URIBE, E. (Ed.). **Producción de larvas y juveniles de especies marinas**: Coquimbo, Chile: Universidad Catolica del Norte, 1988. p.104-171.

PAULEY, G. B. V. D. R., B.; TROUTT, D. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific Oyster. **Fish and Wildlife Service Biology**, p. 28, 1988.

PIOLA, R. F.; DUNMORE, R. A.; FORREST, B. M. Assessing the efficacy of spray delivered 'ecofriendly' chemicals for the control and eradication of marine fouling pests. **Biofouling**, v. 26, p. 187-203, 2010.

PIT, J. H.; SOUTHGATE, P. C. Fouling and predation, how do they affect growth and survival of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, during nursery culture? **Aquaculture International**, v. 11, p. 545-555, 2003.

ROCHA, R. M. M., T. R.; METRI, R. . Ascídias (Tunicata, Ascideacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22(2), p. 461-476, 2005.

RODRIGUEZ, L. F.; IBARRA-OBANDO, S. E. Cover and colonization of commercial oyster (*Crassostrea gigas*) shells by fouling organisms in San Quintin bay, Mexico. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, n. 2, p. 337-343, 2008.

ROLHEISER, K. C. et al. Assessment of chemical treatments for controlling *Didemnum vexillum*, other biofouling, and predatory sea stars in Pacific oyster aquaculture. **Aquaculture**, v. 364-365, p. 53-60, 2012.

RUWA, R. S.; POLK, P. Patterns of spat settlement recorded for tropical oyster *Crassostrea cucullata* (Born 1778) and the barnacles, *Balanus amphitrite* (Darwin 1854) in the mangrove Creek. **Tropical Zoology**, v. 7, n. 1, p. 121-130, 1994.

SALA, A.; LUCCHETTI, A. Low-cost tool to reduce biofouling in oyster longline culture. **Aquacultural Engineering**, v. 39, p. 53-58, 2008.

SANTANA, F. E. **Desenvolvimento do protótipo de uma máquina para lavagem de lanternas no cultivo de ostras**. 2005. 131 (Mestrado). Engenharia Mecânica, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHUSTER-PINTO, F. M. V. **Efeito de organismos incrustantes sobre o crescimento e a sobrevivência de ostras nativas do gênero *Crassostrea* em um cultivo suspenso na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil)**. 2007. Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

TAYLOR, J. J. S., P. C.; ROSE, R. A. Fouling animals and their effect on the growth of silver-lip pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 153, p. 31-40, 1997.

WALSH, J. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. **Nature**, v. 350, p. 53-55, 1991.

ZHANG, Z. et al. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 256, p. 502-509, 2006.

**3 CAPÍTULO III - ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA BACTERIANA DE
OSTRAS CULTIVADAS (*Crassostrea* sp.) NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

METAGENOMIC ANALYSIS OF BACTERIAL MICROBIOTA FROM FARMED OYSTERS
(*Crassostrea* sp.) FROM THE NORTHEAST REGION OF BRAZIL

3.1 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo utilizar o sequenciamento genético de nova geração para identificar a microbiota bacteriana de ostras cultivadas em regiões estuarinas em quatro estados da região Nordeste do Brasil. Foram amostradas sete fazendas marinhas dedicadas ao cultivo de ostras. Em cada ponto amostral foram realizadas, no período de oito meses, duas coletas no período de seca e outras duas no período de chuvas. As ostras coletadas foram armazenadas sob refrigeração e encaminhadas para análise. Em laboratório, realizaram-se os procedimentos de extração do DNA total e amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. A partir das sequências, foram estabelecidas as unidades taxonômicas, formando o completo mapeamento das linhagens bacterianas das amostras. Foram identificados 106 gêneros de bactérias pertencentes a 103 famílias, 70 ordens, 39 classes e 21 filos. Do total de gêneros, 40 foram de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos, sendo que destes, nove são conhecidas por causarem Doenças Transmitidas por Alimentos e seis são potencialmente patogênicos às ostras. Os gêneros mais prevalentes encontrados foram *Mycoplasma*, *Propionigenium*, *Psychrilyobacter* e *Arcobacter*. Os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade de monitoramento mais sistemático das bactérias do gênero *Mycoplasma* em ostras cultivadas e comercializadas na região Nordeste do Brasil. Atualmente, esse gênero não faz parte dos micro-organismos cuja análise e monitoramento são exigidos pela legislação brasileira durante o processo de produção e/ou de comercialização de ostras, apesar de ser o mais prevalente em todos os pontos amostrais e de apresentar potencial patogênico tanto para as ostras quanto para os consumidores.

Palavras-chave: ostreicultura; cultivo; patogenicidade; metagenômica.

3.2 ABSTRACT

The aim of this work was to utilize the new generation genetic sequencing to identify the bacterial microbiota of oysters farmed in estuarine regions of four states from the Northeast region of Brazil. Oysters from seven marine farms were sampled. Over eight-month period, four sampling was performed: two during the drought season and two during the rain season. The samples of oysters were stored in thermal boxes and referred to analysis. In the laboratory, we performed methodological procedures to extract the total DNA and to amplify and to sequence the 16S rRNA gene. This sequences were used to established the taxonomic units and, letter on, mapping the bacterial lineage of samples. We identified 106 genera of bacteria that belong to 103 families, 70 orders, 39 classes and 21 phyla. Of the total genera, 40 were from bacteria potentially pathogenic to humans, nine of which are known to cause Foodborne Diseases and six are potentially pathogenic to oysters. The most prevalent genes found were *Mycoplasma*, *Propionigenium*, *Psychrilyobacter* and *Arcobacter*. The results obtained in this study indicate a need for more systematic monitoring of bacteria of

the genus *Mycoplasma* in oysters farmed and commercialized in the Northeast region of Brazil. Currently, analysis of this genus is not required by the Brazilian legislation during the production and/or commercialization process of oysters. Although it presented a high prevalence in all collect points and also present high pathogenic potential for both oysters and consumers.

Keywords: oyster farming; cultivation; pathogenicity; metagenomic.

3.3 INTRODUÇÃO

A estreita relação entre funções vitais dos moluscos bivalves e o ambiente onde vivem faz desses animais reconhecidos como bioindicadores para o monitoramento da qualidade ambiental, além de afetarem a segurança alimentar dos consumidores (Kim e Powell, 2006).

As ostras, além de habitarem naturalmente ambientes estuarinos, são amplamente cultivadas nestes locais, onde o alimento é abundante para o seu desenvolvimento (Dame, 2012). Sua alimentação se dá através da filtração e captura de partículas em suspensão presentes na água. Ao passar pelas brânquias, ficam retidos organismos do fito e do microzooplâncton, material orgânico e inorgânico dissolvido, além de micro-organismos, como as bactérias (Kach e Ward, 2008). Tal mecanismo de alimentação faz com que toda a microbiota presente nas ostras esteja diretamente associada ao ambiente aquático que habita, variando de acordo com os fatores ambientais, como a salinidade, a carga bacteriana na água, a temperatura, a alimentação, assim como, com as atividades antrópicas e o manejo durante a produção (Prieur *et al.*, 1990).

As ostras abrigam naturalmente uma microbiota bacteriana diversificada, muitas vezes composta por bactérias patogênicas, principalmente pelas espécies pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e *Micrococcus* (Paillard *et al.*, 2004). Entretanto, podem também incluir alguns patógenos que estão naturalmente presentes na água de cultivo, como *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, enquanto outros são geralmente associados à presença de contaminação fecal nas águas, tais como *V. cholerae*,

Salmonella sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Campylobacter jejum* e *Yersinia enterocolitica* (Fda, 2011).

Além de representar riscos à saúde pública quando as ostras são consumidas, essas bactérias também podem causar a morte dos animais cultivados, afetando drasticamente os empreendimentos em escala comercial (Fernandez *et al.*, 2014).

As principais bactérias reconhecidas por causar mortalidade de ostras do gênero *Crassostrea* são algumas espécies de *Vibrio* (Le Roux *et al.*, 2002); *Nocardia* (Friedman *et al.*, 1991); *Mycoplasma* (Azevedo, 1993); *Rickettsia* (Azevedo e Villalba, 1991) e *Chlamydia* (Renault e Cochenne, 1995).

Um dos principais problemas para se identificar bactérias está relacionado à necessidade de multiplicação das bactérias em laboratório. Estima-se que menos de 0,1% de todas as bactérias conhecidas sejam cultivadas por métodos tradicionais (Nocker *et al.*, 2004). Neste contexto, métodos baseados no sequenciamento de genes bacterianos têm favorecido pesquisas de comunidades bacterianas em organismos e em ambientes marinhos, pois possibilita o completo mapeamento das bactérias presentes em uma determinada amostra a partir de sua análise direta (Postollec *et al.*, 2011), sem a necessidade de multiplicação das mesmas.

Um dos métodos analíticos mais avançados para este fim é o pirosequenciamento. Utilizado especialmente na caracterização mais aprofundada de comunidades bacterianas complexas, o método permite a identificação de bactérias em amostras obtidas diretamente do ambiente, eliminando-se assim a necessidade de isolamento e cultivo, com resultados rápidos, seletivos e de alta sensibilidade, por ser capaz de detectar fragmentos específicos de genes (Petrosino *et al.*, 2009).

Este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar a microbiota bacteriana de ostras cultivadas em regiões estuarinas de quatro estados da região Nordeste do Brasil, utilizando o sequenciamento de nova geração como ferramenta analítica.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em sete fazendas de cultivo de ostras de quatro estados da região Nordeste do Brasil: Macau (P1) e Tibau do Sul (P2), no Rio Grande do Norte; Marcação (P3), na Paraíba; Passo de Camaragibe (P4) e Barra de São Miguel (P5), em Alagoas; Brejo Grande (P6) e Indiaroba (P7), em Sergipe (Figura 8).

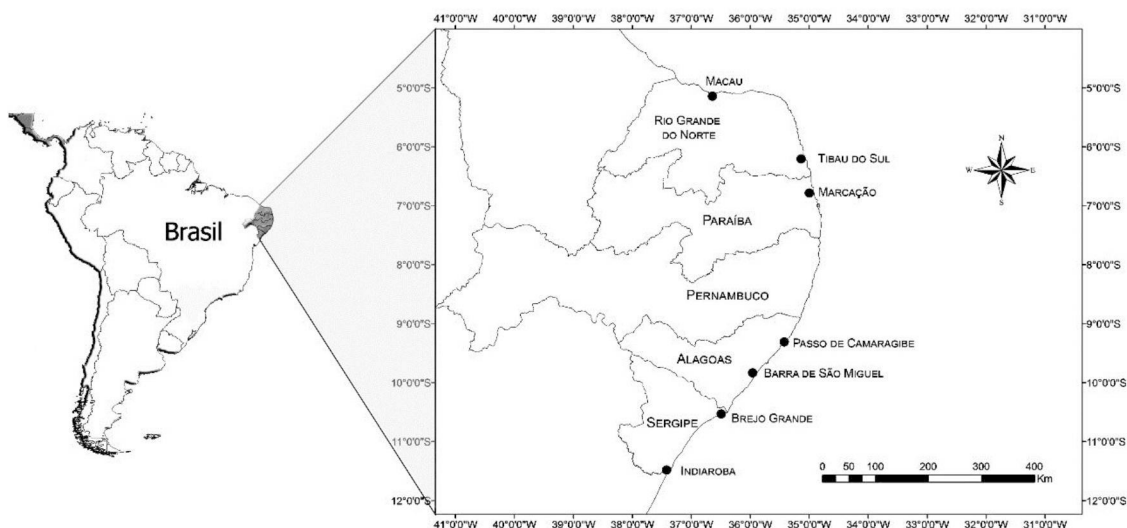


Figura 8: Localização dos pontos de coleta de ostras para a determinação da microbiota bacteriana.

Todas as fazendas marinhas monitoradas cultivam ostras em sistema suspenso fixo, podendo ser em mesas (conjunto de tubos de PVC enterrados no estuário e ligados entre si por uma tela de malha de 1 cm) (P1, P2, P3, P4 e P5), em varais (conjunto de estacas enterradas no estuário com um cabo guia) (P6) e em sistemas BST® (*Adjustable Long-Line Oyster System*) (conjunto de estacas enterradas no estuário com um cabo guia contendo as estruturas de cultivo (BST) (P7).

3.4.2 Variáveis abióticas

No momento das amostragens, foram determinados na água de cultivo: temperatura (°C) e concentração de oxigênio dissolvido (mg/L), com um oxímetro digital (YSI® Pro 20, USA); salinidade (UPS), com um refratômetro (Instrutemp®, Brasil); e pH, com um pHmetro (Sensoglass® SP1400, Brasil). Dados pluviométricos foram

obtidos a partir do banco de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet, 2016).

3.4.3 Amostragem

Em cada ponto amostral foram realizadas quatro coletas de ostras das espécies *C. gasar* (P2, P3, P4, P5, P6 e P7) e *C. rhizophorae* (P1), em períodos de seca (set/2015 e out/2015) e de chuvas (mar/2015 e jun/2015).

Vinte ostras (altura média = 7,5 cm $\pm$ 1,8) foram coletadas em cada ponto amostral durante a maré baixa (vazante), quando estavam expostas ao ar (P4, P5, P6 e P7) ou dentro da água (P1, P2, P3).

As ostras foram armazenadas e transportadas, sob refrigeração, em temperatura de 5°C, em sacos plásticos mantidos em caixas isotérmicas contendo gelo em gel. Para evitar o contato direto da amostra com o gelo, uma lâmina de papelão foi colocada entre as ostras e o gelo. Na face interna das tampas das caixas isotérmicas foram fixados medidores de temperatura portáteis (Datalogger TagTemp Stick - Novus, Brasil), programados para registrar a temperatura interna em intervalos de cinco minutos, desde o momento da retirada das ostras da água, até o início das análises em laboratório.

As amostras foram enviadas por via aérea para o Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM), pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, localizado na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná, Brasil. O período de transporte não excedeu 48 horas, conforme preconiza o manual do *Codex Alimentarius* (Codex, 1978) e o Plano Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) (Brasil, 2013).

3.4.4 Processamento das amostras

Ao chegarem ao laboratório, as ostras foram externamente limpas com escova estéril, em água potável corrente. As valvas foram abertas para a retirada dos tecidos e líquido intervalvar. Após a homogeneização da amostra, uma alíquota de 200 μ L foi retirada e armazenada em frascos *Eppendorf* para extração de DNA total com o uso do

kit Invitrogen (Purelink® Genomic DNA). A qualidade e a quantidade do DNA total foram avaliadas por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm de absorbância, com um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific, USA).

Todas as análises foram realizadas baseando-se na metodologia proposta por Caporaso *et al.* (2011), com adaptações. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com uma PCR das amostras em um sistema de 10 µL, contendo 5 µL de DNA (10 ng/L), 1 µL de primer universal (515F/806r), 1 µL de primer “adaptador” e 5 µL da enzima KlenTaq DV Readymix. Os níveis de expressão gênica do gene 16S foram analisados em um termociclador (Veriti 96 well Applied Biosystems, USA). As reações foram realizadas a 94°C por 3 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido do processo de amplificação de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos para a desnaturação final; 50°C durante 30 segundos para o anelamento; 68°C durante 1 minuto para a extensão inicial e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Mantendo após isso, as amostras entre 0 e 4°C.

Para a confirmação da amplificação do gene 16S, as amostras foram testadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). No gel, foram aplicados 3 µL da mistura feita com 2 µL de amostra e 2 µL de corante FSUDS (azul de bromofenol). Após, foi realizada a corrida eletroforética das amostras em gel (uma hora) em tensão elétrica constante de 70 volts, na presença de tampão TBE 1X. Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel 3 µL de marcador de peso molecular 1 Kb. O gel foi corado com brometo de etídio (1%) (15 minutos), lavado em água (10 minutos) e visualizado em uma câmara UVP 3UV Transilluminator Imaging System.

O sequenciamento das amostras foi realizado na plataforma Illumina MiSeq de nova geração, capaz de gerar informações sobre milhares de pares de bases em uma única corrida. O kit utilizado para o sequenciamento das amostras foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle), *pair end*.

3.4.5 Análise de dados

As sequências do gene 16S rRNA geradas pelo sequenciamento foram analisadas de acordo com o protocolo do programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Qiime[®]), desenvolvido por Caporaso *et al.* (2010).

As análises de diversidade de Shannon-Winner e de dominância foram realizadas com o auxílio do software Past, versão 2.17.

Os resultados obtidos nas análises genéticas foram também tabelados, ordenados e classificados segundo a sua prevalência. Estabeleceu-se como critério de análise que os gêneros prevalentes seriam aqueles encontrados em quantidades iguais ou superiores a 5% em cada amostra analisada.

Após essa seleção dos grupos prevalentes, avaliou-se, através de regressão múltipla, a influência das variáveis abióticas sobre o percentual de bactérias prevalentes encontrado nas amostras. Posteriormente, através do teste de Kruskal-Wallis, avaliou-se a ocorrência de diferenças estatísticas entre as bactérias prevalentes em cada uma das quatro coletas; entre os pontos amostrais; e, entre as estações do ano. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 10.0 (StatSoft[®]).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Microbiota bacteriana

No conjunto dos pontos amostrais avaliados foram identificados 106 gêneros de bactérias pertencentes a 103 famílias, 70 ordens, 39 classes e 21 filos. Sendo que, os filos de maior prevalência foram Tenericutes, Spirochaetes e Proteobacteria.

Dentre todos os gêneros encontrados, 40 são de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos e apenas nove pertenceram ao grupo das causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Seis gêneros (*Mycoplasma*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum* e *Alteromonas*) foram identificados como potencialmente patogênicos para as ostras.

Observou-se também um grande percentual de sequências do gene 16S (BD2-6, WH1-8, SC3-56, por exemplo) de bactérias ainda sem identificação específica (“não classificadas”). Bactérias que não foram adequadamente identificadas pelo método, foram aqui consideradas como “indefinidas” (Tabela 9).

Tabela 9: Percentual médio de filos e gêneros de bactérias encontradas nas ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil. * Bactérias potencialmente patogênicas para as ostras; ** Bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos; *** Bactérias que podem ser causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos.

Filo/Gênero	% de bactérias	Filo/Gênero	% de bactérias
Tenericutes	21,7	<i>Polaribacter</i>	0,1
<i>Mycoplasma</i> */**	38,8	<i>Maribacter</i>	0,1
<i>Acholeplasma</i> **	0,1	<i>Winogradskyella</i>	0,1
Indefinido	0,7	<i>Chryseobacterium</i> **	0,1
Spirochaetes	6,6	<i>Owenweeksia</i>	0,1
<i>Borrelia</i> **	0,5	<i>Rubricoccus</i>	0,1
<i>Spirochaeta</i> **	0,1	<i>Fulvivirga</i>	0,1
<i>Treponema</i> **	0,1	<i>Sediminibacterium</i>	0,1
Indefinido	9,5	<i>Kordia</i>	0,1
Não classificada	0,1	<i>Wautersiella</i> **	0,1
Cyanobacteria	2,6	<i>Robiginitalea</i>	0,1
<i>Synechococcus</i>	0,7	<i>Gramella</i>	0,1
Indefinido	2,8	Não classificada	0,1
Fusobacteria	2,1	Proteobacteria	0,4
<i>Propionigenium</i>	4,5	<i>Arcobacter</i> ***	1
<i>Psychrilyobacter</i>	3,8	<i>Shewanella</i> **	0,8
<i>Fusobacterium</i> **	0,6	<i>Devosia</i>	0,7
<i>Cetobacterium</i> **	0,4	<i>Francisella</i> **	0,4
Indefinido	0,3	<i>Psychrobacter</i> **	0,3
Bacteroidetes	0,5	<i>Pseudoalteromonas</i> **	0,3
<i>Bacteroides</i> **	0,6	<i>Sulfurimonas</i>	0,2
<i>Cloacibacterium</i> **	0,4	<i>Thiomicrospira</i>	0,2
<i>Tenacibaculum</i>	0,4	<i>Thiothrix</i>	0,2
<i>Fluviicola</i>	0,2	<i>Phyllobacterium</i>	0,2
<i>Saprospira</i>	0,2	<i>Kaistobacter</i>	0,2
<i>Paludibacter</i>	0,2	<i>Sphingomonas</i> ***	0,2
<i>Lewinella</i>	0,2	<i>Photobacterium</i> */**	0,2
<i>Roseivirga</i>	0,2	<i>Vibrio</i> */***	0,2
<i>Flammeovirga</i>	0,1	<i>Novispirillum</i>	0,2
<i>Flavobacterium</i> ***	0,1	<i>Marinomonas</i>	0,2
<i>Crocinitomix</i>	0,1	<i>Desulfococcus</i>	0,1
<i>Aquimarina</i>	0,1	<i>Marinicella</i>	0,1

Filo/Gênero	% de bactérias	Filo/Gênero	% de bactérias
<i>Pseudomonas</i> */***	0,1	<i>Guggenheimella</i>	0,1
<i>Phaeobacter</i>	0,1	<i>Clostridium</i> ***	0,1
<i>Oleibacter</i>	0,1	<i>Finegoldia</i> **	0,1
<i>Sulfurospirillum</i>	0,1	<i>Anaerococcus</i> **	0,1
<i>Desulfovibrio</i> **	0,1	<i>Alkaliphilus</i>	0,1
<i>Crenothrix</i>	0,1	<i>Lactobacillus</i> **	0,1
<i>Novosphingobium</i> **	0,1	Indefinido	0,1
<i>Thalassospira</i>	0,1	Não classificada	0,3
<i>Hahella</i>	0,1	Planctomycetes	0,2
<i>Rhodospirillum</i>	0,1	<i>Planctomyces</i> **	0,2
<i>Bacteriovorax</i>	0,1	Indefinido	0,2
<i>Acinetobacter</i> **	0,1	Verrucomicrobia	0,2
<i>Desulfosarcina</i> **	0,1	<i>Candidatus</i> Xiphinematobacter	0,4
<i>Candidatus</i> Endobugula	0,1	<i>Coralimargarita</i>	0,2
<i>Candidatus</i> Portiera	0,1	<i>Verrucomicrobium</i>	0,2
<i>Janthinobacterium</i> **	0,1	<i>Persicirhabdus</i>	0,1
<i>Oceanospirillum</i> */**	0,1	<i>Rubritalea</i>	0,1
<i>Reinekea</i>	0,1	<i>Luteolibacter</i>	0,1
<i>Octadecabacter</i>	0,1	Indefinido	0,1
<i>Alteromonas</i> */***	0,1	Crenarchaeota	0,2
<i>Erythrobacter</i>	0,1	<i>Nitrosopumilus</i>	0,2
<i>Sphingopyxis</i>	0,1	Chlorobi	0,1
<i>Ferrimonas</i>	0,1	Indefinido	0,1
<i>Pedomicrobium</i>	0,1	Euryarchaeota	0,1
<i>Thalassomonas</i>	0,1	Indefinido	0,1
<i>Glaciecola</i>	0,1	Chlamydia	0,1
<i>Aminobacter</i>	0,1	<i>Candidatus</i> Rhabdochlamydia**	0,1
<i>Desulfarculus</i>	0,1	Indefinido	0,6
<i>Agrobacterium</i> **	0,1	Gemmatimonadetes	0,1
<i>Wolbachia</i>	0,1	Indefinido	0,1
<i>Methylomonas</i>	0,1	Lentisphaerae	0,1
<i>Neptunomonas</i>	0,1	Indefinido	0,1
Indefinido	0,5	Actinobacteria	0,1
Fibrobacteres	0,3	Indefinido	0,1
Indefinido	0,3	<i>Corynebacterium</i> **	0,1
Chloroflexi	0,3	Indefinido	0,1
Indefinido	0,3	Elusimicrobia	0,1
Firmicutes	0,2	Indefinido	0,1
<i>Leuconostoc</i> **	0,7	Acidobacteria	0,1
<i>Fusibacter</i>	0,4	Indefinido	0,1
<i>Staphylococcus</i> ***	0,2	Caldithrix	0,1
<i>Bacillus</i> ***	0,2	Não classificada	0,1
<i>Acidaminococcus</i> **	0,2	Não classificada	0,1
<i>Streptococcus</i> **	0,2	Indefinido	0,1

Filo/Gênero	% de bactérias
Não classificada	0,1
Indefinido	4
Indefinido	4

Ao realizar a análise do índice de diversidade de Shannon-Winner para cada ponto amostral, foi observado que Tibau do Sul-RN apresentou a maior diversidade bacteriana, seguido por Marcação-PB e Macau-RN. Já, os menores índices de diversidade foram registrados em Indiaroba-SE, Passo de Camaragibe-AL e Barra de São Miguel-AL.

Indiaroba-SE apresentou maior dominância de gêneros, decorrente dos elevados percentuais de *Mycoplasma* identificados nas quatro campanhas amostrais. Exemplo disto, foi a prevalência deste gênero em 71% das amostras na coleta 2, enquanto que os demais gêneros não ultrapassaram 3,7% (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner para as amostras de ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil.

Ponto Amostrai	Município	Coleta	n° de gêneros	Dominância	Índice de Shannon
1	Macau-RN	1	18	0,44	1,27
		2	36	0,57	1,30
		3	16	0,83	0,51
		4	21	0,37	1,74
2	Tibau do Sul-RN	1	15	0,53	1,07
		2	22	0,30	1,51
		3	44	0,10	2,98
		4	25	0,71	0,78
3	Marcação-PB	2	35	0,33	1,93
		3	31	0,58	1,25
		4	23	0,57	1,09
4	Passo de Camaragibe-AL	1	9	0,85	0,38
		2	12	0,87	0,40
		3	22	0,52	1,40
		4	18	0,77	0,70
5	Barra de São Miguel-AL	1	18	0,58	1,05
		2	33	0,74	0,84
		3	21	0,85	0,49
		4	16	0,82	0,51
6	Brejo Grande-SE	1	19	0,39	1,34
		2	27	0,33	1,52
		3	18	0,32	1,39
		4	10	0,84	0,39
7	Indiaroba-SE	1	13	0,80	0,55
		2	11	0,88	0,29
		3	9	0,92	0,23

Ponto Amostrai	Município	Coleta	n° de gêneros	Dominância	Índice de Shannon
		4	17	0,79	0,56

De todos os gêneros identificados, aqueles que apresentaram maior prevalência (presentes em quantidade igual ou superior a 5%) nas amostras analisadas foram: *Mycoplasma*, *Propionigenium*, *Psychrilyobacter* e *Arcobacter*. Os três últimos gêneros bacterianos ocorrem naturalmente no ambiente marinho, enquanto *Mycoplasma* sp. faz parte da microbiota normalmente encontrada em ostras (Tabela 11).

Tabela 11: Bactérias prevalentes ($\geq 5\%$) nas amostras de ostras cultivadas na região Nordeste do Brasil.

Ponto	Gênero	Encontrada naturalmente	Prevalência (%)
Macau-RN	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	22,4
	<i>Propionigenium</i>	Sedimento marinho	8,6
Tibau do Sul-RN	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	42,3
	<i>Propionigenium</i>	Sedimento marinho	9,7
	<i>Psychrilyobacter</i>	Sedimento marinho	9,4
Marcação-PB	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	35,3
	<i>Arcobacter</i>	Água contaminada/microbiota normal da ostra	6,7
Passo de Camaragibe-AL	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	24,9
Barra de São Miguel-AL	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	50,1
Brejo Grande-SE	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	43,9
	<i>Propionigenium</i>	Sedimento marinho	12,1
	<i>Psychrilyobacter</i>	Sedimento marinho	14,8
Indiaroba-SE	<i>Mycoplasma</i>	Microbiota normal da ostra	61,2

Não foram identificadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) para as bactérias prevalentes entre as quatro coletas, entre os pontos amostrais e entre as estações do ano.

3.5.2 Variáveis abióticas

Observou-se grande variação entre os resultados das medições de variáveis abióticas na água, em todas as coletas, como seria esperado em um ambiente estuarino. A concentração de oxigênio esteve abaixo do limite considerado tolerável pelas ostras (≥ 3 mg/L) (Mello, 2007), durante a primeira coleta em Tibau do Sul-RN (1,61 mg/L) e a segunda em Brejo Grande-SE (1,08 mg/L). Já os pontos amostrais de Brejo Grande-SE (coleta 1, 2 e 4) e Indiaroba-SE (coleta 1) apresentaram temperaturas acima da faixa considerada ótima (23-31°C) (Ansa e Bashir, 2007). Alguns pontos amostrais apresentaram salinidade inferior àquelas consideradas ótimas para ostras (10-50 UPS) (Funio *et al.*, 2015). Nestes casos, na primeira campanha amostral, Tibau do Sul-RN registrou o menor valor (1 UPS), seguido por Marcação-PB (5 UPS), Passo de Camaragibe-AL (7 UPS) e na segunda campanha foi em Indiaroba-SE (7 UPS). O pH, por sua vez, esteve dentro dos limites de tolerância das ostras (6,7-8,7) (Morales, 1986), em todas as campanhas amostrais (Tabela 12).

Tabela 12: Variáveis abióticas mensuradas durante as quatro campanhas amostrais nos pontos de coleta das ostras na região Nordeste do Brasil.

Ponto	Município/Estado	Coleta	Estação	P	OD	T	S	pH
				(mm)	(mg/L)	(°C)	(UPS)	
				Valores de referência				
				-	> 3 *	23-31 **	10-50 ***	6,7-8,7 ****
1	Macau/RN	1	Chuvosa	155,0	5,01	30,8	33	7,86
		2	Chuvosa	3,4	8,24	28,7	46	8,40
		3	Seca	0,0	6,99	28,7	49	8,32
		4	Seca	0,6	5,25	27,8	39	8,15
2	Tibau do Sul/RN	1	Chuvosa	317,0	1,61	29,8	1	6,71
		2	Chuvosa	301,2	4,85	28,4	27	8,02
		3	Seca	24,4	7,89	29,2	15	7,92
		4	Seca	10,8	4,57	27,8	24	7,56
3	Marcação/PB	1	Chuvosa	406,6	3,43	30,0	5	6,70
		2	Chuvosa	343,2	4,98	27,1	19	7,31
		3	Seca	56,9	3,74	28,3	20	7,33
		4	Seca	19,5	4,44	28,5	27	7,32
4	Passo de Camaragibe/AL	1	Chuvosa	150,6	5,02	31,0	7	7,13
		2	Chuvosa	287,1	4,93	27,2	12	7,71
		3	Seca	42,2	8,36	26,4	10	7,90
		4	Seca	35,8	5,91	28,5	27	7,84
5	Barra de São	1	Chuvosa	58,6	6,90	31,0	30	8,30

Ponto	Município/Estado	Coleta	Estação	P (mm)	OD (mg/L)	T (°C)	S (UPS)	pH
6	Miguel/AL	2	Chuvosa	347,9	4,28	28,0	16	7,59
		3	Seca	42,8	7,03	28,2	19	7,58
		4	Seca	53,4	4,58	28,5	25	7,54
		1	Chuvosa	40,5	4,88	31,7	28	7,13
	Brejo Grande/SE	2	Chuvosa	152,0	1,08	32,2	26	8,05
		3	Seca	23,8	6,18	27,6	26	7,20
		4	Seca	20,6	10,1	32,1	28	7,88
		1	Chuvosa	29,0	4,72	31,8	27	7,20
	Indiaroba/SE	2	Chuvosa	140,0	3,57	28,1	7	7,02
		3	Seca	28,0	6,46	27,2	22	7,18
		4	Seca	39,4	3,57	28,0	26	7,38

P: Precipitação; OD: Oxigênio dissolvido; T: Temperatura; S: Salinidade

* Mello (2007) para *Crassostrea* sp.

** Ansa e Bashir (2007) para *C. gasar*

*** Funo *et al.* (2015) para *C. gasar*

**** Morales (1986) para *C. gigas*

Não houve correlação múltipla ($r^2 = 0,02$; $p = 0,23$) entre as bactérias prevalentes ($\geq 5\%$) nas amostras e as variáveis abióticas mensuradas. Entretanto, quando analisados os gêneros separadamente em relação às variáveis abióticas, observou-se correlação negativa do pH com *Mycoplasma* ($r^2 = 0,25$; $p = 0,001$).

3.6 DISCUSSÃO

A análise molecular das ostras cultivadas possibilitou a realização de um completo mapeamento da microbiota bacteriana destes animais. Esse tipo de análise vem sendo realizado mundialmente com vários propósitos, dentre os quais podem ser citados os estudos realizados por King *et al.* (2012), para avaliar as bactérias encontradas no estômago de ostras cultivadas (*C. virginica*) na Louisiana, USA; por Chauhan *et al.* (2014), para descrever toda a microbiota de ostras cultivadas (*C. virginica*) na baía de Apalachicola, USA; e, por Trabal *et al.* (2012), para diferenciar a microbiota bacteriana de ostras juvenis e adultas de *C. gigas* e *C. corteziensis* cultivadas na costa do México. No Brasil, o presente estudo é o primeiro a utilizar tal metodologia.

O elevado percentual de bactérias dos filos Tenericutes, Spirochaetes e Proteobacteria nas ostras analisadas corrobora com os dados encontrados por Madigan *et al.* (2014b), em ostras cultivadas na região de Camden Haven, Austrália. Esses autores verificaram que a microbiota de ostras *C. gigas* e *Saccostrea glomerata* recém-retiradas da água do cultivo apresentavam 53% de Tenericutes, 27% de Spirochaetes e 14% de Proteobacteria em seu organismo, indicando certa similaridade em termos de composição da comunidade bacteriana de ostras cultivadas em ambientes estuarinos em regiões tão distantes como o Nordeste do Brasil e a Austrália.

Como as ostras analisadas são cultivadas para o consumo, a presença de bactérias com potencial patogênico pode representar risco à saúde do consumidor. Entre os 40 gêneros identificados com este perfil, somente o gênero *Staphylococcus* (0,2%) está entre as bactérias cuja análise é exigida pela legislação brasileira como requisito para a comercialização e o consumo (Resolução RDC n. 12 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2001) e Instrução Normativa Interministerial MPA/MAPA N° 07, de 08 de maio de 2012 (Brasil, 2012)).

A presença de *Staphylococcus* nas ostras está normalmente associada à manipulação destes animais, pois esta bactéria é encontrada na pele e na mucosa de humanos. Esse gênero está dividido em estafilococos coagulase positiva e negativa e, dentre as espécies conhecidas, a bactéria *S. aureus* está associada ao risco de intoxicação alimentar de humanos, causando febre e vômito nos pacientes (Leroy *et al.*, 2016). *Staphylococcus* também pode causar bacteremia, endocardite e infecções cutâneas (Tortora *et al.*, 2012). Porém, como o método aqui empregado não permite diferenciar *Staphylococcus* coagulase positiva de negativa, não foi possível concluir sobre a patogenicidade das bactérias deste grupo identificadas nas análises realizadas.

Neste estudo também foram registradas bactérias causadoras de DTA (*Arcobacter*, *Flavobacterium*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Sphingomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*), as quais são capazes de causar doenças ou perturbações fisiológicas em humanos, como vômitos, febre, diarreia e dores abdominais (Tauxe, 2002). Segundo Kalyoussef e Feja (2014), quando identificadas em alimentos é necessário realizar um acompanhamento para determinar os esforços

preventivos, principalmente incluindo-as nas listas de notificação obrigatória e, desta forma, garantindo a segurança alimentar do consumidor.

De todas as bactérias analisadas e que podem apresentar algum tipo de patogenicidade para as ostras (*Mycoplasma*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum* e *Alteromonas*), somente *Mycoplasma* (variando entre 4,5 a 71% do número total de bactérias em cada amostra) foi dominante em todos os pontos amostrais, sendo que as demais não passaram de 0,3%.

Sabe-se que *Mycoplasma* se prolifera e predomina em ambientes com temperaturas elevadas (King *et al.*, 2012). De acordo com Jaffe *et al.* (2004), essas temperaturas ótimas de crescimento variam entre 20 e 37°C, dependendo da espécie.

O gênero *Mycoplasma* foi isolado pela primeira vez em peixes (*Tinca tinca*) (Kirchhoff e Rosengarten, 1984), embora já tenha sido encontrado por King *et al.* (2012), em abundância no estômago da ostra *C. virginica* cultivadas na baía Terrebonne, Louisiana, USA. Assim como, nas brânquias de *C. gigas* avaliada por Wegner *et al.* (2013), em duas baías da costa alemã (Sylt-Rømø-Bight e Hörnum Deep).

Paillard *et al.* (2004) em seu estudo, relataram que em larvas de moluscos bivalves, a presença desse gênero pode ocasionar infecções, com consequente morte do animal. Já, Azevedo (1993), associou a presença de *Mycoplasma* à mortalidade de berbigões (*Cerastoderma edule*) na região estuarina de Aveiro, em Portugal.

Para os seres humanos, entretanto, esse micro-organismo também é considerado potencialmente patogênico, podendo causar inflamações alérgicas, pneumonia, *diabetes mellitus* e esclerose múltipla (Razin, 1996).

Neste estudo, como já era esperado, não se encontrou correlação entre as variáveis ambientais analisadas e as bactérias prevalentes nas ostras. As análises de água foram realizadas pontualmente e apenas no momento da coleta das ostras, com o objetivo de serem usadas como um indicador da qualidade ambiental. Em ambientes extremamente variáveis como os que caracterizam as regiões estuarinas (Vilanova e Chaves, 1988), essas correlações demandariam uma frequência amostral muito maior para serem claramente estabelecidas. Ainda assim, foi identificada uma correlação significativa entre o pH e a presença de *Mycoplasma*, com redução do percentual deste micro-organismo em águas alcalinas. Pereira *et al.* (2009) afirmaram que o pH ótimo para o crescimento deste gênero de bactérias encontra-se entre 6,5 e 7,5,

havendo, portanto, tendência de diminuição da quantidade de *Mycoplasma* em pH acima de 7,5 (o pH máximo chegou a 8,4 nos pontos de coleta monitorados).

O segundo gênero mais prevalente, *Propionigenium*, ainda tem sua patogenicidade desconhecida tanto para ostras quanto para seres humanos. Encontrado no sedimento marinho (Janssen e Liesack, 1995), tem temperatura ótima de crescimento entre 30 a 37°C (Schink, 2006) e já foi identificado em abalones cultivados em Hokkaido, Japão (Tanaka *et al.*, 2004), em amostras de mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, coletados no lago Faro, Itália (Cappello *et al.*, 2015) e em urocordados marinhos (*Ciona intestinalis*) (Dishaw *et al.*, 2013).

O gênero *Psychrilyobacter*, presente em elevados percentuais nas amostras de Tibau do Sul-RN e Brejo Grande-SE, é encontrado no sedimento marinho e apresenta crescimento em baixas temperaturas (Zhao *et al.*, 2009). Entretanto, seu potencial patogênico para ostras e para os seres humanos ainda é desconhecido. No estudo realizado por Fernandez-Piquer *et al.* (2012), a ocorrência de *Psychrilyobacter* foi associada ao armazenamento das ostras pós-colheita, independente da temperatura utilizada durante este processo (entre 4 e 30°C).

Arcobacter esteve entre as bactérias mais predominantes do ponto amostral de Marcação/PB. Esse gênero está associado principalmente à contaminação fecal de águas marinhas e é considerado potencialmente patogênico para os seres humanos, por causar gastroenterite, endocardite, peritonite e diarreia, quando ingeridos (Collado e Figueras, 2011). Seu potencial patogênico para as ostras ainda é desconhecido.

Além de ambientes contaminados, *Arcobacter* já foi isolado em peixes, moluscos e naturalmente no ambiente aquático (Rathlavath *et al.*, 2016). Fernandez-Piquer *et al.* (2012) observaram elevada abundância, sem dominância, de *Arcobacter* na ostra *C. gigas*. Já, Romero *et al.* (2002), relataram que esse gênero é abundante e comum em ostras chilenas da espécie *Tiostrea chilensis*.

Os resultados obtidos neste estudo mostram a importância do sequenciamento genético de nova geração como ferramenta analítica em estudos e programas de monitoramento microbiológico de ostras. Evidenciam a elevada diversidade de bactérias existente no organismo das ostras cultivadas, com prevalência daquelas encontradas naturalmente no próprio ambiente ou em organismos

marinho/estuarinos. E, por fim, recomendam o monitoramento sistemático das bactérias do gênero *Mycoplasma* em ostras cultivadas e comercializadas na região Nordeste do Brasil. Atualmente, esse gênero não faz parte dos micro-organismos cuja análise e monitoramento são exigidos pela legislação brasileira durante o processo de produção e/ou de comercialização de ostras, apesar de ter sido o mais prevalente em todos os pontos amostrais e de apresentar potencial patogênico tanto para as ostras quanto para os consumidores.

3.7 REFERÊNCIAS

ANSA, E. J.; BASHIR, R. M. Fishery and culture potentials of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 392-394, 2007.

ANVISA. **Resolução-RDC Nº 12. SANITÁRIA**, A. N. D. V.: 37 p. 2001.

AZEVEDO, C. Occurrence of an unusual branchial *mycoplasma-like* infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 16, p. 55-59, 1993.

AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 75-81, 1991.

BRASIL. **Instrução Normativa Interministerial nº 07, 08/05/2012**. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. 2012.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4516-4522, 2011.

CAPPELLO, S. et al. Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) by a combination of 16s Crdna and 16s Rdna Sequencing. **JSM Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1016, 2015.

CHAUHAN, A. et al. Metagenomic assessment of the Eastern Oyster-associated microbiota. **Genomea**, v. 2, n. 5, 2014.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 174-192, 2011.

DAME, R. F. **Bivalve filter feeders: in estuarine and coastal ecosystem processes**. New York: 2012. 579.

DISHAW, L. et al. The gut of geographically disparate *Ciona intestinalis* harbors a core microbiota. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2013.

FDA, F. A. D. A. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 2011.

FERNANDEZ-PIQUER, J. et al. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 1134-1143, 2012.

FERNANDEZ, N. T. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, p. 69-83, 2014.

FRIEDMAN, C. S. et al. Investigation of the relationship between the presence of a Gram positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, v. 94, p. 1-15, 1991.

FUNO, I. C. S. A. et al. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 41, n. 4, p. 837-847, 2015.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v. 14, p. 1447-1461, 2004.

JANSSEN, P. H.; LIESACK, W. Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 29-35, 1995.

KACH, D.; WARD, J. E. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton size particles by suspension feeding molluscs. **Marine Biology**, v. 153, p. 797-805, 2008.

KALYOUSSEF, S.; FEJA, K. Foodborne Illnesses. **Advances in Pediatrics**, v. 61, p. 287-312, 2014.

KIM, Y.; POWELL, E. N. Relationships among parasites and pathologies in sentinel bivalves: NOAA status and trends "mussel watch" program. **Bulletin of marine science**, v. 79, n. 1, p. 83-112, 2006.

KING, G. M. et al. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.

KIRCHHOFF, H.; ROSENGARTEN, R. Isolation of a motile mycoplasma from fish. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 2439-2445, 1984.

LE ROUX, F. et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 251-258, 2002.

LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. **Staphylococcus: Occurrence and Properties**. França: 2016.

MADIGAN, T. L. et al. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiology**, v. 38, p. 219-227, 2014.

MELLO, G. L. Policultivo de ostras e camarões marinhos em viveiros de aquicultura. **FAEPE**, p. 23, 2007.

MORALES, J. **Acuicultura marina animal**. 1986.

NOCKER, A.; LEPO, J. E.; SNYDER, R. A. Influence of an oyster reef on development of the microbial heterotrophic community of an estuarine biofilm. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6834-6845, 2004.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F.; BORREGO, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 477-498, 2004.

PETROSINO, J. S. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 5856-5866, 2009.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

PRIEUR, D. et al. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanography and Marine Biology**, v. 28, p. 277-352, 1990.

RATHLAVATH, S. et al. Incidence of *Arcobacter* spp. in fresh seafood from retail markets in Mumbai, India. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 165-170, 2016.

RAZIN, S. Mycoplasmas. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. Texas, 1996.

RENAULT, T.; COCHENNEC, N. *Chlamydia-like organisms* in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 153-159, 1995.

ROMERO, J. et al. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 365-371, 2002.

SCHINK, B. The Genus *Propionigenium*. In: SPRINGER (Ed.). **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. New York, v.30, 2006. p.955-959.

TANAKA, R. et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. **Aquaculture**, v. 241, p. 453-463, 2004.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 31-41, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Doenças microbianas da pele e dos olhos**. Rio Grande do Sul: 2012. 967.

TRABAL, N. et al. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 555-569, 2012.

VILANOVA, M. F. V.; CHAVES, E. M. B. Contribuição para o conhecimento da viabilidade do cultivo de ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca:Bivalvia), no estuário do rio Ceará, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciência Marinha**, v. 27, p. 111-125, 1988.

WEGNER, K. M. et al. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.

ZHAO, J.; MANNO, D.; HAWARI, J. *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum Fusobacteria that produces H₂ and degrades nitramine explosives under low temperature conditions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 491-497, 2009.

4 CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO METAGENÔMICA DOS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A MICROBIOTA BACTERIANA DE OSTRAS *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

METAGENOMIC EVALUATION THE EFFECTS OF STORAGE CONDITIONS ON OYSTER
Crassostrea gasar (ADANSON, 1757) BACTERIAL POPULATION

4.1 RESUMO

Ostras são organismos usualmente comercializados e até consumidos vivos. Após a despesca podem ocorrer alterações na microbiota bacteriana normal desses animais devido às condições de seu armazenamento e influenciadas por fatores como a temperatura ambiente e o tempo de estocagem. Essas alterações, por sua vez, podem afetar a qualidade sanitária do produto. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência das condições de armazenamento sobre a microbiota bacteriana de ostras vivas. As ostras utilizadas neste estudo eram provenientes de fazendas marinhas localizadas na baía de Guaratuba, Paraná, Brasil e foram expostas a dois tratamentos que simularam distintas condições de armazenamento (imersão em água e exposição ao ar). Ambos os tratamentos foram submetidos a cinco temperaturas, entre 5 e 25°C, durante 10 dias. Realizou-se a amplificação/sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras coletadas dessas ostras, estabeleceram-se as unidades taxonômicas e realizou-se o mapeamento das linhagens bacterianas presentes nas amostras. As ostras imersas em água apresentaram maior quantidade de bactérias (163 gêneros) quando comparadas àquelas expostas ao ar (104 gêneros). Ao todo, foram identificados 59 gêneros bacterianos potencialmente patogênicos para os seres humanos (n=56 nas ostras imersas em água e n=45 nas expostas ao ar). Concluiu-se que as condições de armazenamento influenciaram diretamente a microbiota das ostras. Os resultados obtidos recomendam que durante a fase de armazenamento e comercialização, as ostras vivas sejam expostas ao ar entre 5 e 25°C, em substituição a técnica de imersão em água, por ser esse um método mais eficaz, especialmente por apresentar menor prevalência de bactérias patogênicas para os seres humanos.

Palavras-chave: temperatura; exposição ao ar; imersão em água; metagenômica.

4.2 ABSTRACT

Oysters are organisms usually sell and even eaten alive. After the expense, alterations in the normal bacterial population of these animals can occur due modifications of the environmental temperature and time of storage duration. Hence, these changes may affect the sanitary quality of the product. Thus, we evaluate the influence of storage conditions on a bacterial population of live oysters. The oysters used in this study originated from marine farms located in the bay of Guaratuba, Paraná, Brazil. Oysters were exposed in two treatments that simulated different storage conditions (water immersion and air exposure). Both treatments were submitted to five temperatures (5 to 25 °C) during 10 days. The 16S rRNA gene amplification and sequencing was performed on samples collected every two days. The results were used to identify taxonomic units of classification and mapping of the bacterial lineage present in the samples. Oysters immersed in water present higher quantities of bacteria (163 genera) when compared to those exposures to air (104 genera). A total of 59 potentially pathogenic to human bacterial genera were identified (water immersion [n=56]; air

exposure [n=45]). We observed that the storage conditions caused a direct influence on the bacterial population of the oysters. The obtained results suggest that live oysters should be air exposed (5 to 25 °C) instead of been immersed in water during storage and commercialization phase, due a lower prevalence of pathogenic bacteria.

Keywords: temperature; air exposure; immersion in water; metagenomic.

4.3 INTRODUÇÃO

As ostras estão entre os moluscos bivalves mais cultivados e comercializados no mundo (Fernandez *et al.*, 2014). Sua comercialização e até o consumo são, na maioria das vezes, realizados com o animal vivo e, seu armazenamento pode se estender por vários dias após a despesca (Aaraas *et al.*, 2004; Jiménez-Ruiz, Márquez-Ríos, Cárdenas-López, Montoya-Camacho, Castilloyáñez, *et al.*, 2015).

Por serem animais filtradores, as ostras retêm micro-organismos durante o processo de alimentação (Wang *et al.*, 2014). Quando expostas ao ar, elas fecham suas valvas e, como consequência, há diminuição dos níveis de oxigênio, alteração do pH e acúmulo de resíduos no líquido intervalvar, ocasionando alterações da microbiota bacteriana (Cook, 1991).

Desta forma, a composição microbiana e as taxas de decomposição de ostras mortas são diretamente influenciadas pela microbiota normal (residente ou transitória) e pelas condições de armazenamento e de manuseio dos animais (Fernandez-Piquer *et al.*, 2012).

Durante o armazenamento das ostras vivas, dependendo da temperatura e do tempo, pode haver predominância de algumas espécies de bactérias, tais como *Vibrio*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e *Corynebacterium* (Cao *et al.*, 2009). Tais micro-organismos podem induzir a deterioração da carne e afetar a qualidade do produto (Chen *et al.*, 2013).

Pelo fato desses animais geralmente serem consumidos inteiros e *in natura*, bactérias potencialmente patogênicas podem ser ingeridas e causar doenças ao consumidor (Cruz-Romero *et al.*, 2008). Porém, a identificação da microbiota bacteriana e de bactérias potencialmente patogênicas nas ostras comercializadas não

é viável por métodos tradicionais, aqueles baseados em meios de cultura seletivos (Fernandez-Piquer *et al.*, 2012) e em provas bioquímicas. Por este motivo, protocolos que não utilizam crescimento em meios de cultura têm sido desenvolvidos para aumentar a agilidade e a acurácia das análises (Postollec *et al.*, 2011).

A metagenômica é um método que permite que comunidades microbianas coletadas diretamente do ambiente ou de amostras biológicas sejam completamente caracterizadas sem a necessidade de isolar e cultivar bactérias específicas (Tringe e Rubin, 2005). Esse método baseia-se em bibliotecas de genes 16S rRNA, que são identificadas a partir do sequenciamento de nova geração e permitem o mapeamento completo das bactérias contidas nos bivalves avaliados (Hernández-Zárate e Olmos-Soto, 2006).

Esse trabalho teve por objetivo utilizar o sequenciamento de nova geração para avaliar a influência de dois métodos de armazenamento (sob imersão em água ou exposição ao ar) sobre a microbiota bacteriana de ostras vivas.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção dos animais

Foram utilizadas ostras da espécie *Crassostrea gasar* (n=216), com peso médio de $79,3 \pm 22,3$ g e altura média de $8,3 \pm 1,3$ cm. Os espécimes foram provenientes de fazendas marinhas situadas na baía de Guaratuba (Lat. 25°83'S, Long. 48°57'W), litoral do estado do Paraná, Brasil.

No momento da retirada dos animais da água foi mensurada a salinidade (UPS) da água do cultivo com um refratômetro (Instrutemp®, Brasil). Logo após a coleta, os animais tiveram suas conchas lavadas externamente com escovas de cerdas plásticas estéreis, para remoção de sedimento e epibiontes. Em caixas isotérmicas (15 a 20°C), foram transportadas até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil (Lat. 25°24'47.70"S, Long. 49°14'52.82"O).

4.4.2 Experimentação

As ostras não passaram por nenhum processo de aclimação e não tiveram acesso a qualquer alimento durante o período experimental.

Foram definidos dois tratamentos que simulassem as condições de armazenamento de ostras vivas mais utilizadas na cadeia de comercialização:

- (I) Ostras imersas em água salobra com a mesma salinidade registrada na água de cultivo no momento de sua retirada (25UPS). A renovação da água era diária e equivalente a 100% do volume estocado. A água era previamente clorada (hipoclorito de sódio 10%) e neutralizada (tiosulfato de sódio 50%).
- (II) Ostras expostas ao ar com umidade (medida com um higrômetro Incoterm 7666), mantidas em 27%, durante todo o período experimental.

Os dois tratamentos foram realizados em triplicata e submetidos a cinco temperaturas (5, 10, 15, 20 e 25°C) em estufas do tipo B.O.D., com temperatura controlada, durante 10 dias. As temperaturas de exposição foram definidas após a realização de um teste piloto, que determinou a melhor faixa de sobrevivência entre 0 e 35°C.

Antes do início do experimento, foram coletadas seis ostras de cada tratamento para a determinação da microbiota bacteriana inicial (controle). Posteriormente, grupos de 30 ostras foram colocados em 15 unidades experimentais (n=900). Cada unidade era composta por uma bandeja plástica contendo 5 L de água na salinidade 25 UPS (tratamento I) ou uma bandeja plástica sem água (tratamento II).

De cada unidade experimental, nos dias 2, 4, 6, 8 e 10, foram retiradas seis ostras para avaliação microbiológica (n=90/tratamento).

As unidades experimentais eram inspecionadas três vezes ao dia, os animais mortos eram registrados e descartados. Foram consideradas mortas as ostras que apresentaram valvas abertas e que não demonstravam nenhuma reação a uma leve batida em sua concha utilizando um objeto sólido, como a concha de outra ostra, por exemplo.

4.4.3 Extração de DNA

Nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10, seis ostras de cada unidade experimental foram coletadas e tiveram suas valvas abertas para a retirada da carne e do líquido intervalvar. Este material foi colocado em sacos plásticos estéreis, macerado e uma alíquota de 200 µL retirada e armazenada em frascos *Eppendorf* para extração do DNA total pelo kit de DNA Genomic Purelink® (Invitrogen, EUA).

Após a extração, avaliou-se a qualidade e a quantidade do DNA total por espectrofotometria, com leituras em 260 nm e 280 nm de absorbância, utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®, USA).

Todas as análises foram realizadas baseando-se na metodologia proposta por Caporaso *et al.* (2011), com adaptações. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com uma PCR das amostras em um sistema de 10 µL, contendo 5 µL de DNA (10 ng/L), 1 µL de primer universal (515F/806r), 1 µL de primer “adaptador” e 5 µL da enzima KlenTaq DV Readymix. Os níveis de expressão gênica do gene 16S rRNA foram analisados em um termociclador (Veriti 96 well Applied Biosystems®, USA), com as reações realizadas a 94°C por 3 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido do processo de amplificação de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos para a desnaturação final; 50°C durante 30 segundos para o anelamento; 68°C durante 1 minuto para a extensão inicial e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Após esta etapa, as amostras foram mantidas entre 0 e 4°C.

Para a confirmação da amplificação gênica, as amostras foram testadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). No gel, foram aplicados 3 µL da mistura feita com 2 µL de amostra e 2 µL de corante FSUDS (azul de bromofenol). Após, foi realizada a corrida eletroforética das amostras em gel (uma hora) em voltagem constante de 70 volts na presença de tampão TBE 1X. Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel 3 µL de marcador de peso molecular 1 Kb. O gel foi corado com brometo de etídio (1%) (15 minutos), lavado em água (10 minutos) e visualizado em uma câmara UVP 3UV Transilluminator Imaging System.

O sequenciamento das amostras foi realizado na plataforma Illumina MiSeq®, de nova geração, capaz de gerar informações sobre milhares de pares de bases em

uma única corrida. O kit utilizado para o sequenciamento das amostras foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle), *pair end*.

4.4.4 Análise de dados

As sequências do gene 16S rRNA geradas pelo sequenciamento foram analisadas de acordo com o protocolo do programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Qiiime[®]), desenvolvido por Caporaso *et al.* (2010).

As análises de diversidade de Shannon-Winner e de dominância foram realizadas com o software Past, versão 2.17.

Os resultados obtidos nas análises genéticas foram também tabelados, ordenados e classificados segundo a sua prevalência. Estabeleceu-se como critério de análise que os gêneros prevalentes seriam aqueles encontrados em quantidades iguais ou superiores a 5% em cada amostra analisada.

Para avaliar a diferença entre os tratamentos de imersão em água e exposição ao ar, foi aplicado o teste de Mann-Whitney entre duas variáveis independentes. Já, a avaliação dos diferentes tempos de exposição e das diferentes temperaturas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Em ambos os casos, as análises dos dados foram realizadas com o software Statistica 10.0 (StatSoft[®]).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Mortalidade

Durante toda a fase experimental, em ambos os tratamentos houve mortalidade de ostras, o que impossibilitou a análise da microbiota bacteriana após seis dias de exposição ao tratamento I para as temperaturas 5, 10 e 25°C e para as ostras expostas ao tratamento II nas temperaturas 10 e 25°C, assim como, após oito dias para a temperatura de 5°C (Tabela 13).

Tabela 13: Tempo de sobrevivência (dias) e número de ostras analisadas durante todo o período de exposição aos diferentes tratamentos.

Temperatura (°C)	Tempo de sobrevivência (dias)	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
5	6 (n=54)	8 (n=72)
10	6 (n=54)	6 (n=54)
15	10 (n=90)	10 (n=90)
20	10 (n=90)	10 (n=90)
25	6 (n=54)	1 (n=54)

4.5.2 Microbiota bacteriana

Foram identificados 169 gêneros de bactérias, pertencentes a 133 famílias, 77 ordens, 44 classes e 22 filos. As ostras do tratamento I apresentaram um número mais elevado de bactérias quando comparadas àquelas do tratamento II (Tabela 14).

Os filos de maior prevalência em ambos os tratamentos foram Proteobacteria, Tenericutes, Spirochaetes e Bacteroidetes.

Tabela 14: Quantidade de categorias taxonômicas identificada nos diferentes tratamentos.

Categorias taxonômicas	Quantidade	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
Filo	20	17
Classe	43	31
Ordem	75	57
Família	127	93
Gênero	163	104

Ao todo foram identificadas 59 bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos, sendo 56 nas ostras do tratamento I e 45 nas ostras do tratamento II. Entre tais bactérias, oito podem ser consideradas causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Tabela 15).

Observou-se também, um grande percentual de sequências do gene 16S (por exemplo: BD2-6, WH1-8, SC3-56) de bactérias ainda sem identificação específica, sendo aqui consideradas como “não classificadas”. Bactérias que não foram adequadamente identificadas pelo método, foram consideradas “indefinidas”.

Tabela 15: Percentual médio de filos e gêneros bacterianos identificados em ostras expostas a diferentes temperaturas, imersas (tratamento I) ou não em água (tratamento II). * Gêneros com espécies potencialmente patogênicas para os seres humanos; ** Gêneros com espécies causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos.

Filó/Gênero	Percentual médio		Filó/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)		Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
Acidobacteria	0,2	0,1	<i>Capnocytophaga*</i>	0,1	0,0
<i>Candidatus Solibacter</i>	0,1	0,0	<i>Chitinophaga*</i>	0,5	0,0
Indefinido	0,2	0,1	<i>Chryseobacterium*</i>	0,2	0,3
Actinobacteria	0,2	0,1	<i>Cloacibacterium*</i>	0,3	0,3
<i>Brevibacterium</i>	0,1	0,1	<i>Crocinitomix</i>	0,2	0,2
<i>Corynebacterium*</i>	0,1	0,1	<i>Dyadobacter</i>	0,1	0,0
<i>Iamia</i>	0,1	0,0	<i>Flavobacterium**</i>	0,6	0,6
<i>Micrococcus</i>	0,0	0,1	<i>Flexibacter</i>	0,1	0,2
<i>Mycobacterium*</i>	0,1	0,0	<i>Fluviicola</i>	0,3	0,2
<i>Pseudonocardia</i>	0,1	0,0	<i>Gaetbulibacter</i>	0,2	0,1
<i>Rubrobacter</i>	0,1	0,0	<i>Gramella</i>	0,1	0,1
<i>Sporichthya</i>	0,2	0,0	<i>Kordia</i>	0,3	0,3
<i>Williamsia*</i>	0,1	0,1	<i>Leadbetterella</i>	0,1	0,1
Indefinido	0,2	0,1	<i>Lewinella</i>	0,2	0,0
Armatimonadetes	0,5	0,0	<i>Maribacter</i>	0,2	0,1
<i>Fimbriimonas</i>	0,5	0,0	<i>Mesonina</i>	0,1	0,1
Bacteroidetes	0,8	1,3	<i>Owenweeksia</i>	0,2	0,2
<i>Aquimarina</i>	0,2	0,3	<i>Paludibacter</i>	0,7	0,6
<i>Arenibacter</i>	0,1	0,1	<i>Pedobacter</i>	0,2	0,1
<i>Bacteroides*</i>	0,3	2,8	<i>Persicobacter</i>	1,5	0,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Polaribacter</i>	0,2	0,2
<i>Psychroserpens</i>	0,1	0,1
<i>Reichenbachiella</i>	0,1	0,0
<i>Roseivirga</i>	0,3	0,3
<i>Saprospira</i>	0,3	0,3
<i>Sediminibacterium</i>	2,0	0,0
<i>Tenacibaculum</i>	0,1	0,2
<i>Wautersiella*</i>	0,3	0,6
<i>Winogradskyella</i>	0,2	0,3
Indefinido	1,2	1,8
Caldithrix	0,1	0,0
Indefinido	0,1	0,0
Chlamydiae	0,2	0,1
<i>Candidatus Rhabdochlamydia</i>	0,1	0,0
Indefinido	0,2	0,1
Chlorobi	0,3	0,1
Indefinido	0,3	0,1
Chloroflexi	0,1	0,1
Indefinido	0,1	0,1
Crenarchaeota	0,7	0,1
<i>Nitrosopumilus</i>	0,1	0,1
Indefinido	1,8	0,0
Cyanobacteria	1,4	4,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Chlamydomonas</i>	5,7	0,0
<i>Cyanobacterium*</i>	0,0	0,1
<i>Synechococcus</i>	0,2	0,2
Indefinido	1,3	5,5
Elusimicrobia	0,4	0,0
Indefinido	0,4	0,0
Euryarchaeota	0,3	0,0
Indefinido	0,3	0,0
Fibrobacteres	0,0	0,1
Indefinido	0,0	0,1
Firmicutes	0,3	0,4
<i>Acidaminococcus*</i>	0,1	0,3
<i>Alkaliphilus</i>	0,3	0,0
<i>Anaerococcus*</i>	0,1	0,1
<i>Brochothrix</i>	0,1	0,1
<i>Clostridium**</i>	0,3	0,1
<i>Finegoldia*</i>	0,1	0,0
<i>Fusibacter</i>	0,4	0,5
<i>Lactobacillus*</i>	0,2	0,2
<i>Lactococcus*</i>	0,0	0,1
<i>Leuconostoc*</i>	0,3	0,3
<i>Peptoniphilus*</i>	0,1	0,0
<i>Sedimentibacter</i>	0,5	0,5

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Staphylococcus</i> * *	0,1	0,1
<i>Streptococcus</i> *	0,2	0,1
<i>Tepidibacter</i>	0,0	0,1
Indefinido	0,2	0,5
Não classificada	0,2	0,3
Fusobacteria	2,4	1,7
<i>Cetobacterium</i> *	0,1	0,1
<i>Fusobacterium</i> *	0,3	2,2
<i>Propionigenium</i>	1,5	0,6
<i>Psychrilyobacter</i>	4,1	2,4
Indefinido	0,1	0,1
Gemmatimonadetes	0,0	0,1
Indefinido	0,0	0,1
Lentisphaerae	0,1	0,0
Indefinido	0,1	0,0
Planctomycetes	0,1	0,3
<i>Gemmata</i>	0,1	0,0
<i>Planctomyces</i> *	0,1	0,1
Indefinido	0,1	0,3
Proteobacteria	1,4	2,6
<i>Achromobacter</i> *	0,1	0,1
<i>Acinetobacter</i> *	0,2	0,3
<i>Agrobacterium</i> *	0,8	0,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Aliivibrio</i> *	4,6	9,5
<i>Alteromonas</i> **	0,3	0,1
<i>Amphritea</i>	0,2	0,1
<i>Arcobacter</i> **	18,0	24,9
<i>Arthrosira</i>	2,3	0,0
<i>Asticcacaulis</i>	0,3	0,0
<i>Azospirillum</i>	0,2	0,2
<i>Bacteriovorax</i>	0,1	0,1
<i>Bdellovibrio</i>	0,6	0,1
<i>Bradyrhizobium</i>	0,8	0,0
<i>Burkholderia</i>	0,3	0,5
<i>Cellvibrio</i>	1,1	0,0
<i>Cohaesibacter</i>	0,1	0,0
<i>Comamonas</i> *	0,1	0,0
<i>Cupriavidus</i> *	2,1	1,3
<i>Desulfarculus</i>	0,1	0,0
<i>Desulfobacter</i>	0,1	0,0
<i>Desulfococcus</i>	0,2	0,1
<i>Desulfofrigus</i>	0,3	0,5
<i>Desulfosarcina</i> *	0,1	0,0
<i>Desulfovibrio</i> *	0,2	0,2
<i>Devosia</i>	0,2	0,0
<i>Dokdonella</i>	0,2	0,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Enhydrobacter</i> *	0,0	0,1
<i>Erythrobacter</i>	0,1	0,0
<i>Ferrimonas</i>	0,1	0,1
<i>Francisella</i> *	0,1	0,0
<i>Glaciecola</i>	0,1	0,0
<i>Helicobacter</i> *	0,2	0,2
<i>Hylemonella</i>	1,2	0,0
<i>Hyphomicrobium</i>	0,1	0,0
<i>Janthinobacterium</i> *	0,2	0,2
<i>Kaistia</i>	0,1	0,0
<i>Kaistobacter</i>	0,4	0,0
<i>Leucothrix</i>	0,3	0,2
<i>Magnetospirillum</i>	0,1	0,0
<i>Marinicella</i>	0,1	0,1
<i>Marinobacter</i>	0,2	0,1
<i>Marinobacterium</i>	0,1	0,1
<i>Marinomonas</i> *	0,3	0,3
<i>Marivita</i>	0,4	0,0
<i>Massilia</i> *	0,2	0,0
<i>Mesorhizobium</i>	0,3	0,0
<i>Methylibium</i>	1,0	0,0
<i>Methylobacterium</i> *	0,2	0,2
<i>Methylophaga</i>	0,1	0,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Methylothera</i>	0,1	0,0
<i>Moritella</i>	0,3	0,4
<i>Mycoplana</i>	0,1	0,1
<i>Neorickettsia</i>	1,7	0,0
<i>Neptunomonas</i>	0,4	0,4
<i>Nevskia</i>	0,7	0,0
<i>Novosphingobium</i> *	1,8	0,0
<i>Oceanospirillum</i> *	0,3	0,1
<i>Oleibacter</i>	0,2	0,4
<i>Oleispira</i>	0,1	0,1
<i>Pedomicrobium</i>	0,1	0,1
<i>Perlucidibaca</i>	0,1	0,0
<i>Phaeobacter</i>	1,3	0,3
<i>Photobacterium</i> *	0,9	0,7
<i>Plesiocystis</i>	0,3	0,0
<i>Pseudidiomarina</i>	0,2	0,0
<i>Pseudoalteromonas</i> *	2,6	1,5
<i>Pseudomonas</i> * *	0,3	0,2
<i>Psychrobacter</i> *	0,3	0,3
<i>Psychromonas</i>	0,2	0,2
<i>Ralstonia</i> *	0,3	0,0
<i>Ramlibacter</i>	0,2	0,0
<i>Rhizobium</i> *	0,2	0,0

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
<i>Rhodobacter</i>	0,6	0,0
<i>Rhodoplanes</i> *	0,2	0,0
<i>Roseateles</i>	0,5	0,1
<i>Salinispora</i>	0,1	0,0
<i>Shewanella</i> *	2,4	2,8
<i>Sphingobium</i>	0,1	0,1
<i>Sphingomonas</i> * *	0,2	0,1
<i>Sphingopyxis</i>	0,2	0,1
<i>Spongiibacter</i>	0,1	0,0
<i>Stenotrophomonas</i> *	0,1	0,1
<i>Sulfurimonas</i>	0,3	0,1
<i>Sulfurospirillum</i>	0,1	0,2
<i>Thalassomonas</i>	0,2	0,1
<i>Thalassospira</i> *	0,2	0,1
<i>Vibrio</i> **	0,4	0,5
<i>Xanthobacter</i>	0,2	0,2
<i>Zoogloea</i>	0,2	0,0
Indefinido	1,0	1,3
Não classificada	0,4	0,2
Spirochaetes	4,7	3,1
<i>Borrelia</i> *	0,9	1,0
<i>Spirochaeta</i> *	0,1	0,1
Indefinido	6,1	3,8

Filo/Gênero	Percentual médio	
	Tratamento I (Imersão em água)	Tratamento II (Exposição ao ar)
Tenericutes	8,2	10,1
<i>Acholeplasma</i> *	0,2	0,2
<i>Mycoplasma</i> *	10,9	13,1
Indefinido	0,5	0,5
Verrucomicrobia	0,4	0,1
<i>Candidatus Xiphiematomobacter</i>	0,1	0,0
<i>Chthoniobacter</i>	0,7	0,0
<i>Coralimargarita</i>	0,0	0,1
<i>Opitutus</i>	0,5	0,0
<i>Pedospira</i>	0,9	0,0
<i>Persicirhabdus</i>	0,1	0,1
<i>Prostheobacter</i>	0,6	0,0
Indefinido	0,4	0,1
Não classificada	0,3	0,4
Indefinido	0,3	0,4
Indefinido	3,0	2,9
Indefinido	3,0	2,9

Ao avaliar os gêneros bacterianos identificados durante o período experimental, foi possível observar que houve uma redução entre o início e o final da exposição ao ar (tratamento II), nas temperaturas avaliadas. Já, nas ostras do tratamento I, o número de gêneros identificados ao final do experimento foi maior em relação ao início que nas temperaturas 10 e 20°C.

Em relação ao índice de Shannon-Winner, no tratamento II a diversidade de gêneros foi maior no final do experimento em todas as temperaturas, com exceção de 20°C, na qual houve redução. Para as ostras do tratamento I, entretanto, houve aumento da diversidade nas diferentes temperaturas, exceto à 15°C.

A dominância de gêneros dentro das amostras expostas ao ar (tratamento II) se mostrou elevada para a temperatura 20°C no final do experimento (10 dias). Já, para as amostras do tratamento I, a temperatura de 15°C apresentou índices de dominância mais elevados no 10º dia.

No dia 0 as ostras expostas nos dois tratamentos a 5°C não foram analisadas, devido ao baixo número de leituras das sequências do gene 16S rRNA. Assim como, das ostras imersas em água por 6 dias, na temperatura de 25°C (Tabela 16).

Tabela 16: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner no início (dia 0) e no final do experimento para as amostras de ostras expostas aos diferentes tratamentos.

Índice	Temperatura	Tratamento			
		I (Imersão em água)		II (Exposição ao ar)	
		Início	Final	Início	Final
N° de gêneros	5	NA	18 (6 dias)	NA	18 (8 dias)
	10	38 (dia 0)	30 (6 dias)	38 (dia 0)	12 (6 dias)
	15	20 (dia 0)	27 (10 dias)	20 (dia 0)	19 (10 dias)
	20	40 (dia 0)	47 (10 dias)	40 (dia 0)	12 (10 dias)
	25	27 (dia 0)	NA	27 (dia 0)	12 (6 dias)
Shannon-Winner	5	NA	1,81 (6 dias)	NA	1,30 (8 dias)
	10	1,66 (dia 0)	2,15 (6 dias)	1,66 (dia 0)	1,75 (6 dias)
	15	1,46 (dia 0)	1,09 (10 dias)	1,46 (dia 0)	1,93 (10 dias)
	20	2,35 (dia 0)	2,46 (10 dias)	2,35 (dia 0)	0,62 (10 dias)
	25	1,23 (dia 0)	NA	1,23 (dia 0)	1,30 (6 dias)
Dominância	5	NA	0,22 (6 dias)	NA	0,44 (8 dias)
	10	0,41 (dia 0)	0,17 (6 dias)	0,41 (dia 0)	0,25 (6 dias)
	15	0,40 (dia 0)	0,62 (10 dias)	0,40 (dia 0)	0,25 (10 dias)

Índice	Temperatura	Tratamento			
		I (Imersão em água)		II (Exposição ao ar)	
		Início	Final	Início	Final
	20	0,19 (dia 0)	0,16 (10 dias)	0,19 (dia 0)	0,76 (10 dias)
	25	0,54 (dia 0)	NA	0,54 (dia 0)	0,36 (6 dias)

NA: não analisado, devido ao baixo número de leituras das sequências do gene 16S rRNA.

Dentre todos os gêneros de bactérias identificados, 13 estiveram entre os mais prevalentes nas ostras (presentes em percentagem igual ou superior a 5% em cada amostra analisada) (Figura 9).

O percentual dos gêneros *Arcobacter*, *Mycoplasma* e *Aliivibrio* foi maior em ostras do tratamento II, sendo *Bacteroides* e *Fusobacterium* encontradas exclusivamente neste tratamento.

Já, nas ostras do tratamento I, *Arcobacter*, *Mycoplasma*, *Allivibrio*, *Psychrilyobacter*, *Shewanella* e *Pseudoalteromonas* foram os mais prevalentes. Os gêneros *Chlamydomonas*, *Photobacterium*, *Phaeobacter* e *Propionigenium* foram encontrados exclusivamente neste tratamento. A prevalência de *Cupriavidus* foi semelhante em ambos os tratamentos.

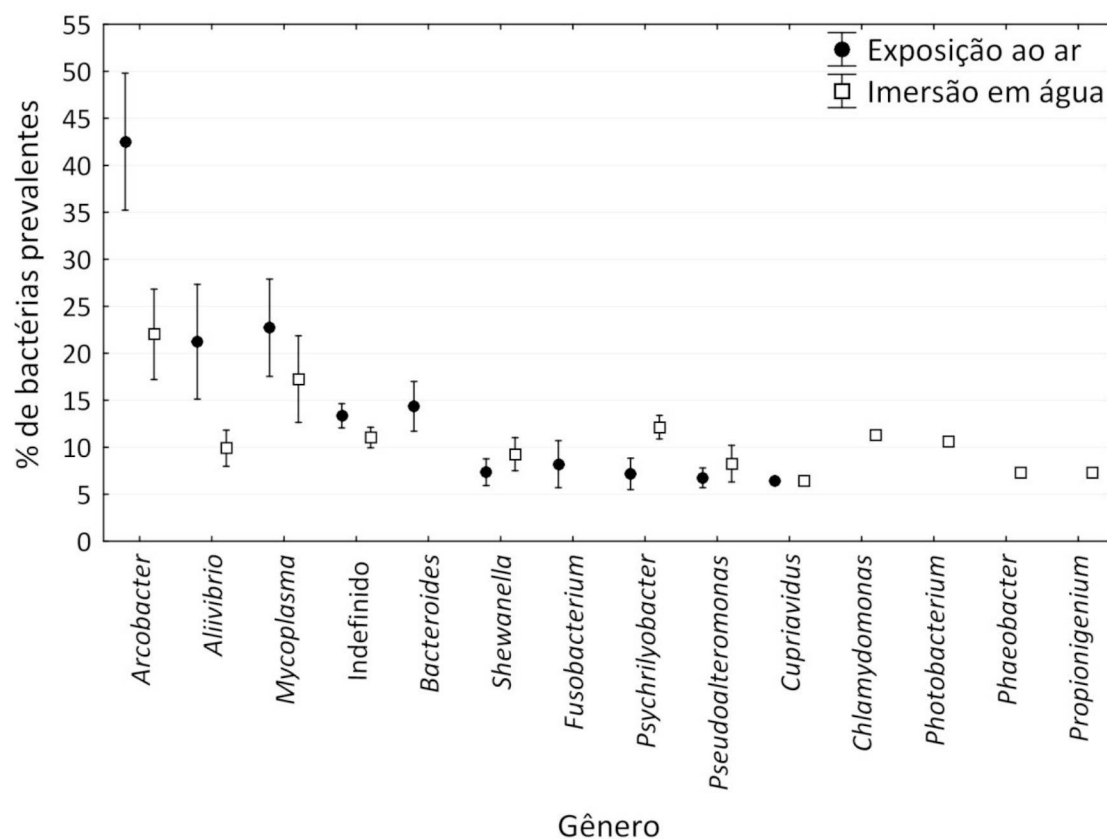


Figura 9: Média e erro padrão dos gêneros bacterianos prevalentes ($\geq 5\%$), em %, nas amostras de ostras expostas aos tratamentos de imersão em água (tratamento I) e exposição ao ar (tratamento II).

Foi observada diferença significativa de bactérias prevalentes entre os tratamentos I e II ($p = 0,037$). Já, os tempos de exposição e as diferentes temperaturas não apresentaram influência sobre a prevalência de bactérias ($p > 0,05$).

Houve tendência de elevação do percentual de bactérias prevalentes durante o experimento nas ostras do tratamento I, principalmente em temperaturas inferiores a 15°C . Já nas ostras do tratamento II, essa tendência de aumento ocorreu nas temperaturas acima de 15°C (Figura 10).

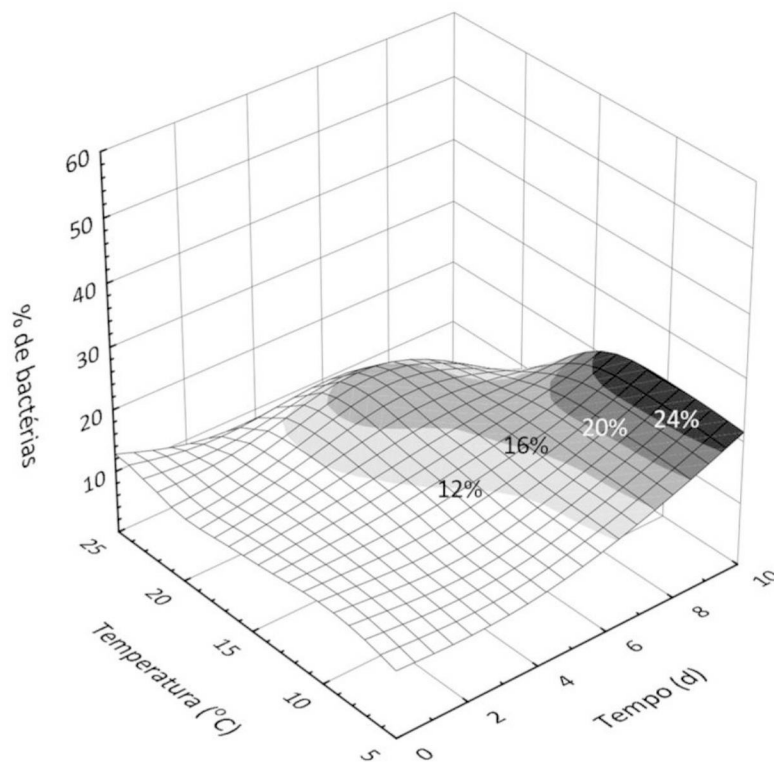
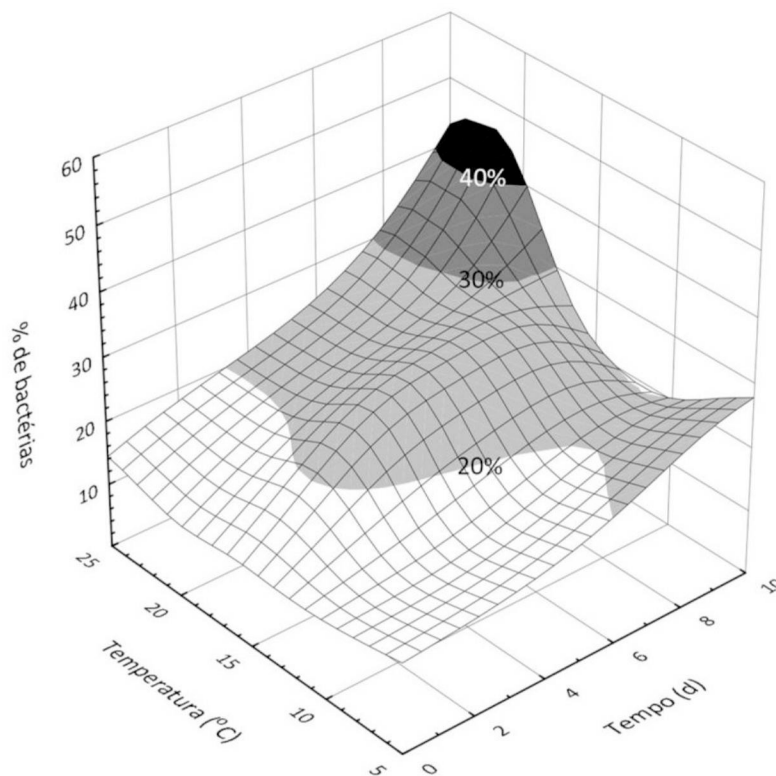
A**B**

Figura 10: Percentual de bactérias prevalentes identificado em cada tempo analisado para as diferentes temperaturas de exposição. (A) Tratamento de imersão em água (I) e (B) tratamento de exposição ao ar (II).

4.6 DISCUSSÃO

O sequenciamento do gene 16S rRNA com o propósito de avaliar a influência de duas condições de armazenamento sobre a microbiota bacteriana de ostras vivas está sendo realizado, a partir deste estudo, pela primeira vez no Brasil. Um estudo bastante semelhante foi realizado por Fernandez-Piquer *et al.* (2012), na Tasmânia, Austrália, utilizando *Crassostrea gigas*. No trabalho, os autores relataram que métodos tradicionais de cultura não são eficazes para o estabelecimento das linhagens bacterianas, demonstrando a importância da utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração para a avaliação da microbiota bacteriana de ostras.

No presente caso, a mortalidade de ostras nas temperaturas de 5, 10 e 25°C ocorreu após seis dias de exposição aos respectivos tratamentos. Sugere-se, desta forma, que *C. gasar* não tolere, nas demais condições metodológicas aqui empregadas, o armazenamento em temperaturas inferiores a 10°C ou superiores a 25°C após seis dias, seja imersas em água ou expostas ao ar. Em contrapartida, Seaman (1991) relatou que a ostra *C. gigas* sobrevivem durante mais tempo quando armazenadas imersas em água do que expostas ao ar. Em contraposição, Moreira *et al.* (2017) verificaram que a exposição de ostras *C. brasiliiana* (sinonímia de *C. gasar*) em tanques com 10 L de água na salinidade 29 e com temperatura de 24°C não ocasionava mortalidade durante um período de 28 dias. Enquanto Zhang *et al.* (2006), relataram semelhante tolerância à temperatura por *C. gigas* expostas ao ar, em que as mortalidades se elevavam em temperaturas abaixo de 5°C e acima de 25°C.

Os filos identificados com maior prevalência em ambos os tratamentos foram Proteobacteria, Tenericutes, Spirochaetes e Bacteroidetes. Fernandez-Piquer *et al.* (2012) ao avaliarem a microbiota bacteriana de ostras *C. gigas* pós colheita em diferentes temperaturas (4, 6, 15, 20 e 30°C), observaram que o filo Proteobacteria foi predominante nas ostras recém despescadas, entretanto, após o armazenamento (expostas ao ar) o filo Fusobacteria tornou-se dominante nas ostras mantidas a 4°C após oito dias e Bacteroidetes nas ostras mantidas a 15 (4 dias) e 30°C (1 dia).

Dentre todas as bactérias identificadas, *Arcobacter* foi uma das mais prevalentes nos dois tratamentos. Esse gênero é encontrado naturalmente em ambientes contaminados por fezes humanas e pode causar DTA (gastroenterite, endocardite, peritonite e diarreia) (Collado e Figueras, 2011). Esse gênero já foi encontrado na microbiota normal da ostra chilena (*Triostrea chilensis*) por Cruz-Romero *et al.* (2008). Já, Fernandez-Piquer *et al.* (2012), observaram a presença deste gênero em *C. gigas* mantidas entre 4 e 30°C.

O segundo gênero mais prevalente nas ostras de ambos os tratamentos foi *Mycoplasma*. Ele é geralmente encontrado na microbiota normal da ostra e pode ser potencialmente patogênicos para os seres humanos, causando inflamações alérgicas, pneumonia, diabetes mellitus e esclerose múltipla (Razin, 1996). Segundo Jaffe *et al.* (2004), as temperaturas ótimas de crescimento desse gênero variam entre 20 e 37°C, dependendo da espécie.

O gênero *Aliivibrio*, presente em altos percentuais nas ostras de ambos os tratamentos é natural de ambientes marinhos. Este gênero foi descrito recentemente e inclui espécies que antes faziam parte do gênero *Vibrio* (Urbanczyk *et al.*, 2007). Hjerde *et al.* (2008) relataram que a sua presença pode representar patogenicidade para peixes, porém para moluscos bivalves e para os seres humanos isso ainda é desconhecido.

Dentre as bactérias patogênicas encontradas nas ostras, somente *Staphylococcus*, presente em baixo percentual e sem a confirmação de se tratar de coagulase positiva ou negativa, é listada na Resolução RDC n. 12, de janeiro de 2001 (Anvisa, 2001). A presença de *Staphylococcus* nas ostras geralmente está associada à contaminação durante a manipulação, podendo causar bacteremia, endocardite e infecções cutâneas (Tong *et al.*, 2015).

Além de *Staphylococcus*, em ambos os tratamentos foram identificadas outras bactérias causadoras de DTA (*Arcobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Sphingomonas*, *Vibrio* e *Alteromonas*). A presença dessas bactérias em ostras pode ocasionar riscos à saúde do consumidor. Sugere-se, desta forma, o monitoramento da ocorrência e prevalência dessas bactérias, de forma a garantir qualidade do produto vendido e a segurança alimentar do consumidor.

As ostras expostas ao tratamento I apresentaram maior número de gêneros bacterianos, maior diversidade e menor dominância de gêneros. Além disso, as bactérias prevalentes se desenvolveram melhor em temperaturas abaixo de 15°C. Desta forma, sugere-se que em condições favoráveis para o desenvolvimento dos micro-organismos (temperaturas acima de 15°C), a microbiota bacteriana das ostras é mais diversificada.

As ostras expostas ao tratamento II, por sua vez, demonstraram haver menor número de gêneros, menor diversidade e consequentemente, maior dominância de gêneros. Quando expostas ao ar, as ostras permanecem com as valvas fechadas e ocorrem em seu interior, alterações do pH, anaerobiose, acúmulo de resíduos fisiológicos e de dióxido de carbono (Gosling, 2015). Esse processo pode ter efeitos diretos sobre a microbiota bacteriana, portanto, sugere-se que houve uma seleção de bactérias, com o desenvolvimento das mais adaptadas à essas condições e inibição das menos adaptadas.

Neste mesmo tratamento (II), ocorreu o aumento de bactérias prevalentes em temperaturas acima de 15°C. No estudo realizado por Madigan (2008), o autor observou que o número total de bactérias em ostras (*Saccostrea glomerata*, *C. gigas* e *Ostrea angasi*) armazenadas fora da água a 15°C foi menor que aquelas armazenadas a 8°C. O autor ainda concluiu que o menor número de bactérias nessa temperatura esteve associado ao fato das ostras encontrarem-se mais ativas, permitindo que suas defesas imunitárias fossem mais eficazes na eliminação de bactérias.

A microbiota das ostras está diretamente relacionada às condições de armazenamento, principalmente, se está sendo exposta ao ar ou imersa em água. Os resultados aqui obtidos recomendam que durante a fase de armazenamento e comercialização, as ostras vivas sejam expostas ao ar entre 5 e 25°C, em substituição técnica de imersão em água, por ser esse um método mais eficaz, especialmente por apresentar menor prevalência de bactérias patogênicas para os seres humanos.

4.7 REFERÊNCIAS

AARAAS, R. et al. Sensory, Histological, and Bacteriological changes in flat oysters, *Ostrea edulis* L., during different storage conditions. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 205-210, 2004.

ANVISA. **Resolução-RDC Nº 12. SANITÁRIA**, A. N. D. V.: 37 p. 2001.

CAO, R. et al. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. 102-108, 2009.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4516-4522, 2011.

CHEN, H. et al. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3748-3754, 2013.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 174-192, 2011.

COOK, D. W. Microbiology of bivalve molluscan shell-fish. In: WARD, D. R. e HACKNEY, C. R. (Ed.). **Microbiology of Marine Food Products**. New York, 1991. p.19-39.

CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure treatment on the microflora of oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 441-447, 2008.

FERNANDEZ-PIQUER, J. et al. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 1134-1143, 2012.

FERNANDEZ, N. T. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, p. 69-83, 2014.

GOSLING, E. **Marine bivalve molluscs**. 2. USA: 2015. 536.

HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; OLMOS-SOTO, J. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 664-672, 2006.

HJERDE, E. et al. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. **BMC Genomics**, v. 9, p. 616, 2008.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v. 14, p. 1447-1461, 2004.

JIMÉNEZ-RUIZ, E. I. et al. Impact of two commercial in vivo transport methods on physiological condition of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Chemistry**, p. 6, 2015.

MADIGAN, T. L. **A critical evaluation of supply-chain temperature profiles to optimise food safety and quality of Australian oysters**. INSTITUTE, S. A. R. A. D. Australia: 1-86 p. 2008.

MOREIRA, A. et al. Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 191, p. 183-193, 2017.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

RAZIN, S. Mycoplasmas. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. Texas, 1996.

RICHARDS, G. P. Shellfish Depuration. **Microbiology of Marine Food Products**, p. 395-428, 1991.

SEAMAN, M. N. L. Survival and aspects of metabolism in oysters, *Crassostrea gigas*, during and after prolonged air storage **Aquaculture**, v. 93, p. 389-395, 1991.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805-814, 2005.

URBANCZYK, H. et al. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2823-2829, 2007.

WANG, D. et al. Seasonal dynamics and diversity of bacteria in retail oyster tissues. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 14-20, 2014.

ZHANG, Z. et al. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 256, p. 502-509, 2006.

5 CAPÍTULO V – CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA DA MICROBIOTA BACTERIANA DE OSTRAS COMERCIALIZADAS (*Crassostrea* spp.) NO ESTADO DO PARANÁ

METAGENOMIC CHARACTERIZATION OF BACTERIAL MICROBIOTA OF
COMMERCIALIZED OYSTERS (*Crassostrea* spp.) IN THE STATE OF PARANÁ

5.1 RESUMO

As ostras estão entre os moluscos bivalves mais produzidos, comercializados e consumidos em todo o mundo. No entanto, há uma estreita relação entre a composição da microbiota bacteriana presente em ostras *in natura* ou que tenham sofrido algum tipo de processamento e a qualidade e segurança alimentar dos respectivos produtos. O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota bacteriana presente em ostras comercializadas no estado do Paraná, em diferentes formas de apresentação comercial, utilizando, pela primeira vez no Brasil, o sequenciamento de DNA de nova geração como ferramenta analítica. Para isso, foram obtidas amostras de ostras *in natura*, minimamente processadas (congeladas inteiras) e ultraprocessadas (carpaccio, ostras prontas para gratinar ou ostras com molho branco). As amostras foram provenientes de supermercados, peixarias e fazendas de cultivo de cinco mesorregiões do estado. Em laboratório, realizou-se os procedimentos de extração do DNA total e amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. A partir das sequências foi feito o estabelecimento das unidades taxonômicas, formando o completo mapeamento das linhagens bacterianas das amostras. Ao todo foram identificados 88 gêneros de bactérias, pertencentes a 80 famílias, 45 ordens, 24 classes e 15 filos. Dentre os filos encontrados, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Spirochaetes apresentaram a maior predominância nas amostras. Em relação aos gêneros, foi possível encontrar maior prevalência de bactérias relacionadas à qualidade da água do cultivo (*Vibrio*, *Bacteroides*), ao armazenamento do produto (*Shewanella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter* e *Pseudoaltermonas*), aos ingredientes utilizados nas amostras ultraprocessadas (*Lactobacillus*) e à manipulação (*Streptococcus*). Neste contexto, concluiu-se que a composição da microbiota bacteriana das ostras comercializadas no estado do Paraná esteve intrinsecamente associada à forma de apresentação desse alimento. Além disso, foram identificadas nas amostras bactérias potencialmente patogênicas e que não são objeto de monitoramento regular segundo a legislação sanitária brasileira.

Palavras-chave: metagenômica; bactérias; patogenicidade; microbiologia.

5.2 ABSTRACT

Worldwide, oysters are among the bivalve molluscs the most produced, marketed and consumed. However, there is a close relationship between the composition of the bacterial microbiota present in fresh or that have undergone some type of processing oysters and the quality and food safety of these products. The objective of this study was to characterize the bacterial microbiota of oysters commercialized in the state of Paraná, in different forms of commercial presentation, using, for the first time in Brazil, the sequencing of next generation as an analytical tool. Samples of live, minimally processed (frozen) and ultraprocessed oysters (carpaccio, oysters ready for gratin or oysters with white sauce) were obtained in supermarkets, fishmongers and farms from

five mesoregions of the state. In the laboratory, we performed methodological procedures to extract the total DNA and to amplify and to sequence the 16S rRNA gene. These sequences were used to establish the taxonomic units and, later on, mapping the bacterial lineage of samples. In all, 88 genera of bacteria were identified, belonging to 80 families, 45 orders, 24 classes and 15 phyla. Among the phyla found, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Spirochaetes presented the highest predominance in the samples. In relation to the genera, it was possible to find a higher prevalence of bacteria related to the quality of the culture water (*Vibrio*, *Bacteroides*), to the storage of the product (*Shewanella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudoaltermonas*), to the ingredients used in the ultraprocessed (*Lactobacillus*) and manipulated (*Streptococcus*) samples. Thus, we concluded that the composition of bacterial microbiota of oysters marketed in the state of Paraná was intrinsically associated with the form of presentation of the processed product. In addition, potentially pathogenic bacteria have been identified in the samples and are not subject to regular monitoring in accordance with Brazilian sanitary legislation.

Keywords: metagenomic; bacteria; pathogenicity; microbiology.

5.3 INTRODUÇÃO

As ostras estão entre os moluscos bivalves mais produzidos, comercializados e consumidos mundialmente (Fernandez *et al.*, 2014; Serment-Moreno *et al.*, 2015). No Brasil, ostras do gênero *Crassostrea* têm maior destaque dentro da cadeia produtiva da ostreicultura por sua ampla distribuição na faixa litorânea, seu rápido crescimento, sua alta rentabilidade comercial e seu valor nutricional (Christo, 2006), além da alta aceitação por parte dos consumidores.

A comercialização desse bivalve é geralmente realizada *in natura*, na concha ou desconchada (Jiménez-Ruiz, Márquez-Ríos, Cárdenas-López, Montoya-Camacho, Castillo-Yáñez, *et al.*, 2015), com o produto sendo vendido vivo, resfriado ou congelado. Contudo, a procura por ostras que tenham sofrido algum tipo de processamento e congeladas (cozidas, defumadas ou com condimentos) tem aumentado, devido ao maior tempo de prateleira deste tipo de produto (Bandarra *et al.*, 2004) e também, muito provavelmente, pela facilidade de preparação para o consumo em ambiente doméstico.

Por serem animais de hábito alimentar filtrador, é comum a retenção e concentração pelas ostras, em suas brânquias e em seu trato gastrintestinal, de micro-

organismos presentes na água (Wang *et al.*, 2014). Por este motivo, a composição da microbiota das ostras costuma estar diretamente relacionada à qualidade da água de cultivo (Feldhusen, 2000).

Existe, desta forma, uma intrínseca relação entre a qualidade e a segurança alimentar de ostras com qualidade ambiental. A saúde dos consumidores de ostras pode ser comprometida se as bactérias presentes nas ostras forem potencialmente patogênicas. Essa contaminação por micro-organismos patogênicos, por sua vez, pode ocorrer naturalmente ou por via antropogênica. Na contaminação natural pode haver presença de, por exemplo, *Vibrio* sp., *Clostridium* sp. e *Aeromonas* sp. na água do cultivo. Já na contaminação antropogênica, bactérias como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Listeria* sp. e *Escherichia coli* podem ser provenientes do descarte de efluentes domésticos no ambiente (Potasman *et al.*, 2002).

Além disso, assim como também acontece com outros alimentos, as ostras podem ser contaminadas após sua fase de cultivo, durante o beneficiamento e/ou processamento, na distribuição, no armazenamento ou mesmo durante a fase de comercialização (Fernandez-Piquer *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017).

De modo geral, assim como qualquer outro pescado, as ostras costumam ter um tempo de prateleira relativamente curto e variável, em função de suas características intrínsecas, como a alta atividade de água, o pH neutro e pelo fato de frequentemente abrigarem bactérias psicrófilas, capazes de se multiplicar em baixas temperaturas (como *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Psychrobacter*) (Franco e Landgraf, 2005). Somado a isto, há ainda a presença de enzimas autolíticas, responsáveis pelo rápido aparecimento de odores e sabores desagradáveis relacionados ao produto (Fernandez-Piquer, 2011).

É também importante ressaltar que as bactérias, sobre as quais os instrumentos legais vigentes no Brasil estabelecem os limites máximos de contaminação da carne da ostra (Resolução RDC n. 12 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2001) e Instrução Normativa Interministerial MPA MAPA nº 07, de 08 de maio de 2012) (Brasil, 2012), geralmente não alteram a aparência física do produto comercializado. O monitoramento de tais bactérias nos bivalves se dá por seu potencial patogênico ao Homem e não por sua capacidade de deterioração do produto (Vieira, 2004).

Com os avanços na biotecnologia, novas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas ou adaptadas para aumentar a eficiência analítica, diminuir o tempo para a detecção de patógenos, aumentar a sensibilidade e a especificidade das análises e avaliar, com mais acurácia, a eficiência dos métodos de depuração de patógenos em ostras. Métodos tradicionais têm sido gradativamente substituídos por kits enzimáticos de detecção rápida ou ainda por técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA bacteriano, a partir de plataformas específicas em reações de hibridização molecular, precedidas pela amplificação gênica (Correa, 2006).

Neste contexto, uma nova metodologia, desenvolvida por sequenciamento de nova geração, tem permitido a pesquisa e a quantificação microbiana em amostras. Esta ferramenta gera um mapa completo das bactérias presentes em uma determinada amostra a partir de sua análise direta, ou seja, sem a necessidade de meios de cultura ou provas bioquímicas, com maior agilidade e acurácia do processo (Postollec *et al.*, 2011).

Além disso, a detecção de micro-organismos em diferentes matrizes, por métodos moleculares, tem se mostrado rápida, seletiva, de alta sensibilidade e capaz de detectar fragmentos específicos de genes (Scheu *et al.*, 1998).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar a microbiota bacteriana, presente em ostras comercializadas no estado do Paraná, em diferentes formas de apresentação comercial, utilizando o sequenciamento de nova geração como ferramenta analítica.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Área de estudo

A definição da área amostral envolveu o levantamento de pontos de venda em que existia a comercialização de ostras, em todas as mesorregiões geográficas do estado do Paraná, Brasil. Para isso, foram identificados supermercados, peixarias e fazendas de cultivo que comercializassem ostras *in natura*, minimamente processadas e/ou ultraprocessadas, por meio de buscas pela internet utilizando as seguintes

palavras-chave: "comercialização + ostras + venda + Paraná". Após a identificação dos pontos de venda, realizou-se contato telefônico com os estabelecimentos identificados em cada mesorregião.

Das 10 mesorregiões paranaenses, foram identificados pontos de venda de ostras em 10 municípios de cinco mesorregiões geográficas: Região Metropolitana de Curitiba (Curitiba, Guaratuba, Paranaguá, Matinhos), Norte Central Paranaense (Maringá, Campo Mourão), Centro Sul Paranaense (Guarapuava), Sudeste Paranaense (Francisco Beltrão) e Oeste Paranaense (Toledo, Foz do Iguaçu) (Figura 11).

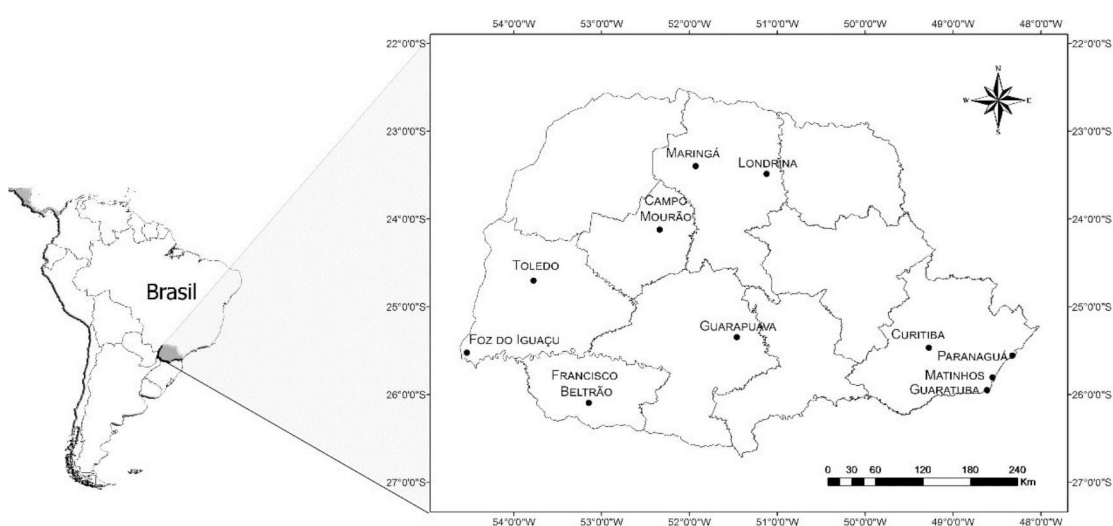


Figura 11: Localização geográfica dos municípios e das mesorregiões onde se comercializam ostras no estado do Paraná, Brasil.

5.4.2 Amostragem

Ao todo, foram coletadas 14 amostras compostas de, no mínimo, doze indivíduos (*in natura* ou minimamente processados) ou 200 gramas de ostras ultraprocessadas (Tabela 17). Este material foi armazenado em caixas isotérmicas, sob refrigeração (5°C) durante o transporte (aéreo ou rodoviário). O período de transporte não excedeu 48 horas, conforme preconiza o manual do *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius, 1978) e o Plano Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) (Brasil, 2012).

Tabela 17: Descrição das amostras de ostras adquiridas nos pontos de venda no estado do Paraná, Brasil.

Identificação	Município	Classificação	Conservação	Apresentação
A1	Guaratuba	<i>In natura</i>	Temperatura ambiente	Viva
A2	Paranaguá	<i>In natura</i>	Temperatura ambiente	Viva
A3	Matinhos	<i>In natura</i>	Temperatura ambiente	Viva
A4	Curitiba	<i>In natura</i>	Refrigerada de 0 a 4°C	Viva
A5	Francisco Beltrão	Minimamente processada	Congelada a -10°C	Inteira
A6	Guarapuava	Minimamente processada	Congelada a -10°C	Inteira
A7	Foz do Iguaçu	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, fatiadas e congeladas (Carpaccio)
A8	Toledo	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, fatiadas e congeladas (Carpaccio)
A9	Campo Mourão	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com queijo em meia-concha (prontas para gratinar)
A10	Francisco Beltrão	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com queijo em meia-concha (prontas para gratinar)
A11	Guarapuava	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com queijo em meia-concha (prontas para gratinar)
A12	Maringá	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com queijo em meia-concha (prontas para gratinar)
A13	Foz do Iguaçu	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com molho branco em meia-concha
A14	Toledo	Ultraprocessadas	Congelada a -10°C	Cozidas, com molho branco em meia-concha

As ostras *in natura* foram imediatamente analisadas assim que chegaram ao Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba, Paraná. As ostras minimamente processadas e as ultraprocessadas, por sua vez, foram preservadas a -10°C até o início das análises.

5.4.3 Processamento das amostras

As ostras *in natura* foram lavadas externamente e, em seguida, suas valvas foram abertas para a retirada da carne e do líquido intervalvar. Nas ostras

minimamente processadas, realizou-se a abertura das valvas para a retirada da carne e do líquido intervalvar ainda congelados. Já nas amostras ultraprocessadas, que continham em sua composição preparações com molhos e condimentos, procurou-se utilizar nas análises apenas a carne das ostras, minimizando-se a interferência desses ingredientes nos resultados.

Cada uma das amostras era homogeneizada em sacos plásticos estéreis e uma alíquota de 200 µL retirada e armazenada em frascos *Eppendorf* para a extração de seu DNA total, com o uso do kit de DNA Genomic Purelink® (Invitrogen, EUA). Após a extração, avaliou-se a qualidade e a quantidade do DNA total presente nas amostras, através de espectrofotometria, com leituras em 260 e em 280 nm de absorbância, utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®, USA).

Todas as análises foram realizadas baseando-se na metodologia proposta por Caporaso *et al.* (2011), com adaptações. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com uma PCR das amostras em um sistema de 10 µL, contendo 5 µL de DNA (10 ng/L), 1 µL de primer universal (515F/806r), 1 µL de primer “adaptador” e 5 µL da enzima KlenTaq DV Readymix. Os níveis de expressão gênica do gene 16S rRNA foram analisados em um termociclador (Veriti 96 well Applied Biosystems®, USA), com as reações realizadas a 94°C por 3 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido do processo de amplificação de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos para a desnaturação final; 50°C durante 30 segundos para o anelamento; 68°C durante 1 minuto para a extensão inicial e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Após esta etapa, as amostras foram mantidas entre 0 e 4°C.

Para a confirmação da amplificação gênica, as amostras foram testadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). No gel, foram aplicados 3 µL da mistura feita com 2 µL de amostra e 2 µL de corante FSUDS (azul de bromofenol). Após, foi realizada a corrida eletroforética das amostras em gel (uma hora) em voltagem constante de 70 volts na presença de tampão TBE 1X. Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel 3 µL de marcador de peso molecular 1 Kb. O gel foi corado com brometo de etídio (1%) (15 minutos), lavado em água (10 minutos) e visualizado em uma câmara UVP 3UV Transilluminator Imaging System.

O sequenciamento das amostras foi realizado na plataforma Illumina MiSeq[®], de nova geração, capaz de gerar informações sobre milhares de pares de bases em uma única corrida. O kit utilizado para o sequenciamento das amostras foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle), *pair end*.

5.4.4 Análise de dados

As sequências do gene 16S rRNA geradas durante a análise foram avaliadas de acordo com o protocolo do programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Qiime[®]), desenvolvido por Caporaso *et al.* (2010).

As análises de diversidade de Shannon-Winner e de dominância foram realizadas com o auxílio do software Past, versão 2.17.

Os resultados obtidos nas análises genéticas foram também tabelados, ordenados e classificados segundo a sua prevalência. Estabeleceu-se como critério de análise que os gêneros prevalentes seriam aqueles encontrados em quantidades iguais ou superiores a 5% em cada amostra analisada.

5.5 RESULTADOS

No conjunto das amostras analisadas foram identificados 88 gêneros de bactérias, pertencentes a 80 famílias, 45 ordens, 24 classes e 15 filos.

Entre os filos encontrados, quatro apresentaram maior predominância nas amostras (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Spirochaetes). Por sua vez, os gêneros mais prevalentes foram *Vibrio* (Guaratuba), *Bacteroides* (Paranaguá) e *Shewanella* (Curitiba), nas amostras de ostras *in natura*; *Psychrobacter* (Guarapuava), nas amostras de ostras minimamente processadas; *Acinetobacter* (Foz do Iguaçu) e *Psychrobacter* (Toledo), nas ostras em forma de carpaccio; *Psychrobacter* (Campo Mourão), *Pseudoalteromonas* (Francisco Beltrão), *Lactobacillus* (Guarapuava e Maringá) e *Streptococcus* (Guarapuava e Maringá) nas amostras prontas para gratinar e *Acinetobacter* (Foz do Iguaçu) e *Streptococcus* (Toledo) nas ostras com molho branco.

Foram identificados 49 gêneros de bactérias consideradas potencialmente patogênicas para os seres humanos. Ostras na forma de carpaccio apresentaram o maior número de gêneros potencialmente patogênicos (n = 32), seguida pelas ostras *in natura*, minimamente processadas e com molho branco (n = 24) e, em o menor número, as prontas para gratinar (n = 21). Destes gêneros, seis (*Flavobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Arcobacter*, *Pseudomonas* e *Vibrio*) são considerados causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

Observou-se também um grande percentual de sequências do gene 16S (por exemplo: BD2-6, WH1-8, SC3-56) de bactérias ainda sem identificação específica, sendo aqui consideradas como “não classificadas”. Bactérias que não foram adequadamente identificadas pelo método, por sua vez, foram consideradas como “indefinidas” (Tabela 18).

Tabela 18: Percentual de filos e gêneros de bactérias encontradas em ostras comercializadas no estado do Paraná. * Bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos; ** Gêneros com espécies causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

Filo/Gênero	<i>In natura</i>		Minimamente processadas						Ultraprocessadas					
	Viva		Inteira				Carpaccio		Pronta para gratinar				Molho branco	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
Acidobacteria	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteroidetes	31,8													
<i>Arenibacter</i>	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacteroides</i> *	9,9	27,9	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Brumimicrobium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Chryseobacterium</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,8	0,5	0,1	0,0	0,6	0,4	0,2	0,2
<i>Cloacibacterium</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flammeovirga</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Flavobacterium</i> **	1,5	0,1	1,0	0,8	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fluviicola</i>	0,4	0,1	0,2	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Gaetbulibacter</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Myroides</i> *	0,5	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Paludibacter</i>	0,3	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pedobacter</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sediminicola</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sphingobacterium</i> *	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Tenacibaculum</i>	0,2	0,2	0,5	0,0	0,1	0,6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
<i>Wautersiella</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Não classificada	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indefinida	19	18	10,3	0,1	0,4	4	2,5	1,1	0,0	0,1	0,1	0,9	0,0	0,4
Chlamydiae	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Filó/Gênero	<i>In natura</i>			Minimamente processadas				Ultraprocessadas						
	Viva			Inteira		Carpaccio		Pronta para gratinar				Molho branco		
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
Chlorobi	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prosthecochloris*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cyanobacteria	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0,11	26,9	27	0	0,7	0,1	2,7	2,2	22
<i>Synechococcus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0
Indefinida	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,6	26,8	26,9	0,0	0,6	0,1	2,5	2,2	22
Fibrobacteres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Firmicutes	2,1	0,1	1,8	0	0	1,3	2,3	5,4	2,2	22,8	91,9	86,3	7,3	23,4
<i>Acidaminococcus*</i>	1,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Aerococcus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Alkaliphilus</i>	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Anoxybacillus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
<i>Bacillus**</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,7
<i>Brochothrix</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
<i>Carnobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,6	0,6	0,4	0,0	0,1	0,0	0,1
<i>Enterococcus**</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
<i>Exiguobacterium*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,6	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>Fructobacillus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
<i>Fusibacter</i>	0,5	0,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	48,2	33,0	0,3	4,0
<i>Lactococcus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,8	0,2	1,3	2,5	4,9	4,2	3,3
<i>Leuconostoc*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,9
<i>Rummeliibacillus*</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Salinicoccus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
<i>Streptococcus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,3	15,2	41,1	47,6	0,9	11

Filó/Gênero	<i>In natura</i>			Minimamente processadas				Ultraprocessadas						
	Viva			Inteira		Carpaccio		Pronta para gratinar				Molho branco		
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
<i>Trichococcus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1
<i>Vagococcus*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0
<i>Weissella*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
Não classificada	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Indefinida	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	1,2	1,6	0,1	4,5	0,0	0,0	0,9	1,2
Fusobacteria	4,2	9,9	10,4	0,2	0	0,4	4,1	3,4	0	0,3	0	0,1	0,1	0,4
<i>Cetobacterium*</i>	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusobacterium*</i>	3,5	4,5	5,2	0,0	0,0	0,1	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Propionigenium</i>	0,2	0,2	3,3	0,0	0,0	0,3	1,4	0,8	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
<i>Psychrilyobacter</i>	0,5	5,2	1,2	0,2	0,0	0,0	2,2	2,4	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,3
Lentisphaerae	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Planctomycetes	0	0	0	0	0,2	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	47,8	15,7	54,7	97,5	6,3	62,3	52,3	53,1	97,3	74,7	5,9	6,8	88,6	50,8
<i>Acinetobacter *</i>	1,3	0,0	7,2	1,2	0,1	0,4	19,7	9,2	0,0	1,0	3,7	1,8	43,5	3,2
<i>Aliivibrio*</i>	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Anaerospira</i>	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Arcobacter**</i>	4,4	3,8	11,6	2,5	0,1	2,0	2,6	1,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1
<i>Bacteriovorax</i>	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Brevundimonas*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Candidatus Portiera</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Citrobacter*</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
<i>Comamonas*</i>	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Desulfofrigus</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Filó/Gênero	In natura			Minimamente processadas				Ultraprocessadas						Molho branco	
	Viva			Inteira		Carpaccio		Pronta para gratinar							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	
<i>Desulfovibrio</i> *	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Enhydrobacter</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	
<i>Erwinia</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,5	0,2	
<i>Glaciecola</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Janthinobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	
<i>Marinicella</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	
<i>Marinobacterium</i>	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Marinomonas</i> *	0,3	0,2	0,4	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Moritella</i>	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Neptunomonas</i>	0,1	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Oceanimonas</i> *	0,1	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Oceanospirillum</i>	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Oleibacter</i>	0,2	0,1	0,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Pedomicrobium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Photobacterium</i> *	0,4	0,3	2,2	12,4	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Phyllobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Pseudidiomarina</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Pseudoalteromonas</i> *	0,6	1,9	3,1	3,3	0,3	1,0	1,2	3,7	1,1	43,6	0,1	0,1	19,4	0,8	
<i>Pseudomonas</i> **	0,7	0,0	1,1	2,4	0,4	12,9	1,9	1,3	43,3	0,4	0,3	1,1	6,5	2,1	
<i>Psychrobacter</i> *	0,1	0,0	0,8	7,7	4,0	33,3	16,3	29,2	50,7	3,5	0,1	0,0	0,5	3,1	
<i>Psychromonas</i>	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	
<i>Rheinheimera</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>Serratia</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,4	0,3	0,1	0,9	0,4	0,2	0,3	
<i>Shewanella</i> *	2,6	0,7	3,3	52	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	14,6	0,0	0,1	2,1	0,2	
<i>Sphingomonas</i> *	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Filó/Gênero	In natura			Minimamente processadas				Ultraprocessadas					Molho branco	
	Viva			Inteira		Carpaccio		Pronta para gratinar						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
Stenotrophomonas*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tatlockia*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Thalassomonas	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Thalassospira*	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vibrio**	31,3	6,4	10,8	2,1	0,3	1,4	7,2	4,2	0,0	7,0	0,1	1,1	2,4	0,8
Indefinida	5,1	2,2	7,3	11,1	1,1	9,2	2,2	3,4	1,9	4,1	0,4	1,7	13,1	39,9
Spirochaetes	3,1	3,8	1,3	0,5	30,1	8,1	0,2	0,4	0	0	0,1	0	0	0,1
Borrelia*	0,1	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indefinida	3,0	3,5	1,2	0,5	30,1	8,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
Tenericutes	6,7	19,6	13	0,2	0,4	8,3	4,9	3,8	0	0,3	0	1,0	0,2	0,3
Mycoplasma*	6,7	19,6	13	0,2	0,2	6,9	4,4	3,1	0,0	0,3	0,0	0,7	0,2	0,2
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1,4	0,5	0,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1
Verrucomicrobia	0	0	0	0	0	0,6	0,1	0	0	0	0	0	0	0
Coralimargarita	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Persicirhabdus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Verrucomicrobium*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indefinida	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Não classificada	0,1	0,2	0,1	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0
Indefinida	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indefinido	2,1	2,3	0,7	0,1	61,4	5,9	2,7	3,9	0	0,1	0,1	0,4	0,4	0,3
Indefinida	2,1	2,3	0,7	0,1	61,4	5,9	2,7	3,9	0,0	0,1	0,1	0,4	0,4	0,3
Total Geral	98,0	98,1	98,1	99,4	99,0	99,0	97,7	99,1	99,6	99,0	98,8	98,8	99,1	98,0

A1: Guaratuba; A2: Paranaguá; A3: Matinhos; A4: Curitiba; A5: Francisco Beltrão; A6: Guarapuava; A7: Foz do Iguaçu; A8: Toledo; A9: Campo Mourão; A10: Francisco Beltrão; A11: Guarapuava; A12: Maringá; A13: Foz do Iguaçu; A14: Toledo

Ao avaliar a diversidade da composição bacteriana das amostras, observou-se maiores índices de Shannon-Winner em ostras vivas, em especial nas amostras de Guaratuba, Paranaguá e Matinhos. Enquanto os menores índices foram registrados nas amostras de ostras prontas para gratinar provenientes de Campo Mourão e Guarapuava.

O valor de dominância nas amostras se mostrou elevado para as ostras minimamente processadas de Francisco Beltrão. Isso foi decorrente do gênero *Psychrobacter* ter apresentado o percentual de prevalência mais elevado dentro dessas amostras, que foi de 4%, quando comparado com os demais gêneros que não apresentaram valores superiores a 0,3% (Tabela 19).

Tabela 19: Valores de dominância e índice de diversidade de Shannon-Winner para as amostras de ostras comercializadas no estado do Paraná.

Município	Classificação	Apresentação	nº de gêneros	Dominância	Índice de Shannon
Guaratuba	<i>In natura</i>	Viva	32	0,25	2,01
Paranaguá			18	0,25	2,01
Matinhos			41	0,09	2,8
Curitiba			16	0,38	1,5
Francisco Beltrão	Minimamente processada	Congelada inteira	8	0,54	1,08
Guarapuava			39	0,3	1,86
Foz do Iguaçu	Ultraprocessada	Carpaccio	35	0,2	2,1
Toledo			35	0,27	2,01
Campo Mourão		Pronta para gratinar	11	0,47	0,9
Francisco Beltrão			22	0,3	1,6
Guarapuava			14	0,42	1,07
Maringá			22	0,39	1,26
Foz do Iguaçu		Molho branco	21	0,34	1,52
Toledo			28	0,14	2,42

Ao se avaliar as bactérias prevalentes (que, por definição, foram aquelas presentes em percentagem igual ou superior a 5% em cada amostra analisada), foi possível observar a ocorrência de micro-organismos relacionados natural e corriqueiramente à água marinha, à contaminação de origem fecal na água de cultivo, ao armazenamento dos animais, aos ingredientes utilizados nas ostras processadas e à manipulação deste alimento (Tabela 20).

Tabela 20: Bactérias prevalentes (presença $\geq 5\%$) nas amostras de ostras comercializadas no estado do Paraná.

Apresentação	Município	Gênero	Ocorrência	Prevalência nas amostras (%)
Viva	Curitiba	<i>Shewanella</i>	Armazenamento	52
		<i>Photobacterium</i>	Ambiente natural	12,4
		<i>Psychrobacter</i>	Armazenamento	7,7
	Guaratuba	<i>Vibrio</i>	Ambiente natural	31,3
		<i>Bacteroides</i>	Ambiente contaminado	9,9
		<i>Mycoplasma</i>	Ambiente natural	6,7
	Matinhos	<i>Mycoplasma</i>	Ambiente natural	13
		<i>Arcobacter</i>	Ambiente natural	11,6
		<i>Vibrio</i>	Ambiente natural	10,8
		<i>Acinetobacter</i>	Armazenamento	7,2
		<i>Fusobacterium</i>	Manipulação	5,2
	Paranaguá	<i>Bacteroides</i>	Ambiente contaminado	27,9
		<i>Mycoplasma</i>	Ambiente natural	19,6
		<i>Vibrio</i>	Ambiente natural	6,4
		<i>Psychrilyobacter</i>	Armazenamento	5,2
Congelada Inteira	Guarapuava	<i>Psychrobacter</i>	Armazenamento	33,3
		<i>Pseudomonas</i>	Manipulação	12,9
		<i>Mycoplasma</i>	Ambiente natural	6,9
Carpaccio	Foz do Iguaçu	<i>Acinetobacter</i>	Armazenamento	19,7
		<i>Psychrobacter</i>	Armazenamento	16,3
		<i>Vibrio</i>	Ambiente natural	7,2
	Toledo	<i>Psychrobacter</i>	Armazenamento	29,2
		<i>Acinetobacter</i>	Armazenamento	9,2
Pronta para gratinar	Campo Mourão	<i>Psychrobacter</i>	Armazenamento	50,7
		<i>Pseudomonas</i>	Manipulação	43,3
	Francisco Beltrão	<i>Pseudoalteromonas</i>	Ambiente natural	43,6
		<i>Streptococcus</i>	Manipulação	15,2
		<i>Shewanella</i>	Armazenamento	14,6
		<i>Vibrio</i>	Ambiente natural	7
	Guarapuava	<i>Lactobacillus</i>	Composto lácteo	48,2
		<i>Streptococcus</i>	Manipulação	41,1
	Maringá	<i>Streptococcus</i>	Manipulação	47,6
		<i>Lactobacillus</i>	Composto lácteo	33
Molho branco	Foz do Iguaçu	<i>Acinetobacter</i>	Armazenamento	43,5
		<i>Pseudoalteromonas</i>	Ambiente natural	19,4
		<i>Pseudomonas</i>	Manipulação	6,5
	Toledo	<i>Streptococcus</i>	Manipulação	11

5.6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro registro já realizado no Brasil de caracterização microbiológica de ostras comercializadas através de método molecular de nova geração. Entretanto, mundialmente, análises moleculares do gene 16S rRNA vêm sendo amplamente utilizadas para avaliar a microbiota bacteriana total de ostras cultivadas. Dentre essas, destaca-se o estudo realizado por Fernández et al. 2014, que avaliaram a composição e a diversidade de bactérias em ostras (*C. corteziensis*, *C. gigas* e *C. sikamea*) produzidas em Punta Botella, baía Magdalena e baía Topolobampo, México. Assim como, a avaliação realizada por Madigan et al. 2014, que a partir do sequenciamento do 16S, identificou os níveis de deterioração de ostras *C. gigas* e *Saccostrea glomerata* cultivadas na Austrália, causada pela microbiota bacteriana, durante o armazenamento.

A composição dos filos bacterianos identificados, quando comparada aos dados obtidos por Fernandez-Piquer (2011) para a ostra *C. gigas*, mostrou similaridade com os resultados aqui encontrados. Tal similaridade foi observada, principalmente, em relação aos filos de maior prevalência nas amostras: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Spirochaetes.

O filo Proteobacteria representou o maior e mais diversificado grupo de bactérias nas diferentes formas de apresentação das ostras. A predominância desse filo em alimentos consumidos crus ou malcozidos pode ocasionar riscos à saúde dos consumidores, pois fazem parte dele as principais bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (*Salmonella* sp., *Escherichia* sp., *Vibrio* sp., *Helicobacter* sp., entre outras) (Wang et al., 2014).

As ostras obtidas *in natura* nos municípios litorâneos (Guaratuba, Matinhos e Paranaguá) e na capital do estado (Curitiba) foram seguramente produzidas (através de cultivo ou extração em ambiente natural) na própria mesorregião e pertenciam à espécie *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Já as ostras ultraprocessadas e comercializadas no interior do estado, muito provavelmente foram oriundas de fazendas de cultivo localizadas no estado vizinho, de Santa Catarina, e pertenciam à espécie *Crassostrea gigas*.

Segundo Wang et al. (2014) a elevada diversidade da microbiota de ostras comercializadas *in natura*, conforme identificado no presente trabalho, está associada principalmente à qualidade da água de onde esses animais foram cultivados. No entanto,

depois de retiradas da água, alguns micro-organismos presentes em seus tecidos podem ser inativados ou se multiplicarem, dependendo da temperatura de armazenamento (Baker, 2016).

Os gêneros de bactérias mais prevalentes nas ostras vivas do município de Guaratuba foram alguns dos que ocorrem naturalmente nas águas de cultivo, tais como *Vibrio* sp. Pereira *et al.* (2007) ao avaliarem ostras comercializadas vivas em restaurantes do Rio de Janeiro, Brasil, também registraram maior prevalência deste gênero. Porém, 50% do total por eles observado era da espécie *V. parahaemolyticus*, que está ligada a surtos epidêmicos pela ingestão de pescado cru ou malcozido.

Nas ostras *in natura* comercializadas em Paranaguá, por sua vez, houve maior prevalência de bactérias comuns em águas poluídas por contaminação fecal de origem antrópica, tais como *Bacteroides* sp.. Segundo Brooks *et al.* (2014) essas bactérias são capazes de causar intoxicações alimentares. Como este gênero não foi encontrado em ostras minimamente processadas ou ultraprocessadas acredita-se que os locais onde esses animais foram produzidos, ao contrário da região de Paranaguá, não estavam sujeitos à contaminação fecal ou, então, que essas bactérias foram destruídas durante o processamento.

O elevado percentual de *Shewanella* sp. nas ostras *in natura* comercializadas em Curitiba, possivelmente esteja relacionado à refrigeração, já que esta bactéria é psicotrófica e causa deterioração de frutos do mar armazenados sob temperaturas iguais ou inferiores a 7°C (Gram *et al.*, 1987). Bactérias deste gênero também causam alterações organolépticas no alimento, devido a formação de trimetilamina, ésteres e substâncias voláteis de forte odor, acelerando a deterioração da carne e limitando o tempo de prateleira para 12 dias a 5°C (Aaraas *et al.*, 2004). Como Curitiba está localizada a mais de 100 km do litoral, é provável que essas ostras passaram por algum tipo de refrigeração para aumentar seu tempo de prateleira.

A maior prevalência desse gênero também foi descrita por Prapaiwong *et al.* (2009), em ostras comercializadas congeladas (-20°C) ou refrigeradas (4°C) no Alabama, USA. Em humanos, algumas espécies de *Shewanella* podem causar septicemia (Chen *et al.*, 1997), abscessos cerebrais (Suzuk *et al.*, 2004) e úlceras na perna (Dominguez *et al.*, 1996).

As ostras minimamente processadas e ultraprocessadas apresentaram menores índices de diversidade de bactérias. Isso possivelmente ocorreu por terem passado por um

processo de tratamento térmico (refrigeração, congelamento ou cocção), o qual é capaz de reduzir sua composição microbiana (Filip *et al.*, 2010). Um exemplo encontrado para este caso, é o trabalho realizado por Cook e Ruple (1992), no qual os autores constataram a inativação de bactérias do gênero *Vibrio* após o congelamento das ostras a -40°C, durante 8 semanas e também uma redução dessas bactérias após a cocção das ostras a 50°C, durante cinco minutos.

Nessas ostras minimamente processadas e ultraprocessadas houve maior percentual de bactérias psicrotróficas, tais como *Psychrobacter* (Campo Mourão), *Acinetobacter* (Foz do Iguaçu) e *Pseudoalteromonas* (Francisco Beltrão). Essas bactérias também foram observadas em *C. gigas* quando expostas a baixas temperaturas (0 a 4°C), sendo relacionadas a deterioração da carne durante o armazenamento (Cruz-Romero *et al.*, 2008; Prapaiwong *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2014a). As espécies desses três gêneros bacterianos apresentam geralmente baixa patogenicidade para os seres humanos, havendo relatos esparsos de infecções oculares relacionadas a essas bactérias (Gennari *et al.*, 1992).

A presença de *Lactobacillus* sp. muito provavelmente esteve relacionada aos ingredientes adicionados às amostras obtidas de produtos prontos para gratinar ou com a presença de molho branco. A microbiota contida em laticínios inclui os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Listeria* (Jay, 2005). Entretanto, o gênero *Lactobacillus* também já foi encontrado em ostras (*C. plicatula*) embaladas e armazenadas a 4°C (Chen *et al.*, 2017), mesmo sem contato com produtos lácteos. Por outro lado, sua presença já foi relacionada às fases avançadas de deterioração da carne de ostras *C. gigas* refrigeradas a 2°C (Cruz-Romero *et al.*, 2008). A patogenicidade de *Lactobacillus* sp. está relacionada à infecções urinárias, digestivas e pulmonares (Franko *et al.*, 2016).

A maior contaminação por *Streptococcus* sp. em ostras prontas para gratinar, provenientes de Maringá, provavelmente tenha origem na inadequada manipulação ou na ineficaz sanitização de utensílios e/ou das superfícies de contato no local de beneficiamento. As bactérias desse gênero fazem parte da microbiota normal da boca, pele, intestino ou trato respiratório superior de humanos (Germano e Germano, 2008). Porém, podem ser patogênicas quando presentes em ostras destinadas ao consumo humano, podendo causar septicemia, meningite, pneumonia e síndrome do choque tóxico estreptocócico (Devriese, 1991).

Dentre as bactérias patogênicas listadas na legislação de vigilância sanitária brasileira (*Salmonella* sp., *Estafilococos* coagulase positiva e coliformes a 45°C), que define os critérios e os padrões microbiológicos que devem ser respeitados para alimentos (Resolução RDC n. 12 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2001)), somente a enterobactéria do gênero *Citrobacter* foi detectada nas amostras analisadas. Ela esteve presente em amostras de carpaccio com molho branco (Foz do Iguaçu e Toledo) e de ostras prontas para gratinar (Guarapuava). No estudo realizado por Rippey (1994), o autor menciona que a presença dessa bactéria em ostras está associada à contaminação da água de cultivo por lançamento de efluentes ou durante as etapas de seu beneficiamento e distribuição. Quando infectados por *Citrobacter*, os seres humanos podem apresentar meningite e infecções no aparelho circulatório e nos trato urinário e respiratório (Lipsky *et al.*, 1980).

Também se detectou nas amostras analisadas a presença de bactérias potencialmente causadoras de DTA que não estão listadas nos instrumentos legais brasileiros (*Flavobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Arcobacter*, *Pseudomonas* e *Vibrio*). Como a presença de tais bactérias pode apresentar riscos à saúde do consumidor, sugere-se seu monitoramento e, caso se confirme uma frequente alta prevalência dessas bactérias nas amostras, a sua possível inclusão na legislação brasileira, garantindo, assim, ostras de maior qualidade e seguras para os consumidores.

A composição da microbiota bacteriana em ostras comercializadas no estado do Paraná esteve intrinsecamente associada à forma de apresentação dos produtos analisados. Além disso, há evidências relativamente robustas de que os resultados encontrados refletiram, indiretamente, os processos aos quais esses produtos foram submetidos até chegarem aos respectivos pontos de comercialização, como, por exemplo, à qualidade da água nos locais de cultivo/crescimento das ostras e às técnicas empregadas ao longo da cadeia de produção, processamento e distribuição do produto. Além disso, a identificação de bactérias potencialmente patogênicas nas amostras analisadas e que não são passíveis de análises regulares segundo a legislação brasileira, ressalta a importância de se monitorar e quantificar estes micro-organismos em ostras comercializadas, de forma a se garantir a segurança alimentar ao consumidor.

5.7 REFERÊNCIAS

- AARAAS, R. et al. Sensory, Histological, and Bacteriological changes in flat oysters, *Ostrea edulis* L., during different storage conditions. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 205-210, 2004.
- ADAMS, C. M. et al. Biofouling in marine molluscan shellfish aquaculture: A survey assessing the business and economic implications of mitigation. **Journal of the world aquaculture society**, v. 42, n. 2, p. 242-252, 2011.
- AFINOWI, M. A. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 1984.
- ALVARENGA, L.; NALESSO, R. C. Preliminary assessment of the potential for mangrove oyster cultivation in Piraquê-açu river estuary (Aracruz, ES). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 163-169, 2006.
- ANSA, E. J.; BASHIR, R. M. Fishery and culture potentials of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 392-394, 2007.
- ANVISA. **Resolução-RDC Nº 12. SANITÁRIA**, A. N. D. V.: 37 p. 2001.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water** 2005. 541.
- ARAKAWA, K. Y. Competitors and fouling organisms in the hanging culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Marine Behaviour and Physiology**, v. 17, p. 67-94, 1990.
- AREIAS, D. L. L. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova de ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)**. 2012. Departamento de Biologia, Universidade do Porto
- AZEVEDO, C. Occurrence of an unusual branchial *mycoplasma-like* infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 16, p. 55-59, 1993.
- AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 75-81, 1991.
- BAKER, G. L. Food safety impacts from post-harvest processing procedures of molluscan shellfish. **Foods**, v. 5, n. 29, p. 1-12, 2016.

BALDAN, A. P.; BENDHACK, F. Maricultura sustentável no litoral do Paraná- Brasil: Atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambiental**, v. 7, n. 4, p. 491-497, 2009.

BANDARRA, N. M. et al. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. **Publicações Avulsas do IPIMAR**, v. 11, p. 98-103, 2004.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1976.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BNDO. Banco Nacional de Dados Oceanográficos. Paraná, 2016. Disponível em: < <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/> >.

BOEHS, G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa Interministerial nº 07, 08/05/2012**. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. 2012.

BROOKS, G. F. et al., Eds. **Microbiologia Médica**. Porto Alegre, p.823, 26 ed. 2014.

CAO, R. et al. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. 102-108, 2009.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4516-4522, 2011.

CAPPELLO, S. et al. Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) by a combination of 16s Crdna and 16s Rdna Sequencing. **JSM Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1016, 2015.

CHAUHAN, A. et al. Metagenomic assessment of the Eastern Oyster-associated microbiota. **Genomea**, v. 2, n. 5, 2014.

CHEN, H. et al. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3748-3754, 2013.

CHEN, H. et al. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4°C. **Food Microbiology**, v. 61, p. 58-65, 2017.

CHEN, Y. S. et al. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 225-229, 1997.

CHENEY, D. P. Bivalve shellfish quality in the USA: from the hatchery to the consumer. **Journal of the world aquaculture society**, v. 41, n. 2, p. 192-206, 2010.

CHRISTO, S. W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): um subsídio ao cultivo**. 2006. 146 Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

CODEX ALIMENTARIUS, C. R. **Mariscos Moluscoides**. CAC/RCP 1978.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 174-192, 2011.

COOK, D. W. Microbiology of bivalve molluscan shell-fish. In: WARD, D. R. e HACKNEY, C. R. (Ed.). **Microbiology of Marine Food Products**. New York, 1991. p.19-39.

COOK, D. W.; RUPLE, A. D. Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 985-989, 1992.

CORMIER MÉTHÉ, D. **Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Productivity and physiology under varying temperature and salinity conditions**. . 2015. 148 Thesis University of Prince Edward Island

CORREA, A. A. **Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**. 2006. Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic Coast. . **Diseases Aquatic Organisms**, v. 64, n. 1, p. 85-90, 2005.

CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure treatment on the microflora of oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 441-447, 2008.

DAME, R. F. **Bivalve filter feeders: in estuarine and coastal ecosystem processes**. New York: 2012. 579.

DENNY, C. M. Development of a method to reduce the spread of the ascidian *Didemnum vexillum* with aquaculture transfers. **ICES Journal of Marine Science**, v. 65, p. 805-810, 2008.

DEVRIESE, L. A. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 478-483, 1991.

DISHAW, L. et al. The gut of geographically disparate *Ciona intestinalis* harbors a core microbiota. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2013.

DOMINGUEZ, H. et al. *Shewanella alga* bacteremia in two patients with lower leg ulcers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 1036-1039, 1996.

DOROUDI, M. S. Infestation of pearl oysters by boring and fouling organisms in northern Persian Gulf. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 25, p. 168-169, 1996.

DOWNS, C. A. et al. Cellular pathology and histopathology of hypo-salinity exposure on the coral *Stylophora pistillata*. **Science of the total environment**, v. 407, n. 17, p. 4838-4851, 2009.

DPIWE. Oyster Mortalities in the Georges Bay Marine Farming Development Plan Area, February 2004. **Dpiwe Tasmânia**, p. 74, 2004.

FDA, F. A. D. A. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 2011.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FERNANDEZ-PIQUER, J. **Protecting the safety and quality of live oysters through the integration of predictive microbiology in cold supply chains**. 2011. 213 (Doctor). Agricultural Science, University of Tasmania

FERNANDEZ-PIQUER, J. et al. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 1134-1143, 2012.

FERNANDEZ, N. T. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, p. 69-83, 2014.

FIGUERAS, A. J.; VILLALBA, A. **Patología de moluscos**. Madrid: 1988.

FILIP, S.; FINK, R.; JEVSNIK, M. Influence of food composition on freezing time. **International Journal of Sanitary Engineering Research**, v. 4, p. 4-13, 2010.

FITRIDGE, I. et al. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 649-669, 2012.

FORREST, B. M.; BLAKEMORE, K. A. Evaluation of treatments to reduce the spread of a marine plant pest with aquaculture transfers. **Aquaculture**, v. 257, p. 333-345, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: 2005. 182.

FRANKO, B. et al. *Lactobacillus* bacteremia: Pathogen or prognostic marker? **Médecine et maladies infectieuses**, 2016.

FRIEDMAN, C. S. et al. Investigation of the relationship between the presence of a Gram positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, v. 94, p. 1-15, 1991.

FUNO, I. C. S. A. et al. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 41, n. 4, p. 837-847, 2015.

GALTSOFF, P. S. **The american oyster Crassostrea virginica Gmelin**. US Government Printing Office, 1964.

GALVÃO, M. S. N. et al. Desempenho da criação da ostra de mangue *Crassostrea* sp. a partir da fase juvenil, em sistema suspenso, no estuário de Cananéia e no mar de Ubatuba (SP, Brasil). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2009.

GENNARI, M. et al. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 61-75, 1992.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. 3. 2008.

GERVIS, M. H.; SIMS, N. A. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). **ICLARM Studies and Reviews**, v. 21, p. 49, 1992.

GOSLING, E. **Marine bivalve molluscs**. 2. USA: 2015. 536.

GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H. H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 65-72, 1987.

GUENTHER, J. S., P. C.; NYS, R. The effect of age and shell size on accumulation of fouling organisms on the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). **Aquaculture**, v. 252, p. 366-373, 2006.

GUZENSKI, J. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias húmicas no crescimento de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)**. 1996. 101 Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; OLMOS-SOTO, J. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 664-672, 2006.

HJERDE, E. et al. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. **BMC Genomics**, v. 9, p. 616, 2008.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v. 14, p. 1447-1461, 2004.

JAKOB, G. S.; WANG, J. The effect of manual handling on oyster growth in land based cultivation. **Journal of Shellfish Research**, v. 13, n. 1, p. 183-186, 1994.

JANSSEN, P. H.; LIESACK, W. Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 29-35, 1995.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Porto Alegre: 2005. 712.

JIMÉNEZ-RUIZ, E. I. et al. Impact of two commercial in vivo transport methods on physiological condition of the Japanese Oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Chemistry**, p. 1-6, 2015.

JIMÉNEZ-RUIZ, E. I. et al. Impact of two commercial in vivo transport methods on physiological condition of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Chemistry**, p. 6, 2015.

KACH, D.; WARD, J. E. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton size particles by suspension feeding molluscs. **Marine Biology**, v. 153, p. 797-805, 2008.

KALYOUSSEF, S.; FEJA, K. Foodborne Illnesses. **Advances in Pediatrics**, v. 61, p. 287-312, 2014.

KIM, Y.; POWELL, E. N. Relationships among parasites and pathologies in sentinel bivalves: NOAA status and trends "mussel watch" program. **Bulletin of marine science**, v. 79, n. 1, p. 83-112, 2006.

KING, G. M. et al. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.

KIRCHHOFF, H.; ROSENGARTEN, R. Isolation of a motile mycoplasma from fish. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 2439-2445, 1984.

KNOWLES, G. et al. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 121, p. 78-84, 2014.

LA PEYRE, M. K. N., A. D.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, G. S.; LA PEYRE, J. F. . Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. **Marine Ecology Progress Series** v. 248, p. 165-176, 2003.

LAPÈGUE, S. et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v. 202, n. 3, p. 232-242, 2002.

LE ROUX, F. et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 251-258, 2002.

LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. **Staphylococcus: Occurrence and Properties**. França: 2016.

LEVINTON, J. et al. Climate change, precipitation and impacts on an estuarine refuge from disease. **PLoS ONE** v. 6, n. 4, 2011.

LI, Y. et al. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas* an explanation for summer mortality in Pacific oysters. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative**, v. 293, p. 2353–2362, 2007.

LIPSKY, B. A. et al. Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 746-760, 1980.

LOMBARDI, S. A.; HARLAN, N. P.; PAYNTER, K. T. Survival, acid-base balance, and gaping responses of the Asian oyster *Crassostrea ariakensis* and the eastern oyster *Crassostrea virginica* during clamped emersion and hypoxic immersion. **Journal of Shellfish Research**, v. 32, n. 2, p. 409-415, 2013.

LOOSANOFF, V. L. Behavior of oysters in water of low salinities. Proceedings of the National Shellfisheries Association, 1953. p.135-151.

LOPES, G. R. et al. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 975-982, 2013.

MADIGAN, T. L. **A critical evaluation of supply-chain temperature profiles to optimise food safety and quality of Australian oysters**. INSTITUTE, S. A. R. A. D. Australia: 1-86 p. 2008.

MADIGAN, T. L. et al. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiology**, v. 38, p. 219-227, 2014a.

MADIGAN, T. L. et al. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiology**, v. 38, p. 219-227, 2014b.

MANZONI, G. **Ostras: aspectos bioecológicos e técnicas de cultivo**. Itajaí: 2001.

MARSHALL, R. D.; DUNHAM, A. Effects of culture media and stocking density on biofouling, shell shape, growth, and survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 406, p. 68-78, 2013.

MCENNULTY, F. R. et al. A literature review of rapid response options for the control of ABWMAC listed species and related taxa in Australia. **CSIRO Marine Research**, p. 13-56, 2001.

MELLO, G. L. Policultivo de ostras e camarões marinhos em viveiros de aquicultura. **FAEPE**, p. 23, 2007.

MEYERS, T. R.; SHORT, S.; EATON, W. Summer Mortalities and Incidental Parasitisms of Cultured Pacific Oysters in Alaska. **Journal Of Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 3, p. 172-176, 1990.

MOHAMMAD, M. B. M. Relationship between biofouling and growth of the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) in Kuwait, Arabian Gulf. **Hydrobiologia**, v. 51, n. 2, p. 129-138, 1976.

MORALES, J. **Acuicultura marina animal**. 1986.

MOREIRA, A. et al. Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 191, p. 183-193, 2017.

NEWKIRK, G. On the development of commercial bivalve hatcheries. In: URIBE, E. (Ed.). **Producción de larvas y juveniles de especies marinas**: Coquimbo, Chile: Universidad Catolica del Norte, 1988. p.104-171.

NOCKER, A.; LEPO, J. E.; SNYDER, R. A. Influence of an oyster reef on development of the microbial heterotrophic community of an estuarine biofilm. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6834-6845, 2004.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F.; BORREGO, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 477-498, 2004.

PARADA, J. M.; MOLARES, J.; OTERO, X. Multispecies mortality patterns of commercial bivalves in relation to estuarine salinity fluctuation. **Estuaries and Coasts**, v. 35, p. 132-142, 2012.

PAULEY, G. B. V. D. R., B.; TROUTT, D. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific Oyster. **Fish and Wildlife Service Biology**, p. 28, 1988.

PEREIRA, C. S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública – Contexto político-social e microbiológico**. 2003. Departamento de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300-303, 2007.

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Revista Ambiente & Água**, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009.

PEREIRA, O. M.; AKABOSHI, S.; CHAGAS SOARES, F. Cultivo experimental de *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) no Canal de Bertioga, São Paulo (23°54'30''S; 44°13'42''W). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 15, n. 1, p. 55-65, 1988.

PEREIRA, O. M. et al. Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliana* em rios e gamboas da região estuarino-lagunar de Cananéia (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 85-95, 2001.

PETROSINO, J. S. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 5856-5866, 2009.

PIERCE, S. K. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. **The Biological Bulletin**, v. 163, n. 3, p. 405-419, 1982. ISSN 0006-3185.

PIOLA, R. F.; DUNMORE, R. A.; FORREST, B. M. Assessing the efficacy of spray delivered 'ecofriendly' chemicals for the control and eradication of marine fouling pests. **Biofouling**, v. 26, p. 187-203, 2010.

PIT, J. H.; SOUTHGATE, P. C. Fouling and predation, how do they affect growth and survival of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, during nursery culture? **Aquaculture International**, v. 11, p. 545-555, 2003.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

POTASMAN, I. P.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 921-928, 2002.

PRAPAIWONG, N.; WALLACE, R. K.; ARIAS, C. R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 145-150, 2009.

PRIEUR, D. et al. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanography and Marine Biology**, v. 28, p. 277-352, 1990.

RATHLAVATH, S. et al. Incidence of *Arcobacter* spp. in fresh seafood from retail markets in Mumbai, India. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 165-170, 2016.

RAZIN, S. Mycoplasmas. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. Texas, 1996.

RENAULT, T.; COCHENNEC, N. *Chlamydia-like organisms* in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 153-159, 1995.

RIPPEY, S. R. Infections diseases associated with Molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 419-425, 1994.

RODRIGUEZ, L. F.; IBARRA-OBANDO, S. E. Cover and colonization of commercial oyster (*Crassostrea gigas*) shells by fouling organisms in San Quintin bay, Mexico. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, n. 2, p. 337-343, 2008.

ROLHEISER, K. C. et al. Assessment of chemical treatments for controlling *Didemnum vexillum*, other biofouling, and predatory sea stars in Pacific oyster aquaculture. **Aquaculture**, v. 364-365, p. 53-60, 2012.

ROMERO, J. et al. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 365-371, 2002.

RUWA, R. S.; POLK, P. Patterns of spat settlement recorded for tropical oyster *Crassostrea cucullata* (Born 1778) and the barnacles, *Balanus amphitrite* (Darwin 1854) in the mangrove Creek. **Tropical Zoology**, v. 7, n. 1, p. 121-130, 1994.

SABRY, R. C.; GESTEIRA, T. C. V.; BOEHS, G. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 755-758, 2007.

SALA, A.; LUCCHETTI, A. Low-cost tool to reduce biofouling in oyster longline culture. **Aquacultural Engineering**, v. 39, p. 53-58, 2008.

SANTANA, F. E. **Desenvolvimento do protótipo de uma máquina para lavagem de lanternas no cultivo de ostras**. 2005. 131 (Mestrado). Engenharia Mecânica, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHEU, P. M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction **Food Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 13-31, 1998.

SCHINK, B. The Genus *Propionigenium*. In: SPRINGER (Ed.). **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. New York, v.30, 2006. p.955-959.

SCHUSTER-PINTO, F. M. V. **Efeito de organismos incrustantes sobre o crescimento e a sobrevivência de ostras nativas do gênero *Crassostrea* em um cultivo suspenso na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil)**. 2007. Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

SEAMAN, M. N. L. Survival and aspects of metabolism in oysters, *Crassostrea gigas*, during and after prolonged air storage **Aquaculture**, v. 93, p. 389-395, 1991.

SERMENT-MORENO, V. et al. Monte Carlo analysis of the product handling and high-pressure treatment effects on the *Vibrio vulnificus* risk to raw oysters consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 86-92, 2015.

SHELFORD, V. E. Animal communities in temperature America as illustrated in the Chicago region. **Bulletim of the Geographical Society of Chicago**, 1913.

SHUMWAY, S. E. **Natural environmental factors**. Amsterdam: Elsevier Science 1996. 467-513.

SIDDALL, S. E. Dispersal and recruitment of tropical mussel larvae as affected by temperature and salinity. **Journal Shellfish Research**, v. 2, n. 1, p. 106-107, 1982.

SUZUK, S. et al. Cerebellar abscess caused by *Shewanella putréfaciens*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 621-622, 2004.

TANAKA, R. et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. **Aquaculture**, v. 241, p. 453-463, 2004.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 31-41, 2002.

TAYLOR, J. J. S., P. C.; ROSE, R. A. Fouling animals and their effect on the growth of silver-lip pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 153, p. 31-40, 1997.

TOLLEY, S. G. et al. Impacts of salinity and freshwater inflow on oyster-reef communities in Southwest Florida. **Aquatic Living Resources**, v. 19, n. 4, p. 371-387, 2006. ISSN 0990-7440.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Doenças microbianas da pele e dos olhos**. Rio Grande do Sul: 2012. 967.

TRABAL, N. et al. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 555-569, 2012.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805-814, 2005.

URBANCZYK, H. et al. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2823-2829, 2007.

VILANOVA, M. F. V.; CHAVES, E. M. B. Contribuição para o conhecimento da viabilidade do cultivo de ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca:Bivalvia), no estuário do rio Ceará, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciência Marinha**, v. 27, p. 111-125, 1988.

WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e seu cultivo**. 1973.

WALSH, J. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. **Nature**, v. 350, p. 53-55, 1991.

WANG, D. et al. Seasonal dynamics and diversity of bacteria in retail oyster tissues. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 14-20, 2014.

WEGNER, K. M. et al. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.

WELLS, H. W. The fauna of oyster beds, with special reference to the salinity factor. **Ecological Monographs**, v. 31, n. 3, p. 239-266, 1961. ISSN 1557-7015.

WIDMAN, J. C. et al. Toxicity of Un-ionized Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Juvenile Bay Scallops, *Argopecten irradians irradians*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 54, p. 460-465, 2008.

WILLIAMS, S. L.; SCHROEDER, S. L. Eradication of the invasive seaweed *Caulerpa taxifolia* by chlorine bleach. **Marine Ecology Progress Series**, v. 272, p. 69-76, 2004.

WINSTEAD, J. T. Digestive tubule atrophy in Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) exposed to salinity and starvation stress. **Journal Shellfish Research**, v. 14, p. 105-111, 1995.

WINSTEAD, J. T.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, S. G. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. **Journal Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 831-840, 2004.

ZEWEN, Z. et al. Rickettsia-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*, in the Yueqing Bay in China. **Acta Oceanologica**, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2012.

ZHANG, Z. et al. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 256, p. 502-509, 2006.

ZHAO, J.; MANNO, D.; HAWARI, J. *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum Fusobacteria that produces H₂ and degrades nitramine explosives under low temperature conditions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 491-497, 2009.

6 EPÍLOGO

Apesar das ostras serem amplamente cultivadas e comercializadas ao longo de quase toda a costa brasileira, ainda existem muitos obstáculos em sua cadeia produtiva que devem ser profundamente estudados, de modo que estes gargalos possam ser paulatinamente superados.

Durante a produção comercial, as ostras são inevitavelmente expostas a diversos fatores estressantes (sejam eles de origem física, química ou biológica) característicos do local/ambiente onde são cultivadas. Em alguns casos, os efeitos prejudiciais causados por esses fatores podem ser minimizados ou mesmo evitados.

Foi justamente buscando identificar e minimizar estes efeitos que nesta tese abordou-se a influência de fatores físicos, químicos e biológicos sobre o desenvolvimento e/ou sobre a qualidade sanitária de ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas e comercializadas no Brasil.

Ratificou-se a convicção de que a salinidade da água está entre os parâmetros que exercem maior influência sobre a sobrevivência das ostras. Também foi possível definir as faixas de tolerância da ostra *C. gasar* à salinidade. Os resultados obtidos são importantes para subsidiar estudos para definição de áreas para instalação de cultivos e para escolha da espécie a ser cultivada, por exemplo.

Já a influência biótica negativa sobre a ostreicultura esteve vinculada a dois grandes gargalos: a ação prejudicial de epibiontes e a presença e até dominância de micro-organismos patogênicos na microbiota bacteriana de ostras.

Há consistentes evidências de que a presença dos organismos epibiontes sobre a concha de uma ostra não só afete sua morfologia, comprometendo a apresentação comercial e reduzindo o valor de mercado, mas também provoque redução nas taxas de crescimento do bivalve. Taxas mais reduzidas de crescimento, por sua vez, irão estender o tempo de cultivo, aumentando os gastos com manejo e mão-de-obra, atrasando a comercialização. Em casos mais severos, a perda econômica pode ser ainda maior, caso as ostras morram em decorrência da presença de epibiontes, como observado neste estudo.

Seis métodos de tratamento para a redução destes organismos incrustantes em ostras foram testados e o hidrojateamento e a exposição das ostras à água doce, foram identificados como os mais eficientes. Além dos melhores resultados em termos de limpeza

das conchas e de redução das taxas de mortalidade, ambos os métodos não implicam na manipulação de produtos químicos que podem comprometer a segurança dos operadores, dos consumidores e do ambiente.

Os resultados obtidos aqui também mostraram como a microbiota presente em ostras pode ser preocupante tanto para o produtor quanto para o consumidor, fazendo com que os micro-organismos, especialmente as bactérias, devam ser considerados entraves para o desenvolvimento da ostreicultura. Alguns dos gêneros bacterianos identificados neste estudo são potencialmente patogênicos e até fatais para as ostras, além de poderem provocar doenças transmitidas por alimentos.

Ou seja, as possíveis consequências da presença de bactérias patogênicas (para as ostras ou para os consumidores) incluem prejuízos técnicos, econômicos e riscos à saúde pública. Para minimizar esses riscos, recomenda-se a realização de um correto manejo das ostras seguindo as Boas Práticas de Manejo e o monitoramento microbiológico regular da qualidade da água e das ostras comercializadas. No Brasil há diferentes instrumentos legais que podem orientar este monitoramento, tais como a Instrução Normativa Interministerial MPA/MAPA N° 07, de 08 de maio de 2012 e o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves.

Já nas etapas da cadeia produtiva que ocorrem na fase pós-despesca, a preocupação com a microbiota residente e transitória das ostras não deve ser menosprezada. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) determina que os moluscos bivalves devam ser vendidos frescos e descreve como identificar este frescor, embora não especifique quais deveriam ser as condições de armazenamento mais adequadas.

No Brasil, inúmeros comerciantes de ostras têm como prática corriqueira a manutenção dos animais vivos expostos ao ar, em temperatura ambiente, ou imersos em água salobra, também em temperatura ambiente. Embora estejam atendendo a descrição contida no RIISPOA do que seria um animal fresco, ainda havia uma dúvida: Qual destes métodos seria mais eficiente para garantir a sobrevivência dos animais e, ao mesmo tempo, a segurança alimentar dos consumidores?

Procurando responder a essa questão, este trabalho comprovou que o armazenamento por exposição ao ar em temperaturas entre 5 e 25°C por até 10 dias, durante o período de comercialização, é o mais indicado para a garantia da sobrevivência

dos animais e da qualidade do produto. Os resultados obtidos recomendam a necessidade de revisão dos instrumentos legais vigentes no país e uma melhor discussão sobre a prática de se manter ostras vivas imersas em água, a temperatura ambiente, nos pontos de venda, por exemplo.

Outro problema relacionado à comercialização de ostras está na qualidade da matéria-prima ao passar por algum tipo de processamento. Esta afirmação é validada pelos resultados apresentados nesta tese, em que se constatou a presença de uma microbiota bacteriana bastante diversificada e com elevado número de gêneros potencialmente patogênicos para os seres humanos. A preocupação é ainda maior, ao se verificar que, em alguns casos, as bactérias patogênicas identificadas não estão sujeitas ao monitoramento regular pela legislação brasileira.

Por fim, é importante destacar que além dos resultados obtidos, esta tese apresentou como grande inovação a utilização de um novo e eficiente método de mapeamento genético molecular da microbiota bacteriana de ostras. Esse método ainda deverá evoluir bastante nos próximos anos, mas já desponta como uma importante ferramenta para se monitorar e garantir a qualidade higiênico-sanitária das ostras cultivadas e comercializadas no Brasil.

7 REFERÊNCIAS GERAIS

- AARAAS, R. et al. Sensory, Histological, and Bacteriological changes in flat oysters, *Ostrea edulis* L., during different storage conditions. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 205-210, 2004.
- ADAMS, C. M. et al. Biofouling in marine molluscan shellfish aquaculture: A survey assessing the business and economic implications of mitigation. **Journal of the world aquaculture society**, v. 42, n. 2, p. 242-252, 2011.
- AFINOWI, M. A. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 1984.
- ALVARENGA, L.; NALESSO, R. C. Preliminary assessment of the potential for mangrove oyster cultivation in Piraquê-açu river estuary (Aracruz, ES). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 163-169, 2006.
- ANSA, E. J.; BASHIR, R. M. Fishery and culture potentials of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 392-394, 2007.
- ANVISA. **Resolução-RDC Nº 12. SANITÁRIA**, A. N. D. V.: 37 p. 2001.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water** 2005. 541.
- ARAKAWA, K. Y. Competitors and fouling organisms in the hanging culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Marine Behaviour and Physiology**, v. 17, p. 67-94, 1990.
- AREIAS, D. L. L. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova de ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)**. 2012. Departamento de Biologia, Universidade do Porto
- AZEVEDO, C. Occurrence of an unusual branchial *mycoplasma-like* infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 16, p. 55-59, 1993.
- AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 75-81, 1991.
- BAKER, G. L. Food safety impacts from post-harvest processing procedures of molluscan shellfish. **Foods**, v. 5, n. 29, p. 1-12, 2016.
- BALDAN, A. P.; BENDHACK, F. Maricultura sustentável no litoral do Paraná- Brasil: Atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambiental**, v. 7, n. 4, p. 491-497, 2009.
- BANDARRA, N. M. et al. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. **Publicações Avulsas do IPIMAR**, v. 11, p. 98-103, 2004.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1976.
- BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BNDO. Banco Nacional de Dados Oceanográficos. Paraná, 2016. Disponível em: < <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/> >.

BOEHS, G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa Interministerial nº 07, 08/05/2012**. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. 2012.

BROOKS, G. F. et al., Eds. **Microbiologia Médica**. Porto Alegre, p.823, 26 ed. 2014.

CAO, R. et al. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. 102-108, 2009.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4516-4522, 2011.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPPELLO, S. et al. Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) by a combination of 16s Crdna and 16s Rdna Sequencing. **JSM Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1016, 2015.

CHAUHAN, A. et al. Metagenomic assessment of the Eastern Oyster-associated microbiota. **Genomea**, v. 2, n. 5, 2014.

CHEN, H. et al. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4°C. **Food Microbiology**, v. 61, p. 58-65, 2017.

CHEN, Y. S. et al. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 225-229, 1997.

CHENEY, D. P. Bivalve shellfish quality in the USA: from the hatchery to the consumer. **Journal of the world aquaculture society**, v. 41, n. 2, p. 192-206, 2010.

CHRISTO, S. W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): um subsídio ao cultivo**. 2006. 146 Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

CODEX ALIMENTARIUS, C. R. **Mariscos Moluscoides**. CAC/RCP 1978.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 174-192, 2011.

COOK, D. W. Microbiology of bivalve molluscan shell-fish. In: WARD, D. R. e HACKNEY, C. R. (Ed.). **Microbiology of Marine Food Products**. New York, 1991. p.19-39.

COOK, D. W.; RUPLE, A. D. Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 985-989, 1992.

CORMIER MÉTHÉ, D. **Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Productivity and physiology under varying temperature and salinity conditions**. . 2015. 148 Thesis University of Prince Edward Island

CORREA, A. A. **Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**. 2006. Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic Coast. . **Diseases Aquatic Organisms**, v. 64, n. 1, p. 85-90, 2005.

CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure treatment on the microflora of oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 441-447, 2008.

DAME, R. F. **Bivalve filter feeders: in estuarine and coastal ecosystem processes**. New York: 2012. 579.

DENNY, C. M. Development of a method to reduce the spread of the ascidian *Didemnum vexillum* with aquaculture transfers. **ICES Journal of Marine Science**, v. 65, p. 805-810, 2008.

DEVRIESE, L. A. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 478-483, 1991.

DISHAW, L. et al. The gut of geographically disparate *Ciona intestinalis* harbors a core microbiota. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2013.

DOMINGUEZ, H. et al. *Shewanella alga* bacteremia in two patients with lower leg ulcers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 1036-1039, 1996.

DOROUDI, M. S. Infestation of pearl oysters by boring and fouling organisms in northern Persian Gulf. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 25, p. 168-169, 1996.

DOWNS, C. A. et al. Cellular pathology and histopathology of hypo-salinity exposure on the coral *Stylophora pistillata*. **Science of the total environment**, v. 407, n. 17, p. 4838-4851, 2009.

DPIWE. Oyster Mortalities in the Georges Bay Marine Farming Development Plan Area, February 2004. **Dpiwe Tasmânia**, p. 74, 2004.

FDA, F. A. D. A. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 2011.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FERNANDEZ, N. T. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, p. 69-83, 2014.

FERNANDEZ-PIQUER, J. et al. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 1134-1143, 2012.

FERNANDEZ-PIQUER, J. **Protecting the safety and quality of live oysters through the integration of predictive microbiology in cold supply chains**. 2011. 213 (Doctor). Agricultural Science, University of Tasmania

FIGUERAS, A. J.; VILLALBA, A. **Patología de moluscos**. Madrid: 1988.

FILIP, S.; FINK, R.; JEVSNIK, M. Influence of food composition on freezing time. **International Journal of Sanitary Engineering Research**, v. 4, p. 4-13, 2010.

FITRIDGE, I. et al. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 649-669, 2012.

FORREST, B. M.; BLAKEMORE, K. A. Evaluation of treatments to reduce the spread of a marine plant pest with aquaculture transfers. **Aquaculture**, v. 257, p. 333-345, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: 2005. 182.

FRANKO, B. et al. *Lactobacillus* bacteremia: Pathogen or prognostic marker? **Médecine et maladies infectieuses**, 2016.

FRIEDMAN, C. S. et al. Investigation of the relationship between the presence of a Gram positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, v. 94, p. 1-15, 1991.

FUNO, I. C. S. A. et al. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 41, n. 4, p. 837-847, 2015.

GALTSOFF, P. S. **The american oyster Crassostrea virginica Gmelin**. US Government Printing Office, 1964.

GALVÃO, M. S. N. et al. Desempenho da criação da ostra de mangue *Crassostrea* sp. a partir da fase juvenil, em sistema suspenso, no estuário de Cananéia e no mar de Ubatuba (SP, Brasil). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2009.

GENNARI, M. et al. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 61-75, 1992.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. 3. 2008.

GERVIS, M. H.; SIMS, N. A. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). **ICLARM Studies and Reviews**, v. 21, p. 49, 1992.

GOSLING, E. **Marine bivalve molluscs**. 2. USA: 2015. 536.

GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H. H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 65-72, 1987.

GUENTHER, J. S., P. C.; NYS, R. The effect of age and shell size on accumulation of fouling organisms on the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). **Aquaculture**, v. 252, p. 366-373, 2006.

GUZENSKI, J. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias húmicas no crescimento de Crassostrea rhizophorae (Guilding, 1828)**. 1996. 101 Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; OLMOS-SOTO, J. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 664-672, 2006.

HJERDE, E. et al. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. **BMC Genomics**, v. 9, p. 616, 2008.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Brasil, 2016. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/portal/> >.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v. 14, p. 1447-1461, 2004.

JAKOB, G. S.; WANG, J. The effect of manual handling on oyster growth in land based cultivation. **Journal of Shellfish Research**, v. 13, n. 1, p. 183-186, 1994.

JANSSEN, P. H.; LIESACK, W. Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 29-35, 1995.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Porto Alegre: 2005. 712.

JIMÉNEZ-RUIZ, E. I. et al. Impact of two commercial in vivo transport methods on physiological condition of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Chemistry**, p. 6, 2015.

KACH, D.; WARD, J. E. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton size particles by suspension feeding molluscs. **Marine Biology**, v. 153, p. 797-805, 2008.

- KALYOUSSEF, S.; FEJA, K. Foodborne Illnesses. **Advances in Pediatrics**, v. 61, p. 287-312, 2014.
- KIM, Y.; POWELL, E. N. Relationships among parasites and pathologies in sentinel bivalves: NOAA status and trends "mussel watch" program. **Bulletin of marine science**, v. 79, n. 1, p. 83-112, 2006.
- KING, G. M. et al. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.
- KIRCHHOFF, H.; ROSENGARTEN, R. Isolation of a motile mycoplasma from fish. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 2439-2445, 1984.
- KNOWLES, G. et al. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 121, p. 78-84, 2014.
- LA PEYRE, M. K. N., A. D.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, G. S.; LA PEYRE, J. F. . Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. **Marine Ecology Progress Series** v. 248, p. 165-176, 2003.
- LAPÈGUE, S. et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v. 202, n. 3, p. 232-242, 2002.
- LE ROUX, F. et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 251-258, 2002.
- LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. **Staphylococcus: Occurrence and Properties**. França: 2016.
- LEVINTON, J. et al. Climate change, precipitation and impacts on an estuarine refuge from disease. **PLoS ONE** v. 6, n. 4, 2011.
- LI, Y. et al. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas* an explanation for summer mortality in Pacific oysters. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative**, v. 293, p. 2353-2362, 2007.
- LIPSKY, B. A. et al. Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 746-760, 1980.
- LOMBARDI, S. A.; HARLAN, N. P.; PAYNTER, K. T. Survival, acid-base balance, and gaping responses of the Asian oyster *Crassostrea ariakensis* and the eastern oyster *Crassostrea virginica* during clamped emersion and hypoxic immersion. **Journal of Shellfish Research**, v. 32, n. 2, p. 409-415, 2013.
- LOOSANOFF, V. L. Behavior of oysters in water of low salinities. Proceedings of the National Shellfisheries Association, 1953. p.135-151.
- LOPES, G. R. et al. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 975-982, 2013.
- MADIGAN, T. L. et al. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiology**, v. 38, p. 219-227, 2014.
- MADIGAN, T. L. **A critical evaluation of supply-chain temperature profiles to optimise food safety and quality of Australian oysters**. INSTITUTE, S. A. R. A. D. Australia: 1-86 p. 2008.
- MANZONI, G. **Ostras: aspectos bioecológicos e técnicas de cultivo**. Itajaí: 2001.

MARSHALL, R. D.; DUNHAM, A. Effects of culture media and stocking density on biofouling, shell shape, growth, and survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 406, p. 68-78, 2013.

MCENNULTY, F. R. et al. A literature review of rapid response options for the control of ABWMAC listed species and related taxa in Australia. **CSIRO Marine Research**, p. 13-56, 2001.

MELLO, G. L. Policultivo de ostras e camarões marinhos em viveiros de aquicultura. **FAEPE**, p. 23, 2007.

MEYERS, T. R.; SHORT, S.; EATON, W. Summer Mortalities and Incidental Parasitisms of Cultured Pacific Oysters in Alaska. **Journal Of Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 3, p. 172-176, 1990.

MOHAMMAD, M. B. M. Relationship between biofouling and growth of the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) in Kuwait, Arabian Gulf. **Hydrobiologia**, v. 51, n. 2, p. 129-138, 1976.

MORALES, J. **Acuicultura marina animal**. 1986.

MOREIRA, A. et al. Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 191, p. 183-193, 2017.

NEL, R.; COETZEE, P. S.; VANNIEKERK, G. The evaluation of two treatments to reduce mud worm (*Polydora hoplura* Claparede) infestation in commercially reared oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture**, v. 141, p. 31-39, 1996.

NEWKIRK, G. On the development of commercial bivalve hatcheries. In: URIBE, E. (Ed.). **Producción de larvas y juveniles de especies marinas**: Coquimbo, Chile: Universidad Catolica del Norte, 1988. p.104-171.

NOCKER, A.; LEPO, J. E.; SNYDER, R. A. Influence of an oyster reef on development of the microbial heterotrophic community of an estuarine biofilm. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6834-6845, 2004.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F.; BORREGO, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 477-498, 2004.

PARADA, J. M.; MOLARES, J.; OTERO, X. Multispecies mortality patterns of commercial bivalves in relation to estuarine salinity fluctuation. **Estuaries and Coasts**, v. 35, p. 132-142, 2012.

PAULEY, G. B. V. D. R., B.; TROUTT, D. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific Oyster. **Fish and Wildlife Service Biology**, p. 28, 1988.

PEREIRA, C. S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública – Contexto político-social e microbiológico**. 2003. Departamento de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300-303, 2007.

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Revista Ambiente & Água**, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009.

PEREIRA, O. M. et al. Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliiana* em rios e gamboas da região estuarino-lagunar de Cananéia (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 85-95, 2001.

PEREIRA, O. M.; AKABOSHI, S.; CHAGAS SOARES, F. Cultivo experimental de *Crassostrea brasiliensis* (Lamarck, 1819) no Canal de Bertioga, São Paulo (23°54'30"S; 44°13'42"W). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 15, n. 1, p. 55-65, 1988.

PETROSINO, J. S. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 5856-5866, 2009.

PIERCE, S. K. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. **The Biological Bulletin**, v. 163, n. 3, p. 405-419, 1982. ISSN 0006-3185.

PIOLA, R. F.; DUNMORE, R. A.; FORREST, B. M. Assessing the efficacy of spray delivered 'ecofriendly' chemicals for the control and eradication of marine fouling pests. **Biofouling**, v. 26, p. 187-203, 2010.

PIT, J. H.; SOUTHGATE, P. C. Fouling and predation, how do they affect growth and survival of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, during nursery culture? **Aquaculture International**, v. 11, p. 545-555, 2003.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

POTASMAN, I. P.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 921-928, 2002.

PRAPAIWONG, N.; WALLACE, R. K.; ARIAS, C. R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 145-150, 2009.

PRIEUR, D. et al. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanography and Marine Biology**, v. 28, p. 277-352, 1990.

RATHLAVATH, S. et al. Incidence of *Arcobacter* spp. in fresh seafood from retail markets in Mumbai, India. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 165-170, 2016.

RAZIN, S. Mycoplasmas. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. Texas, 1996.

RENAULT, T.; COCHENNEC, N. *Chlamydia-like organisms* in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 153-159, 1995.

RICHARDS, G. P. Shellfish Depuration. **Microbiology of Marine Food Products**, p. 395-428, 1991.

RIPPEY, S. R. Infections diseases associated with Molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 419-425, 1994.

ROCHA, R. M. M., T. R.; METRI, R. . Ascídias (Tunicata, Ascideacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22(2), p. 461-476, 2005.

RODRIGUEZ, L. F.; IBARRA-OBANDO, S. E. Cover and colonization of commercial oyster (*Crassostrea gigas*) shells by fouling organisms in San Quintin bay, Mexico. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, n. 2, p. 337-343, 2008.

ROLHEISER, K. C. et al. Assessment of chemical treatments for controlling *Didemnum vexillum*, other biofouling, and predatory sea stars in Pacific oyster aquaculture. **Aquaculture**, v. 364-365, p. 53-60, 2012.

ROMERO, J. et al. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 365-371, 2002.

RUWA, R. S.; POLK, P. Patterns of spat settlement recorded for tropical oyster *Crassostrea cucullata* (Born 1778) and the barnacles, *Balanus amphitrite* (Darwin 1854) in the mangrove Creek. **Tropical Zoology**, v. 7, n. 1, p. 121-130, 1994.

SABRY, R. C.; GESTEIRA, T. C. V.; BOEHS, G. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 755-758, 2007.

SALA, A.; LUCCHETTI, A. Low-cost tool to reduce biofouling in oyster longline culture. **Aquacultural Engineering**, v. 39, p. 53-58, 2008.

SANTANA, F. E. **Desenvolvimento do protótipo de uma máquina para lavagem de lanternas no cultivo de ostras**. 2005. 131 (Mestrado). Engenharia Mecânica, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHEU, P. M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction **Food Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 13-31, 1998.

SCHINK, B. The Genus *Propionigenium*. In: SPRINGER (Ed.). **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. New York, v.30, 2006. p.955-959.

SCHUSTER-PINTO, F. M. V. **Efeito de organismos incrustantes sobre o crescimento e a sobrevivência de ostras nativas do gênero *Crassostrea* em um cultivo suspenso na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil)**. 2007. Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

SEAMAN, M. N. L. Survival and aspects of metabolism in oysters, *Crassostrea gigas*, during and after prolonged air storage **Aquaculture**, v. 93, p. 389-395, 1991.

SERMENT-MORENO, V. et al. Monte Carlo analysis of the product handling and high-pressure treatment effects on the *Vibrio vulnificus* risk to raw oysters consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 86-92, 2015.

SHELFORD, V. E. Animal communities in temperature America as illustrated in the Chicago region. **Bulletin of the Geographical Society of Chicago**, 1913.

SHUMWAY, S. E. **Natural environmental factors**. Amsterdam: Elsevier Science 1996. 467-513.

SIDDALL, S. E. Dispersal and recruitment of tropical mussel larvae as affected by temperature and salinity. **Journal Shellfish Research**, v. 2, n. 1, p. 106-107, 1982.

SUZUK, S. et al. Cerebellar abscess caused by *Shewanella putrefaciens*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 621-622, 2004.

TANAKA, R. et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. **Aquaculture**, v. 241, p. 453-463, 2004.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 31-41, 2002.

TAYLOR, J. J. S., P. C.; ROSE, R. A. Fouling animals and their effect on the growth of silver-lip pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson) in suspended culture. **Aquaculture**, v. 153, p. 31-40, 1997.

TOLLEY, S. G. et al. Impacts of salinity and freshwater inflow on oyster-reef communities in Southwest Florida. **Aquatic Living Resources**, v. 19, n. 4, p. 371-387, 2006. ISSN 0990-7440.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Doenças microbianas da pele e dos olhos**. Rio Grande do Sul: 2012. 967.
- TRABAL, N. et al. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 555-569, 2012.
- TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805-814, 2005.
- URBANCZYK, H. et al. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2823-2829, 2007.
- VILANOVA, M. F. V.; CHAVES, E. M. B. Contribuição para o conhecimento da viabilidade do cultivo de ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca:Bivalvia), no estuário do rio Ceará, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciência Marinha**, v. 27, p. 111-125, 1988.
- WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e seu cultivo**. 1973.
- WALSH, J. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. **Nature**, v. 350, p. 53-55, 1991.
- WANG, D. et al. Seasonal dynamics and diversity of bacteria in retail oyster tissues. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 14-20, 2014.
- WEGNER, K. M. et al. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- WILLIAMS, S. L.; SCHROEDER, S. L. Eradication of the invasive seaweed *Caulerpa taxifolia* by chlorine bleach. **Marine Ecology Progress Series**, v. 272, p. 69-76, 2004.
- WINSTEAD, J. T. Digestive tubule atrophy in Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) exposed to salinity and starvation stress. **Journal Shellfish Research**, v. 14, p. 105-111, 1995.
- WINSTEAD, J. T.; VOLETY, A. K.; TOLLEY, S. G. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. **Journal Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 831-840, 2004.
- ZEWEN, Z. et al. Rickettsia-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*, in the Yueqing Bay in China. **Acta Oceanologica**, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2012.
- ZHANG, Z. et al. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 256, p. 502-509, 2006.
- ZHAO, J.; MANNO, D.; HAWARI, J. *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum Fusobacteria that produces H₂ and degrades nitramine explosives under low temperature conditions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 491-497, 2009.