



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Bucefalose e outras parasitoses associadas a bivalves de
interesse econômico do Litoral e Baixo Sul da Bahia**

Mestranda: Verena Rebeca Dias de Andrade

Orientadora: Profª Dra. Guisla Boehs

ILHÉUS - BAHIA
2017

VERENA REBECA DIAS DE ANDRADE

**Bucefalose e outras parasitoses associadas a bivalves de
interesse econômico do Litoral e Baixo Sul da Bahia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientadora: Prof^a Dra. Guisla Boehs

**ILHÉUS - BAHIA
2017**

VERENA REBECA DIAS DE ANDRADE

**Bucefalose e outras parasitoses associadas a bivalves de interesse econômico
do Litoral e Baixo Sul da Bahia**

Ilhéus – BA, 24/02/2017

Guisla Boehs, Dra. (UESC)
(Presidente – Orientadora)

Aline Oliveira da Conceição, Dra. (UESC)

Gislaine Guidelli, Dra. (UFRB)

ILHÉUS - BAHIA

2017

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu refúgio nos momentos de dificuldade e principalmente por não me permitir duvidar.

À minha orientadora Guisla Boehs, pela paciência e por todos os ensinamentos sobre ciência, ética e profissionalismo. Obrigada por construir comigo esse trabalho!

Aos meus pais e à minha irmã Verônica, pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar.

Ao meu noivo Ricardo, por toda ajuda e incentivo. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma!

Ao time LMM, Gabi, Glau e Mary, pelos momentos de distração e também de ensinamentos estatísticos e moleculares. MUITÍSSIMO obrigada, meninas!

O meu muito obrigada à Bianca, por todo apoio, incentivo e ajuda. Bi, obrigada pelos momentos de conversa e ensinamentos dentro e fora da UESC.

Aos meus colegas de mestrado pela disponibilidade e por dividirem comigo suas experiências. Meu agradecimento especial à Jeane, por dividir seus sábados no laboratório comigo.

Às minhas amigas Elaine e Taís, pelos nossos encontros na hora do almoço e por me incentivarem com palavras positivas o tempo TODO!

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À UESC, pelo financiamento do estudo, através do Projeto PROPP 00220.1100.1478.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação PPG-Ciência Animal, em especial ao Eduardo, por toda a ajuda durante o curso.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com esse trabalho, sintam-se parte disso também. Obrigada amigos!

Bucefalose e outras parasitoses associadas a bivalves de interesse econômico do Litoral e Baixo Sul da Bahia

RESUMO

Ostras e sururus estão entre os principais bivalves consumidos ao longo da costa da Bahia. Esses moluscos representam um importante recurso econômico, principalmente para as comunidades litorâneas. Por serem organismos filtradores, bivalves são especialmente suscetíveis a várias associações com outros organismos presentes nas águas circundantes. Neste estudo, realizou-se o diagnóstico de parasitos associados a três espécies de bivalves, às ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. brasiliana* e ao sururu *Mytella guyanensis*, do Litoral e Baixo Sul da Bahia, tendo sido a primeira espécie coletada no manguezal e as demais em um cultivo em sistema espinhel. As coletas de *C. rhizophorae* (n = 75) foram feitas de abril a junho de 2016 nas localidades de Ilhéus e Camamu e as de *C. brasiliana* (n = 30) e de *M. guyanensis* (n = 40) em julho de 2016 em Taperoá. Os exemplares foram processados nos laboratórios da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Todos foram submetidos à análise macroscópica e histológica e quando houve diagnóstico presuntivo para bucefalose, foi feita análise molecular, incluindo extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e sequenciamento de DNA. A análise macroscópica evidenciou: (a) a presença do caranguejo pinoterídeo *Pinnotheres ostreum* em *C. rhizophorae*, com prevalência de 12% e (b) alterações na cor e textura de tecidos, típicas de bucefalose, em um exemplar de *M. guyanensis*. A análise histológica evidenciou associação parasitária com os protozoários: *Sphenophrya* sp., *Ancistrocoma* sp., *Perkinsus* sp., e *Nematopsis* sp. e com os metazoários *Urastoma* sp. e um Bucephalidae. *Nematopsis* sp. foi a única espécie comum a todos os hospedeiros, com prevalências de até 96% em *C. rhizophorae*, 90% em *C. brasiliana* e 85% em *M. guyanensis*, no qual causou destruição de tecidos. *Perkinsus* sp. foi comum às duas espécies de ostras, com prevalência de até 26,1% em *C. rhizophorae* e de 10% em *C. brasiliana*, sendo que este causou desorganização tecidual na glândula digestiva. Já o Bucephalidae, confirmado por análise molecular, ocorreu apenas em *M. guyanensis*, com prevalência de 5%, sendo que houve castração parasitária e destruição de tecidos. A salinidade, a temperatura, o habitat e as espécies hospedeiras influenciaram, de modo específico, na ocorrência e prevalência das parasitoses. Conclui-se que apesar dos danos causados por alguns parasitos, nenhuma das espécies investigadas encontra-se severamente ameaçada na região.

Palavras-chave: Trematódeo digenético. Bucephalidae. *Perkinsus*. *Nematopsis*. PCR. Sequenciamento. Ostra. Sururu.

Bucephalosis and other parasitic diseases associated with bivalves of economic interest on the Baixo and Litoral Sul of Bahia

ABSTRACT

Oysters and mussels are among the main bivalves consumed along the coast of Bahia state. These molluscs represent an important economic resource, especially for the coastal communities. Because they are filtering organisms, bivalves are especially susceptible to various associations with other organisms present in the surrounding waters. In the present study, were diagnosed the parasites associated with three bivalve species, the oysters *Crassostrea rhizophorae* and *C. brasiliana* and the swamp mussel *Mytella guyanensis*, all from the *Litoral* and *Baixo Sul* of Bahia state, northeast of Brazil. The first species was collected in the mangrove and the others in a longline oyster farming system. The samples of *C. rhizophorae* (n = 75) were obtained from April to June of 2016, in the localities of Ilhéus and Camamu and those of *C. brasiliana* (n = 30) and *M. guyanensis* (n = 40) were collected in July 2016 at the locality of Graciosa. The specimens were processed in the laboratories of the State University of Santa Cruz (UESC). All were submitted to macroscopic and histological analysis and when there was a presumptive diagnosis for bucephalosis, molecular analysis including DNA extraction, PCR (Polymerase Chain Reaction) and DNA sequencing were performed. Macroscopically, was evidenced (a) the presence of the crab *Pinnotheres ostreum* in *C. rhizophorae*, with a prevalence of 12%, and (b) alterations in the color and texture of tissues, typical of bucephalosis, in *M. guyanensis*. Histological analysis showed parasitic association with the protozoa: *Sphenophrya* sp., *Ancistrocoma* sp., *Perkinsus* sp., and *Nematopsis* sp. and with the metazoa *Urastoma* sp. and a Bucephalidae. *Nematopsis* sp. was the only species common to all hosts, with prevalences of up to 96% in *C. rhizophorae*, 90% in *C. brasiliana* and 85% in *M. guyanensis*, in which it caused tissue destruction. *Perkinsus* sp. was common to both species of oysters, with a prevalence of up to 26.1% in *C. rhizophorae* and 10% in *C. brasiliana*, which caused tissue disorganization in the digestive gland. The Bucephalidae, confirmed by molecular analysis, occurred only in *M. guyanensis*, with a prevalence of 5%, with parasitic castration and tissue destruction. Salinity, temperature, habitat and host species had a specific influence on the occurrence and prevalence of parasites. We concluded that despite the damages caused by some parasites, none of the species investigated is severely threatened in the region.

Key words: Trematode. Bucephalidae. *Perkinsus*. *Nematopsis*. PCR. Sequencing. Oyster. Mussel.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Nematopsis ostrearum*. Fonte: Lauckner (1983).....8
- Figura 2.** Mapa de localização dos pontos de coleta de *Crassostrea rhizophorae*, *C. brasiliana* e *Mytella guyanensis*.....11
- Figura 3.** Foto mostrando uma lanterna comum no cultivo de ostras (Foto do autor).....12
- Figura 4a.** Exemplar de *Crassostrea rhizophorae* sendo medido com um paquímetro, desde o umbo até a extremidade anterior; **Figura 4b.** Exemplar de *Mytella guyanensis* com as valvas abertas para análise macroscópica. Barra = 1 cm.....13
- Figura 5.** Esquema de uma gráticula de Weibel (Fonte: <http://www.agarscientific.com/eyepiece-graticules-o-p-q.html>).....14
- Figura 6.** Protozoários e metazoários em associação parasitária com três bivalves. A) *Sphenophrya* sp. (seta) nas brânquias de *Crassostrea rhizophorae*. Barra = 2 μ m; B) *Ancistrocoma* sp. (seta) no lúmen de túbulo da glândula digestiva de *C. rhizophorae*. Barra = 10 μ m; C) *Perkinsus* sp. (seta), como roseta no epitélio intestinal de *C. rhizophorae*. Barra = 5 μ m; D) Trofozoíto de *Perkinsus* sp. (seta) no epitélio dos túbulos da glândula digestiva em *C. rhizophorae*. Barra = 5 μ m; E) *Nematopsis* sp. em vários estágios: oocisto contendo esporozoíto (seta), gimnósporo (seta cheia) e oocisto sem esporozoíto (*) nas brânquias de *C. rhizophorae*. Barra = 10 μ m; F) Fagócito (seta) com dois oocistos de *Nematopsis* sp. no pé de *Mytella guyanensis*. Barra = 6 μ m; G) *Urastoma* sp. (seta) entre os filamentos branquiais de *C. brasiliana*. Barra = 20 μ m; H) Ocelo (seta cheia) de *Urastoma* sp.. Barra = 100 μ m; I) Esporocistos contendo massas germinativas e cercárias (seta) de Bucephalidae na gônada de *M. guyanensis*. Barra = 20 μ m.....23
- Figura 7.** Diagnóstico da PCR em gel de agarose (1,5%) corado com *Sybr* com bandas esperadas entre 500 e 600 pb produzidas pelo par de primers Bcph28SF/Bcph28SR e bandas inespecíficas próximas a 400 pb. Na primeira coluna encontra-se o controle negativo (C-), na segunda o marcador (M) em pares de bases, na terceira e quarta coluna encontra-se a amostra 1 em réplica (1a e 1b) e nas colunas cinco e seis a amostra 2 replicada (2a e 2b).....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados de temperatura e salinidade coletados entre abril e julho de 2016 em quatro pontos do Litoral Sul e Baixo Sul da Bahia.....18
- Tabela 2.** Prevalência (%) de parasitos associados a três espécies de bivalves de interesse econômico nos municípios de Taperoá, Camamu e Ilhéus, Bahia, entre abril e julho de 2016. n = 145; A = altura (cm); PS = Proporção Sexual Macho: Fêmea.....22

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo geral.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Moluscos bivalves e Enfermidades.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Área de Estudo.....	10
4.2. Espécies-alvo.....	10
4.3. Metodologia de amostragem.....	10
4.4. Metodologia laboratorial.....	12
4.4.1. Processamentos iniciais e análise macroscópica.....	12
4.4.2. Análise histológica.....	13
4.4.3. Estereologia.....	14
4.4.4. Análises moleculares de trematódeos digenéticos.....	14
4.5. Tratamento dos dados.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Dados abióticos.....	18
5.2. Biometria e análise macroscópica.....	18
5.3. Diagnóstico histológico.....	18
5.4. Diagnóstico molecular.....	24
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves são importantes recursos em todo o mundo, por apresentarem uma rica composição nutricional, incluindo, além de proteínas, componentes como o zinco e servindo de fonte de alimentação e de subsistência, principalmente para as comunidades litorâneas.

As ostras e os sururus estão entre as principais espécies de bivalves consumidas ao longo da costa do estado da Bahia, cujo extenso litoral possui, dentre outros ecossistemas, os manguezais, locais propícios para a reprodução e desenvolvimento desses organismos. As ostras podem ser comumente encontradas aderidas às raízes aéreas do mangue, enquanto que os sururus geralmente se aderem às raízes subterrâneas.

Nos últimos anos, a Bahia vem se estabelecendo como um estado produtor de ostras, onde os cultivos têm sido fonte de recurso econômico para as comunidades ribeirinhas, que vêm se beneficiando com a venda dos produtos cultivados, bem como com o extrativismo, incluindo o sururu, geralmente como uma renda complementar à pesca.

Além da importância alimentícia e econômica, os bivalves possuem também um importante papel ecológico, o que decorre do fato de serem filtradores e por isso podem ser utilizados como bioindicadores de poluentes ou de microrganismos presentes no ambiente onde vivem. Por esse motivo, esse mecanismo de nutrição torna-os mais suscetíveis a várias associações com outros organismos, como ao comensalismo e ao parasitismo.

No Brasil, os estudos sobre enfermidades em moluscos sofreram um grande avanço na última década, principalmente em decorrência do avanço das técnicas de diagnóstico e da criação de grupos de pesquisa. Na Bahia há cerca de vinte trabalhos publicados sobre o tema, o que já permite ter uma boa ideia da condição de saúde dos bivalves da região e assim, tanto subsidiar atividades de cultivo quanto realizar o manejo de estoques naturais.

Uma das enfermidades já constatada no estado da Bahia é a bucefalose, causada por trematódeos digenéticos da Família Bucephalidae. Esta pode ocorrer tanto em ostras quanto em sururus. Essa doença causa castração parasitária, inviabilizando o processo de reprodução do hospedeiro. Apesar de já ter sido observada em vários estudos realizados na Bahia, ainda não se identificou as espécies que causam essa enfermidade, uma vez que a identificação é de grande dificuldade, em função da morfologia, sinonímias e ciclos complexos desses parasitos. Para tentar se resolver tal questão, ferramentas moleculares podem ser utilizadas em associação a técnicas presuntivas tradicionais, como análise macroscópica e análise microscópica de tecidos. Trabalhos experimentais, envolvendo hospedeiros intermediários e

definitivos com o fim de completar o ciclo do parasito e então identificá-lo também podem ser feitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Diagnosticar parasitoses, com ênfase na identificação de trematódeos digenéticos, nos bivalves *Crassostrea rhizophorae*, *C. brasiliana* e *Mytella guyanensis* do Litoral e Baixo Sul da Bahia.

2.2. Objetivos específicos

- Inventariar parasitos associados às três espécies de bivalves;
- Verificar a prevalência de cada parasito;
- Avaliar a intensidade de infecção de cada parasitose;
- Efetuar a identificação genética de trematódeo (s) digenético (s) possivelmente associado (s) às espécies;
- Avaliar possíveis danos aos tecidos e órgãos dos hospedeiros por cada parasito;
- Avaliar o estado geral de saúde das espécies investigadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Moluscos bivalves e Enfermidades

Os moluscos da classe Bivalvia, como ostras, mexilhões, vieiras e berbigões, compõem o grupo de maior importância econômica entre os invertebrados marinhos e estes são explorados todos os anos em várias partes do mundo, em particular as ostras, que vêm sendo cultivadas em escala comercial há décadas (LAUCKNER, 1983).

No Brasil, de acordo com Boehs et al. (2012), os bivalves de maior interesse econômico são as ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), *C. brasiliana* (Lamarck, 1819) e *C. gigas* (Thunberg, 1793) (Ostreidae), sendo esta última exótica; os mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758), *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) e *M. falcata* (Orbigny, 1846) (Mytilidae); a lambreta *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Lucinidae); o moapem ou unha-de-velha *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Psammobiidae); o berbigão ou maçunim *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Veneridae); e a vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Pectinidae).

No tocante à produção brasileira, o consumo de moluscos tem aumentado nos últimos anos, acompanhando uma tendência geral da produção via Aquicultura no país. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food of Agriculture Organization of the United Nations*= FAO), está previsto que até 2025, o Brasil vai liderar esse setor nas Américas (FAO, 2016). Dentre os moluscos, as espécies de maior destaque na produção são ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897, acima mencionadas, e o mexilhão *Perna perna*, líder de produção em Santa Catarina (MPA, 2014), estado que é responsável por mais de 90% da produção nacional de bivalves via Aquicultura (FAO, 2012).

A ostra do Pacífico, também conhecida como ostra japonesa, *C. gigas*, é cultivada em larga escala, com produção de aproximadamente 2,5 mil toneladas/ano em Santa Catarina, que apresenta as condições climáticas (de temperaturas baixas) favoráveis ao seu desenvolvimento; já as espécies nativas *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*, além de produzidas em Santa Catarina e em alguns locais do Sudeste do país, são produzidas também nas regiões Norte e Nordeste (MPA, 2014). Sobre estas últimas, há uma imprecisão nos relatórios oficiais no que diz respeito aos números de produção das duas espécies. De modo geral, somente *C. rhizophorae* é mencionada (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2007; MPA, 2014) ou menciona-se apenas o gênero *Crassostrea*, não especificando as espécies (MPA, 2011). Tal posicionamento leva muitos estudos a seguir essa linha de raciocínio, como é o caso do

cultivo de ostras na Baía de Camamu, Bahia. Inicialmente, assumia-se que as ostras cultivadas nesse local pertenciam à espécie *C. rhizophorae*, porém um estudo recente elucidou que as ostras cultivadas nessa baía e também na região de Taperoá, localidade de Graciosa, Bahia (situada mais ao norte da Baía de Camamu) são da espécie *C. brasiliana* (BOEHS et al., em preparação). O resultado deste e de outro estudo realizado por Luz et al. (no prelo), esclarece outro questionamento, que diz respeito aos representantes do gênero *Crassostrea* reconhecidos como espécies aceitas e as quais, por consequência, são sinônimas, como é o caso de *C. gasar* (Deshayes, 1830), que está em sinônimia com *C. brasiliana*.

Crassostrea brasiliana é popularmente conhecida como “ostra de fundo” e recebe esse nome porque é geralmente encontrada no infralitoral, sedimentada a substratos consolidados, como a rochas e a estruturas de concreto, mas também pode ser observada aderida às raízes subterrâneas da vegetação do mangue, parcialmente enterrada em substrato inconsolidado (LUZ et al., no prelo). Já *C. rhizophorae* é encontrada sedimentada às raízes aéreas da *Rhizophorae mangle* L., árvore típica de manguezais, embora também possa ser encontrada aderida a substratos rochosos, predominantemente na região entremarés; recebe o nome popular de “ostra do mangue” e possui distribuição desde o Sul do Caribe, Venezuela, Suriname e em toda a costa do Brasil até o Uruguai (RIOS, 2009).

Outras espécies de moluscos também começaram a aparecer no cenário da produção nacional com certa relevância, como é o caso dos polvos, das lulas e de *M. guyanensis* (MPA, 2011). De acordo como o Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura, essa última espécie foi a segunda mais capturada no ano de 2011, ficando atrás apenas do mexilhão *P. perna*, obtido via produção e captura (MPA, 2011). Apesar de várias tentativas, ao contrário de *P. perna*, até o momento não se obteve sucesso no cultivo de *M. guyanensis*, o que se deve a dificuldades na obtenção de sementes (Boehs, comunicação pessoal).

No estado da Bahia *M. guyanensis* é um importante recurso extrativista, sendo explorada ao longo de toda a costa pelas populações litorâneas (CEUTA; BOEHS, 2012). Essa espécie possui uma ampla distribuição, que vai do México ao Peru, no Oceano Pacífico e da Venezuela ao Brasil, no Oceano Atlântico, ocupando as regiões entremarés e fixando-se em substratos consolidados através de uma estrutura dos mitilídeos denominada de bisso, geralmente nas raízes de plantas do mangue, como de *Rhizophorae mangle* (RIOS, 2009).

Além da sua importância na alimentação humana, os bivalves possuem também um importante papel ecológico como bioindicadores de poluentes e/ou de microrganismos presentes no ambiente onde vivem (SILVA NETA et al., 2015). Isso porque o processo de

nutrição ocorre através da filtração de águas circundantes, tornando-os mais suscetíveis a várias associações com outros organismos, como ao comensalismo e ao parasitismo (LEE; PANICKER; BEJ, 2003).

A relação simbiótica com outros organismos pode ser determinante para o fracasso da atividade de cultivo de moluscos, uma vez que o sistema de cultivo pode favorecer a propagação desses organismos devido à proximidade e densidade de indivíduos (SABRY, 2003). Nesse sentido, a avaliação microbiológica é um dos parâmetros importantes para a manutenção dos cultivos de bivalves (SILVA NETA et al., 2015). O segundo fator determinante no sucesso da boa produção e rentabilidade e na qualidade do produto para consumo são as enfermidades da espécie cultivada (SABRY, 2003; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013).

A parasitose é uma relação simbiótica em que o simbiote (parasito) causa danos ao hospedeiro (ANDERSON; MAY, 1978). Já a enfermidade é definida por Kinne (1983, p. 468) como “um desvio negativo, funcional e/ou estrutural, do estado normal e saudável de um organismo vivo, reduzindo as taxas de sobrevivência, crescimento, reprodução, obtenção de energia, tolerância ao estresse e capacidade de competição”. Segundo esse autor, essa definição caracteriza um fenômeno ecológico, pois além dos danos individuais ao hospedeiro, a enfermidade pode modificar a estrutura e dinâmica de todo o ecossistema.

Como revisado por Boehs et al. (2012), os principais agentes causadores de enfermidades em bivalves marinhos pertencem ao grupo dos vírus, bactérias, fungos, protozoários, trematódeos digenéticos, poliquetas e copépodes. Segundo essas autoras, outros organismos, como turbelários, cestóides e nematóides também podem estar associados a bivalves, porém, raramente causam doenças.

Alguns dos principais organismos associados a bivalves de interesse econômico do litoral brasileiro são os protozoários dos gêneros *Sphenophrya* e *Ancistrocoma* (Ciliophora), *Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e *Nematopsis* sp. (Apicomplexa), além dos platielmintos *Urastoma* sp. e representantes da família Bucephalidae (BOEHS et al., 2012). Segue abaixo descrição sucinta desses patógenos:

(a) *Sphenophrya* Chatton & Lwoff, 1921

Ciliados do gênero *Sphenophrya* podem ser observados nas brânquias e possivelmente no manto de ostras, em geral, sem apresentar uma resposta imune do hospedeiro (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994). Podem ocorrer extracelularmente ou, mais raramente (em

menos de 1% dos casos), intracelularmente e, nesse caso, quando o ciliado adentra a célula do hospedeiro, esta sofre hipertrofia formando tumores denominados de xenomas (LAUCKNER, 1983). Em um estudo realizado por Boehs, Lenz e Villalba (2009) na Baía de Camamu (BA), foi registrado o primeiro caso de xenoma em um bivalve da América do Sul, na ostra *C. rhizophorae*. Desde então, outros estudos no litoral do estado da Bahia, nas localidades de Valença, Camamu, Maraú e Canavieiras, relataram a ocorrência de *Sphenophrya* sp. em *M. guyanensis* (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012) e em *C. rhizophorae* (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015), com eventual formação de xenomas.

(b) *Ancistrocoma* Chatton & Lwoff, 1926

Normalmente associados a ostras, os ciliados do gênero *Ancistrocoma* são encontrados no lúmen dos túbulos da glândula digestiva (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994). Esses protozoários têm sido classificados como organismos comensais por alguns autores, pois os danos causados aos hospedeiros não são considerados relevantes (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994; SABRY et al., 2013). Na Bahia, além do estudo de Nascimento et al. (1986) na Baía de Todos os Santos, o ciliado *Ancistrocoma* sp. já foi relatado em *C. rhizophorae*, nos municípios de Valença, Camamu e Canavieiras (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013).

(c) *Perkinsus* Levine, 1978

O gênero *Perkinsus* inclui até o momento sete espécies, sendo *P. marinus* e *P. olseni* de notificação obrigatória ao *Office International des Epizooties / World Organization for Animal Health* = Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012). Esse gênero afeta moluscos do mundo inteiro, podendo causar mortalidade em massa, em especial aos bivalves, incluindo alguns de interesse econômico, como é o caso das ostras do gênero *Crassostrea* (LUZ et al., no prelo) e podendo causar uma enfermidade denominada de Perkinsiose. De acordo com Lauckner (1983), os patógenos desse gênero podem invadir qualquer tecido do hospedeiro, apesar de raramente serem observados em epitélios externos e nervos periféricos. Segundo esse autor, *Perkinsus marinus* causa infecções sistêmicas, com sinais de emaciação severa e aparência pálida da glândula digestiva na ostra *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791),

em que também ocasiona cessação do crescimento da concha, uma vez que danifica a função de secreção do manto.

Na Bahia, o primeiro registro de *Perkinsus* sp. foi feito em dois pontos da Baía de Camamu e em um ponto do Rio Graciosa (Taperoá) na ostra *C. rhizophorae* e apesar de não ter sido constatada mortalidade associada a este patógeno, foi relatada alta intensidade e prevalência (BRANDÃO et al., 2013). Outros estudos mais recentes, também realizados na Baía de Camamu, investigando tanto *C. rhizophorae* quanto *C. brasiliiana*, relataram a presença de *P. beihaiensis* (LUZ, BOEHS, 2016; LUZ et al., no prelo). *Perkinsus marinus*, de notificação obrigatória à OIE, foi também identificada na região, por meio de análise proteômica, na ostra *C. rhizophorae* (PINTO et al., 2016).

(d) *Nematopsis* Schneider, 1892

De acordo com revisão feita por Boehs et al. (2012), gregarinas do gênero *Nematopsis* possuem um ciclo de vida bastante complexo, utilizando bivalves como hospedeiros intermediários e crustáceos como hospedeiros definitivos (**Figura 1**). Esses protozoários são parasitos intrahemocíticos e podem infectar bivalves na forma de gimnósporos e oocistos (esporos com parede hialina espessa contendo um ou mais esporozoítos basofílicos de formato vermiforme e uninucleado) ou ainda na forma de esporozoítos nus (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994). Os principais locais de infecção são as brânquias e o manto, mas também podem ser encontrados na glândula digestiva, nos palpos labiais e no pé (BOEHS et al., 2012). Esses parasitos estão comumente associados a altas prevalências no estado da Bahia, entretanto em *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) constatou-se baixas prevalências em um estudo realizado por Boehs et al. (2010), no Rio Cachoeira, Ilhéus (Bahia), em que, ao contrário, observou-se alta prevalência desse parasito em *M. guyanensis* do mesmo local. Outros estudos, desenvolvidos por Pinto e Boehs (2008) no Rio Cachoeira (Ilhéus, Bahia) e por Ceuta e Boehs (2012) na Baía de Camamu (Bahia), também registraram *Nematopsis* sp. em *M. guyanensis*, e igualmente, Zeidan, Luz e Boehs (2012) registraram *Nematopsis* sp., tanto em *M. guyanensis* quanto na ostra *C. rhizophorae* nas localidades de Valença, Camamu e Canavieiras, todas na Bahia. Há ainda outros dois estudos realizados na Baía de Camamu com *C. rhizophorae* (BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015) e um em Graciosa, Taperoá (COVA et al., 2015).

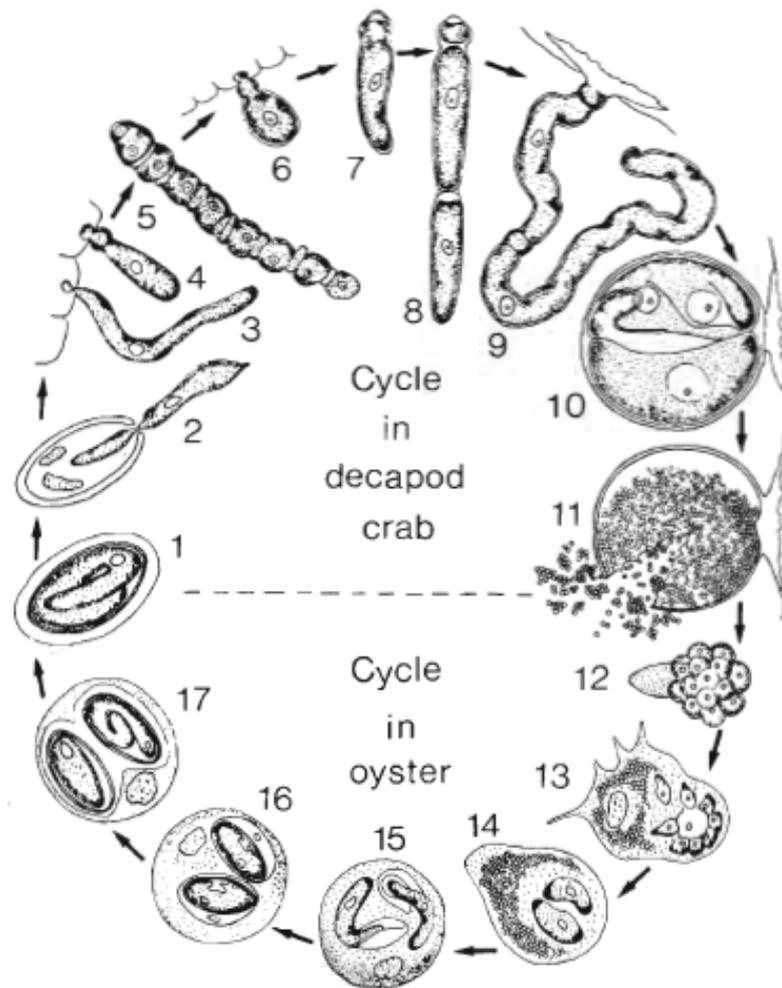


Fig. 13-25: *Nematopsis ostrearum*. Life cycle. 1: Oocyst from *Crassostrea virginica* containing sporozoite; 2: sporozoite escaping from spore in crab intestine; 3: attachment to host's intestinal epithelium; 4: development into trophozoite; 5: association of trophozoites; 6: temporary reattachment to intestinal epithelium; 7: development into mature gamont; 8-9: syzygy followed by attachment to crab's rectum; 10: gametocyst formation; 11: liberation of gymnospores from ruptured gametocyst; 12: single gymnospore; 13: engulfment of gymnospore by oyster phagocyte and disruption of gymnospore; 14-16: sporozoite growth within phagocyte; 17: formation of resistant oocysts within phagocyte. (After Prytherch, 1940.)

Figura 1. Ciclo de vida de *Nematopsis ostrearum*. Fonte: Lauckner (1983).

(e) *Urastoma* Dörler, 1900

Os turbelários do gênero *Urastoma* pertencem ao filo Platyhelminthes e são comumente denominados de vermes das brânquias, pois é o local onde são encontrados; de modo geral, são classificados como comensais, por geralmente não causarem danos ao hospedeiro (LAUCKNER, 1983). Dos estudos realizados na Bahia, em nenhum se verificou danos causados por *Urastoma* sp., quer seja em *M. guyanensis* coletada em Camamu e em Canavieiras (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012) ou em *C. rhizophorae* coletada nas localidades

de Graciosa (Taperoá), Camamu e Canavieiras (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015).

(f) Bucephalidae Poche, 1907

A família Bucephalidae integra a Classe Digenea do Phylum Platyhelminthes, reconhecida anteriormente como a classe dos trematódeos digenéticos. Segundo Boehs et al. (2012), o nome desse táxon faz alusão ao ciclo de vida desse metazoário, que necessita de pelo menos duas espécies de hospedeiros diferentes para completar seu ciclo; no caso dos bucefalídeos, seus ciclos de vida são extremamente complexos, tendo um molusco (geralmente um bivalve), como primeiro hospedeiro intermediário para a sua fase de esporocisto e peixes como segundo hospedeiro intermediário (abrigando a fase de metacercária) e hospedeiro definitivo (abrigando a fase adulta do parasito). Ainda conforme essas autoras, de modo geral, os trematódeos digenéticos são um grupo de grande importância para os bivalves, pois provocam sérios danos ao hospedeiro e dentre eles a castração parasitária, inviabilizando a reprodução e consequentemente comprometendo estoques naturais e cultivados.

No que diz respeito ao estado da Bahia, os relatos de bucefalídeos são de baixa prevalência, porém em todos os estudos em que o diagnóstico foi positivo para esses parasitos, houve castração parasitária. As espécies de bivalves susceptíveis a essa associação parasitária foram *M. guyanensis* (CEUTA; BOEHS, 2012; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012;) *C. rhizophorae* (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015) e *Lucina pectinata* (RIBEIRO et al., no prelo), todos coletados em locais do Litoral e Baixo Sul da Bahia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

Segundo política e gestão da Secretaria de Planejamento do Governo da Bahia (SEPLAN), o estado está dividido em 27 Territórios de Identidade¹, entre os quais está o Litoral Sul da Bahia, que é formado por 26 municípios, entre os quais estão Canavieiras, Ilhéus, Itacaré e Marau e o Baixo Sul, constituído por 15 municípios, entre os quais estão Valença, Taperoá e Camamu (SEPLAN, 2016). Ao longo dessa área, podem ser encontrados vários ecossistemas da Zona Costeira, como praias, restingas, lagunas e manguezais. Este último, considerado berçário para muitas espécies aquáticas, caracteriza-se pela influência flúvio-marinha tipicamente estuarina, com um solo não consolidado, que varia entre lamoso e arenoso, e pela vegetação de espécies predominantemente arbóreas, como *Rhizophora mangle*, popularmente conhecida como mangue vermelho (IBAMA, 2005).

O clima do litoral do estado da Bahia é quente e úmido, com temperatura média anual de 25°C, com pluviosidade de 2.400 a 2.500 mm ano (CRA, 1995).

4.2. Espécies-alvo

Foram utilizadas no estudo as ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. brasiliana* e o sururu *Mytella guyanensis*. Os critérios para a escolha dessas espécies foram a sua importância econômica para as comunidades tradicionais litorâneas da região, o interesse para o cultivo, assim como o histórico de patógenos já observados nessas espécies.

4.3. Metodologia de amostragem

As amostras da ostra *C. rhizophorae* foram coletadas (n = 25/local) mensalmente de abril a junho de 2016 em três pontos ao longo do Litoral Sul e Baixo Sul da Bahia, sendo: Ponto 1 - Sapetinga, Ilhéus (14°48'S; 39°2'W), Ponto 2 - Cajaíba, na Baía de Camamu (13°57'S; 39°1'W) e Ponto 3 - Cais de Camamu, Camamu (13°56'S; 39°6'W). No mês de julho de 2016, foram adicionalmente amostrados 30 exemplares de *C. brasiliana* e 40 de *M.*

¹ O território é conceituado como um espaço físico, geograficamente definido, geralmente contínuo, caracterizado por critérios multidimensionais, tais como o ambiente, a economia, a sociedade a cultura, a política e as instituições, e uma população com grupos sociais relativamente distintos, que se relacionam interna e externamente por meio de processos específicos, onde se pode distinguir um ou mais elementos que indicam identidade, coesão social, cultural e territorial.

guyanensis no Ponto 4 - Rio Graciosa, Taperoá (13°28'S; 39°5'W) (**Figura 2**), totalizando 145 animais para análise.

Nos pontos 1 a 3 a ostra *C. rhizophorae* foi retirada das partes aéreas do mangue vermelho *R. mangle*. A coleta foi feita manualmente, sendo que para a retirada desta utilizou-se uma faca. No Ponto 4, tanto a ostra (*C. brasiliana*) quanto o sururu (*M. guyanensis*) foram obtidos de um cultivo em sistema espínhel (= *long line*), sendo que os exemplares deste último encontravam-se externamente aderidos às lanternas, que continham a ostra (**Figura 3**). Todos os exemplares foram armazenados em baldes contendo uma pequena quantidade de água do mar em que foram imediatamente transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foram colocados em um aquário e processados nos dias subsequentes.

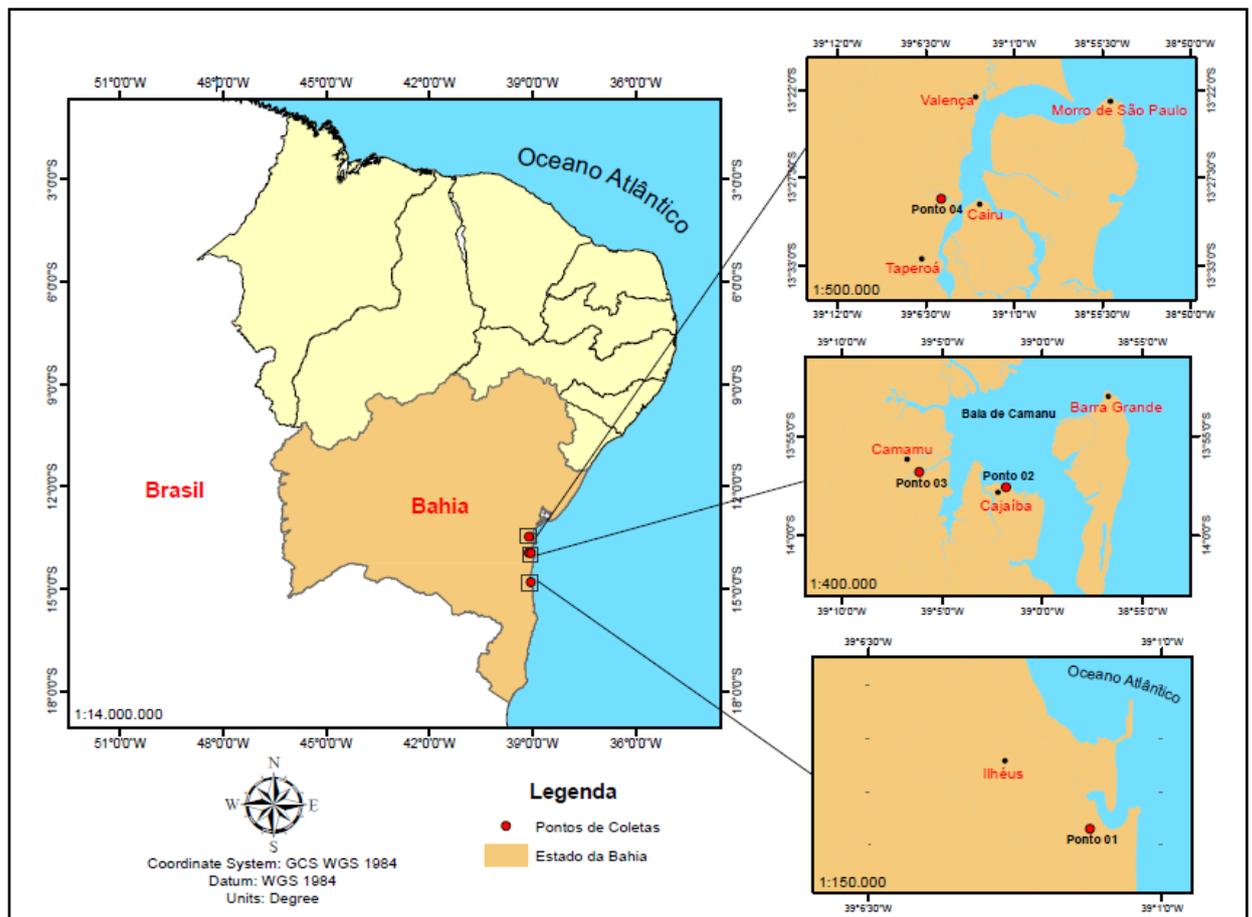


Figura 2. Mapa de localização dos pontos de coleta de *Crassostrea rhizophorae*, *C. brasiliana* e *Mytella guyanensis*.

A temperatura e a salinidade da água de cada local foram medidas a cada coleta com o uso de um termômetro de mercúrio padrão e de um refratômetro óptico manual da marca Atago S/Mill, respectivamente.

As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, através do Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (Autorização 20912-3).



Figura 3. Foto mostrando uma lanterna comum no cultivo de ostras (Foto do autor).

4.4. Metodologia laboratorial

4.4.1. Processamentos iniciais e análise macroscópica

Após retirada dos aquários, ostras e sururus foram limpos externamente sob torneira com o auxílio de uma escova. Em seguida, todos os exemplares foram medidos no seu eixo dorso-ventral (altura) (GALTSOFF, 1964), usando-se um paquímetro digital (**Figura 4a**). Posteriormente, os exemplares foram abertos com o uso de uma faca e então analisados macroscopicamente quanto à presença de simbiontes, assim como de sinais clínicos de enfermidades, como alterações de coloração e textura do tecido (**Figura 4b**).



Figura 4a. Exemplar de *Crassostrea rhizophorae* sendo medido com um paquímetro, desde o umbo até a extremidade anterior; **4b.** Exemplar de *Mytella guyanensis* com as valvas abertas para análise macroscópica. Barra =1 cm.

4.4.2. Análise histológica

Nas ostras, foram obtidos, com um bisturi, três fragmentos de cada exemplar, utilizando-se corte transversal de modo a incluir sessões dos órgãos: brânquias, manto, músculo adutor, glândula digestiva e demais porções do tubo digestivo e gônadas. Um terço do tecido de cada exemplar foi colocado em tubo *ependorf* e armazenado em congelador para procedimento molecular e o restante (2/3) foi fixado em solução de Bouin por 20-24 horas, dentro de um cassete histológico. Em *M. guyanensis* foi feito apenas um corte, no sentido transversal (de modo a incluir os órgãos acima mencionados para as ostras e também o pé, ausente nestas) e igualmente ao procedimento para ostras, uma porção foi armazenada em tubo *ependorf* e congelada para posterior procedimento molecular e a outra fixada em solução de Bouin pelo mesmo período das ostras.

Passado o período de fixação, os tecidos foram abundantemente lavados em água corrente até que a cor amarelada da solução de Bouin saísse por completo. Para contribuir ainda mais com o processo de lavagem, estes foram imersos por 10 minutos em álcool 70% contendo um pouco de bicarbonato de sódio, a temperatura de a 35-40°C. Posteriormente, foram transferidos para um novo álcool 70% e foi então iniciado o processamento histológico de rotina, incluindo série crescente de desidratação alcoólica, diafanização em xilol e inclusão em parafina, com base em Howard et al. (2004). Atenção especial foi dada à inclusão dos tecidos em parafina, de modo que, no caso das ostras, uma das peças ficasse posicionada para proporcionar secções transversais e a outra para secções longitudinais, como as do sururu.

Os cortes foram feitos em série, utilizando um micrótomo programado para uma espessura de 7 µm. Posteriormente, foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE)

e finalizados com bálsamo do Canadá para selar a lamínula. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz em aumentos de 5 a 100 x. Foi feita contagem visual de parasitos e em alguns casos foi usada estereologia, descrita abaixo. O tamanho de cada parasito foi obtido com o auxílio de ocular com escala graduada acoplada ao microscópio Olympus CX 31.

4.4.3. Estereologia

Criada por Lowe et al. (1994), essa técnica, que mensura a intensidade de infecção/infestação de um parasito, faz uso de uma gráticula graduada acoplada à ocular do microscópio óptico, denominada de gráticula de Weibel, em que cinco campos dos tecidos do hospedeiro são observados e é calculada a área do tecido ocupada pelo parasito (TP) (**Figura 5**). A técnica foi usada para o cálculo da infestação por trematódeo digenético.

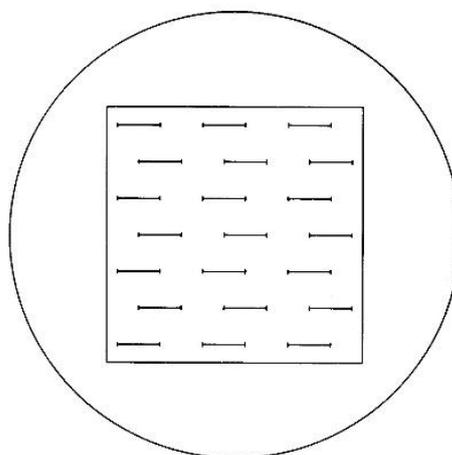


Figura 5. Esquema de uma gráticula de Weibel (Fonte: <http://www.agarscientific.com/eyepiece-graticules-o-p-q.html>)

4.4.4. Análises moleculares de trematódeos digenéticos

Extração de DNA

Os tecidos de exemplares em que se constatou a presença de trematódeo digenético pela histologia, foram descongelados e depois, com o auxílio de uma tesoura e uma balança de precisão, um pedaço de até 25 mg de cada tecido foi cortado da porção inicial e depois macerado em um cadinho contendo nitrogênio líquido, suficiente apenas para a embebição do mesmo, sendo que em seguida o macerado foi armazenado em um microtubo estéril. Entre a maceração do tecido de uma amostra e outra, todos os materiais utilizados foram lavados e limpos com álcool. Para a extração do DNA, foi utilizado o kit *Mini-Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen®)* e foi seguido o protocolo destinado para tecidos proposto pelo fabricante,

que inclui etapas de digestão, lise, lavagens e eluição do DNA. Ao final da extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (*Thermo Scientific*).

Desenho dos primers

Para identificar a espécie (s) de trematódeo (s) digenético (s) deste estudo, foi necessário desenhar um *primer forward* e um *reverse*. Para tal, foram selecionadas quatro espécies de *Bucephalus*, cujos genomas estão depositados no GenBank da plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As espécies foram:

1. *Bucephalus cynoscion* Hopkins, 1956 (KT273397)²;
2. *B. gorgon* (Liton, 1905) Eckmann, 1932 (KT273400);
3. *B. margaritae* Ozaki & Ishibashi, 1934 (KT273395);
4. *B. polymorphus* von Baer, 1827 (JQ346717).

O genoma de cada uma dessas espécies foi anexado ao programa BioEdit, onde as sequências foram alinhadas e avaliadas quanto às regiões conservadas e variáveis. O par de *primers* Bcph28SF (5'GCATCGACATCTTGAACGC 3') e Bcph28SR (5' CCTCCGCTTAGTGATATGCTTAA3') desenhado a partir do alinhamento, possui a capacidade de anelar em qualquer uma das espécies de *Bucephalus* supracitadas. Tais *oligos* foram solicitados e entregues pela empresa Induslab.

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Uma PCR convencional, também denominada PCR qualitativa (qPCR), foi realizada. As reações tiveram um volume de 25 µl cada, contendo H₂O ultrapura, tampão de PCR 1x concentrado, MgCl₂ a 1,5 mM, nucleotídeos a 0,2 mM cada, *primers* (supramencionados) diluídos a 10 pmol, uma unidade de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*®) e DNA genômico, que variou entre 15 e 103 ng. Não foi utilizado um controle positivo, uma vez que não havia espécies do gênero *Bucephalus* (supostamente presente nas amostras) identificadas previamente. Para o controle negativo foi usada água ultrapura. O protocolo incluiu desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

² Entre parênteses, o código de acesso do genoma das espécies utilizadas para desenhar o par de primers.

Oito microlitros (8 μ l) de cada produto da PCR foram separados por 40 minutos em gel de agarose e tampão Tris-ácido acético-EDTA (TAE) a 1,5%, corados com *Sybr Safe*[®] e visualizados usando luz UV.

Nested PCR

Com os produtos da qPCR, foi realizada uma *nested* PCR, para amplificar ainda mais a quantidade de DNA do parasito. Como o intuito era aumentar a quantidade de *amplicons*, foi utilizado o mesmo par de *primers* (Bcph28SF e Bcph28SR). As reações de *nested* PCR tiveram um volume de 50 μ l cada e esse volume foi utilizado para que as bandas pudessem ser posteriormente purificadas em gel. Foram utilizados os mesmos componentes da qPCR para a *nested*, com exceção do DNA genômico, que foi substituído pelo produto da qPCR. Também foram utilizados os mesmos parâmetros de temperatura e tempo da reação convencional. Os produtos da *nested* PCR, entre 45 e 50 μ l, foram completamente utilizados para separação em gel de agarose e TAE a 1,5%. Estes foram pipetados de modo que sempre tivesse um poço vazio entre eles. O tempo de corrida foi de 60 minutos. O gel foi corado em Brometo de Etídio por 20 minutos e visualizado em luz UV.

Purificação das bandas de DNA em gel de agarose

As amostras que apresentaram mais de uma banda no gel foram submetidas ao processo de purificação. Este procedimento consiste em cortar a banda de interesse diretamente do gel para obter apenas o DNA que se deseja, sem regiões inespecíficas. Tem início imediatamente após a visualização em luz UV do gel corado com Brometo de Etídio. Foi preciso tomar alguns cuidados nessa etapa, pois além de o Brometo ser extremamente nocivo à saúde, para cortar a banda do gel é necessário se expor à luz UV. Por isso, a proteção principalmente dos olhos e do rosto é fundamental a fim de evitar queimaduras.

Utilizando uma navalha histológica, foram feitos corte transversais e paralelos às bandas para delimitar sua localização, depois com uma lâmina de bisturi foi retirado o máximo de excesso de gel sem que a banda fosse danificada. Com o auxílio de uma pinça o pedaço do gel contendo a banda de DNA foi transferido para um tubo estéril de 1,5-2 ml. Tanto as bandas de interesse quanto as inespecíficas foram purificadas. A purificação propriamente dita foi feita com o *PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen*[®]), seguindo as instruções do fabricante para purificação de produtos de PCR em gel de agarose utilizando centrífuga. As etapas constituíram de pesagem do fragmento do gel, após a excisão,

solubilização com tampão para desintegrar o gel, lavagem e eluição. O DNA eluído após a purificação foi novamente quantificado no espectrofotômetro e mais uma vez submetido à qPCR, para se obter uma concentração adequada (entre 30 e 60 ng) para o sequenciamento.

Sequenciamento de DNA e análise filogenética

As amostras foram sequenciadas pela empresa Ludwig Biotecnologia Ltda. (Porto Alegre, RS), fazendo-se uso das amostras purificadas e mediante uso de um sequenciador automático (AB 3500 Genetic Analyzer) equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados com o auxílio de três softwares: FinchTV, BioEdit e BLAST (NCBI) para comparação de similaridade.

4.5. Tratamento dos dados

A prevalência de cada parasito foi calculada pelo número de bivalves infectados/número total de bivalves coletados x 100 (BUSH et al., 1997), para cada ponto.

Foram calculados também a média e o desvio padrão para a intensidade obtida por contagem visual, para a biometria das espécies-alvo e dimensões dos organismos associados.

A equação $TP/21 \times 100$ foi utilizada para calcular a intensidade de infestação de cada um dos cinco campos analisados na técnica de estereologia, sendo que em seguida foi feita uma média desses campos, cujo resultado foi avaliado de acordo com a escala de Lowe et al. (1994) em quatro níveis de infestação:

- I – Leve = < 5% de TP;
- II – Moderada = 5-25% de TP;
- III – Alta = 25-50% de TP;
- IV – Muito alta = > 50% de TP.

A análise de variância utilizando Kruskal-Wallis avaliou as diferenças nas prevalências de parasitos que ocorreram em todos os locais e nos três hospedeiros, utilizando-se o intervalo de confiança de 95% e o programa estatístico (*software*) *Origin 8*.

5. RESULTADOS

5.1. Dados abióticos

A temperatura da água variou entre 23 e 29°C e a salinidade entre 0 e 35 PSU (Unidades Práticas de Salinidade) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados de temperatura e salinidade coletados entre abril e julho de 2016 em quatro pontos do Litoral Sul e Baixo Sul da Bahia.

	Ponto 1 (Sapetinga)	Ponto 2 (Cajaíba)	Ponto 3 (Cais de Camamu)	Ponto 4 (Graciosa)
Temperatura (°C)	23	29	26	25
Salinidade (PSU)	35	28	13	0

5.2. Biometria e análise macroscópica

As informações sobre o tamanho dos animais analisados estão apresentadas na **tabela 2**.

A análise macroscópica evidenciou a presença de três pares (1 macho e 1 fêmea) de *Pinnotheres ostreum* Say, 1817 (Pinnotheridae De Haan, 1833) que encontravam-se vivos na cavidade palial de três exemplares da ostra *C. rhizophorae* (medindo de 4,5 a 5 cm de altura) provenientes do Ponto 2 - Cajaíba. Nos demais pontos, não houve evidência macroscópica de parasitos ou de sinais clínicos de enfermidades, com exceção de um exemplar de *M. guyanensis* do Ponto 4 - Graciosa, que apresentou tecidos gonádicos com textura fibrosa e coloração alterada para um tom alaranjado, indicativos da “doença laranja” (bucefalose) causada por trematódeos digenéticos da família Bucephalidae.

5.3. Diagnóstico histológico

A proporção de ostras em estágio feminino³ para ostras em estágio masculino foi de 2,4: 1 no Ponto 1, sendo que dois exemplares apresentaram gônadas indiferenciadas; 5,2: 1 no Ponto 2; 7,3: 1 no Ponto 3; e no Ponto 4, das 30 ostras coletadas, 22 apresentaram gônadas

³ As ostras do gênero *Crassostrea* são hermafroditas sequenciais, com tendência a protandria (GALTSOFF, 1964).

indiferenciadas, seis foram fêmeas, porém apenas um exemplar apresentou gametas maduros e os outros apresentaram a gônada em estágio de diferenciação, e duas eram machos (proporção de 3:1). *Mytella guyanensis* apresentou proporção fêmea: macho de 4,1: 1, além de quatro exemplares em que não foi possível identificar o sexo, dois deles por conta de castração parasitária (**Tabela 2**).

A análise microscópica dos cortes histológicos evidenciou protozoários e metazoários associados aos hospedeiros deste estudo. O ciliado *Sphenophrya* sp. (Ciliophora: Sphenophryidae) foi observado exclusivamente em *C. rhizophorae*, enquanto que *Ancistrocoma* sp. (Ciliophora: Ancistrocomidae), *Urastoma* sp. (Platyhelminthes: Turbellaria: Urostomidae) e *Perkinsus* sp. (Perkinsozoa) ocorreram em ambas as espécies de ostras (*C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*), não tendo sido observados em *M. guyanensis*. Já um trematódeo digenético, identificado como sendo da família Bucephalidae, foi observado apenas em *M. guyanensis*. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinidae) foi observada nos três bivalves (**Tabela 2; Figura 6**).

Sphenophrya sp. foi observada nos filamentos branquiais de apenas um exemplar de *C. rhizophorae* coletado no Ponto 2 - Cajaíba (**Tabela 2; Figura 6**). Apresentou núcleo basofílico (intensamente corado por hematoxilina, que é um corante básico e que cora estruturas ácidas) e seu tamanho variou entre 2 e 3 µm (Média = 2,4 DP± 0,5 µm). Foram observados 136 parasitos por corte histológico, sendo que todos se apresentaram extracelularmente e individualizados, sem formação da lesão conhecida por xenoma, causada por esse parasito. Não houve danos aparentes ao epitélio branquial do hospedeiro e nem sinais claros de reação hemocitária.

Ancistrocoma sp. foi observada no lúmen dos ácinos da glândula digestiva em *C. rhizophorae*, apenas no Ponto 1 - Sapetinga, em prevalência de 24% (**Tabela 2; Figura 6**) e em apenas um exemplar de *C. brasiliiana*. Esse ciliado, caracteristicamente oval, com núcleo granuloso, apresentou intensidade muito baixa em *C. brasiliiana*, de apenas 1 ciliado por corte histológico, que mediu 7 µm. Já em *C. rhizophorae*, essa intensidade variou de 1 a 14 ciliados por corte histológico, com medidas que variaram entre 3 até 9 µm (Média = 4,5 DP ± 1,4 µm; n = 18). De modo geral, ocorreu um protozoário por ácino, porém, em dois exemplares de *C. rhizophorae*, observou-se dois ciliados ocupando o mesmo ácino. A coloração do núcleo foi tanto basofílica quanto eosinofílica (intensamente corado por eosina, um corante ácido, com afinidade por estruturas básicas) em *C. rhizophorae*, ao passo que em *C. brasiliiana*

apresentou-se eosinofílica. Nenhuma das espécies hospedeiras apresentou alteração de tecidos devido à presença deste ciliado.

Trofozoítos e esquizontes (rosetas) de *Perkinsus* sp. foram visualizados na glândula digestiva e no intestino de *C. rhizophorae* e de *C. brasiliiana*, sendo esse último lugar o de mais frequente visualização desse parasito (**Figura 6**). A prevalência mais alta (26,1%) foi registrada em *C. rhizophorae*, no Ponto 2 – Cajaíba e a mais baixa (10%) ocorreu em *C. brasiliiana*, no Ponto 4 – Graciosa (**Tabela 2**). Em alguns exemplares infectados, ocorreu desorganização celular no epitélio do intestino. O teste Kruskal-Wallis evidenciou diferença significativa ($p = 0,004$; $n = 4$) entre locais.

Nematopsis sp. foi observada em diferentes prevalências, nos três hospedeiros (**Tabela 2; Figura 6**). A maior prevalência (96%) foi registrada na ostra *C. rhizophorae* coletada no Ponto 1 – Sapetinga. O tamanho dos oocistos variou entre 3 e 8 μm (Média = 4,4 DP \pm 0,5 μm ; $n = 24$) no Ponto 1 – Sapetinga, entre 3 e 6 μm (Média = 4,1 DP \pm 0,4 μm ; $n = 12$) no Ponto 2 – Cajaíba, e entre 3 e 11 μm (Média = 4,5 DP \pm 0,8 μm ; $n = 18$) no Ponto 3 – Cais de Camamu. Em *C. brasiliiana*, esse parasito mediu de 3 a 7 μm (Média = 4,4 DP \pm 0,4 μm ; $n = 27$) e em *M. guyanensis* de 2 a 4 μm (Média = 2,5 DP \pm 0,3 μm ; $n = 34$), ambos coletados no Ponto 4 – Graciosa. A ocorrência de *Nematopsis* sp. nas duas espécies de ostras foi mais frequente nas brânquias e no manto, seguida pela glândula digestiva e músculo adutor. As gônadas foram o local com menor frequência de ocorrência desse parasito. Já em *M. guyanensis*, a frequência do parasito foi maior no pé e nas brânquias, seguido pela glândula digestiva, manto e músculo adutor. Nas três espécies, na maioria das vezes, a quantidade de oocistos por fagócito ficou entre um e três, contudo fagócitos com até seis oocistos foram observados no pé de *M. guyanensis* e em *C. rhizophorae* foram vistos até cinco oocistos por fagócito em todos os órgãos nos pontos 1 – Sapetinga e 3 – Cais de Camamu.

A contagem visual para a avaliação de intensidade de infecção de *Nematopsis* sp. permitiu contabilizar entre 3 e 153 oocistos por corte histológico (Média = 49,3; DP \pm 48,7; $n = 24$ cortes) em *C. rhizophorae* no Ponto 1 - Sapetinga, entre 2 e 29 (Média = 9,6; DP \pm 7,6; $n = 12$ cortes) nessa mesma espécie no Ponto 2 - Cajaíba e entre 1 e 294 oocistos (Média = 28,9; DP \pm 66,8; $n = 18$ cortes) em *C. rhizophorae* no Ponto 3 - Cais de Camamu. *Crassostrea brasiliiana*, coletada apenas no Ponto 4 – Graciosa, apresentou entre 1 e 51 oocistos/corte histológico (Média = 17,6; DP \pm 11,6; $n = 27$ cortes), enquanto que *M. guyanensis*, também coletada apenas nesse local, apresentou entre 3 e 512 oocistos/ corte

histológico (Média 83,7; DP \pm 121,3; n = 34 cortes). Além dos oocistos, sempre contendo um único esporozoítio, que teve coloração ora basofílica ora eosinofílica, foram observados oocistos vazios, apresentando apenas a parede hialina, esporozoítios nus e gimnósporos em 54 dos 145 animais analisados, correspondendo a 37,24% dos casos. Nenhuma das espécies de ostra apresentou qualquer alteração ao parasito, já exemplares de *M. guyanensis* com alta intensidade de infecção apresentaram dano tecidual (desconfiguração e destruição de tecidos). Houve diferença significativa de prevalência ($p = 1,23e^{-5}$; n = 5) entre os locais de amostragem.

O turbelário *Urastoma* sp. ocorreu nos filamentos branquiais das duas espécies de ostras. A prevalência foi de 16% em *C. rhizophorae* no Ponto 1 – Sapetinga e de 70% em *C. brasiliiana* no Ponto 4 – Graciosa, os únicos locais de ocorrência dessa associação (**Tabela 2; Figura 6**). A intensidade também variou bastante entre as duas espécies. Em *C. rhizophorae*, *Urastoma* sp. ocorreu apenas no Ponto 1 – Sapetinga, sendo um turbelário por corte histológico, com tamanhos variando entre 20 e 42 μm (Média = 32,3; DP \pm 11,2 μm ; n = 3 cortes), sendo que um mediu mais de 100 μm . Em *C. brasiliiana*, a intensidade variou de 1 a 13 turbelários por corte histológico (Média = 4,6; DP \pm 3,6) e o comprimento destes esteve entre 18 e 100 μm (Média = 58,8; DP \pm 20,9 μm ; n = 85 turbelários), além de 11 que mediram mais de 100 μm . Aparentemente, *Urastoma* sp. não causou danos às brânquias das ostras.

Esporocistos contendo massas germinativas e cercárias em diferentes estágios de desenvolvimento de um Bucephalidae foram encontrados em dois exemplares de *M. guyanensis*, estando localizados na gônada, na glândula digestiva e nos filamentos branquiais adjacentes (**Tabela 2; Figura 6**). A intensidade de infecção variou entre alta e muito alta (36,2 a 58% de TP). A gônada foi o local com maior intensidade de infecção, enquanto que as brânquias apresentaram intensidades menores. Os danos causados ao hospedeiro foram evidentes, tendo sido observada castração parasitária e em um dos exemplares foi observada também degradação parcial de outros tecidos.

Células marrons (*brown cells*) estiveram presentes em 22 das 30 amostras (73,3%) de *C. brasiliiana*, com intensidades altas na maioria dos cortes histológicos.

Tabela 2. Prevalência (%) de parasitos associados a três espécies de bivalves de interesse econômico nos municípios de Taperoá, Camamu e Ilhéus, Bahia, entre abril e julho de 2016. n = 145; A = altura (cm); PS = Proporção Sexual Macho: Fêmea; -- Ausência de parasitos.

Parasitos	Espécies hospedeiras				
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>			<i>Crassostrea brasiliana</i>	<i>Mytella guyanensis</i>
	Ponto 1 – Sapetinga n=25 A=4,9±1 PS =1: 2,4	Ponto 2 – Cajaíba n=25 A=4,8±0,9 PS=1: 5,2	Ponto 3 – Cais Camamu n=25 A=4,9±0,9 PS=1: 7,3	Ponto 4 – Graciosa n= 30 A=6,8±0,9 PS=1: 3	Ponto 4 – Graciosa n= 40 A=4,7±0,3 PS= 1: 4,1
<i>Sphenophrya</i> sp.	--	4	--	--	--
<i>Ancistrocoma</i> sp.	24	--	--	3,3	--
<i>Perkinsus</i> sp.	20	26,1	12	10	--
<i>Nematopsis</i> sp.	96	48	72	90	85
<i>Urastoma</i> sp.	16	--	--	70	--
Bucephalidae	--	--	--	--	5
<i>Pinnotheres ostreum</i>	--	12	--	--	--

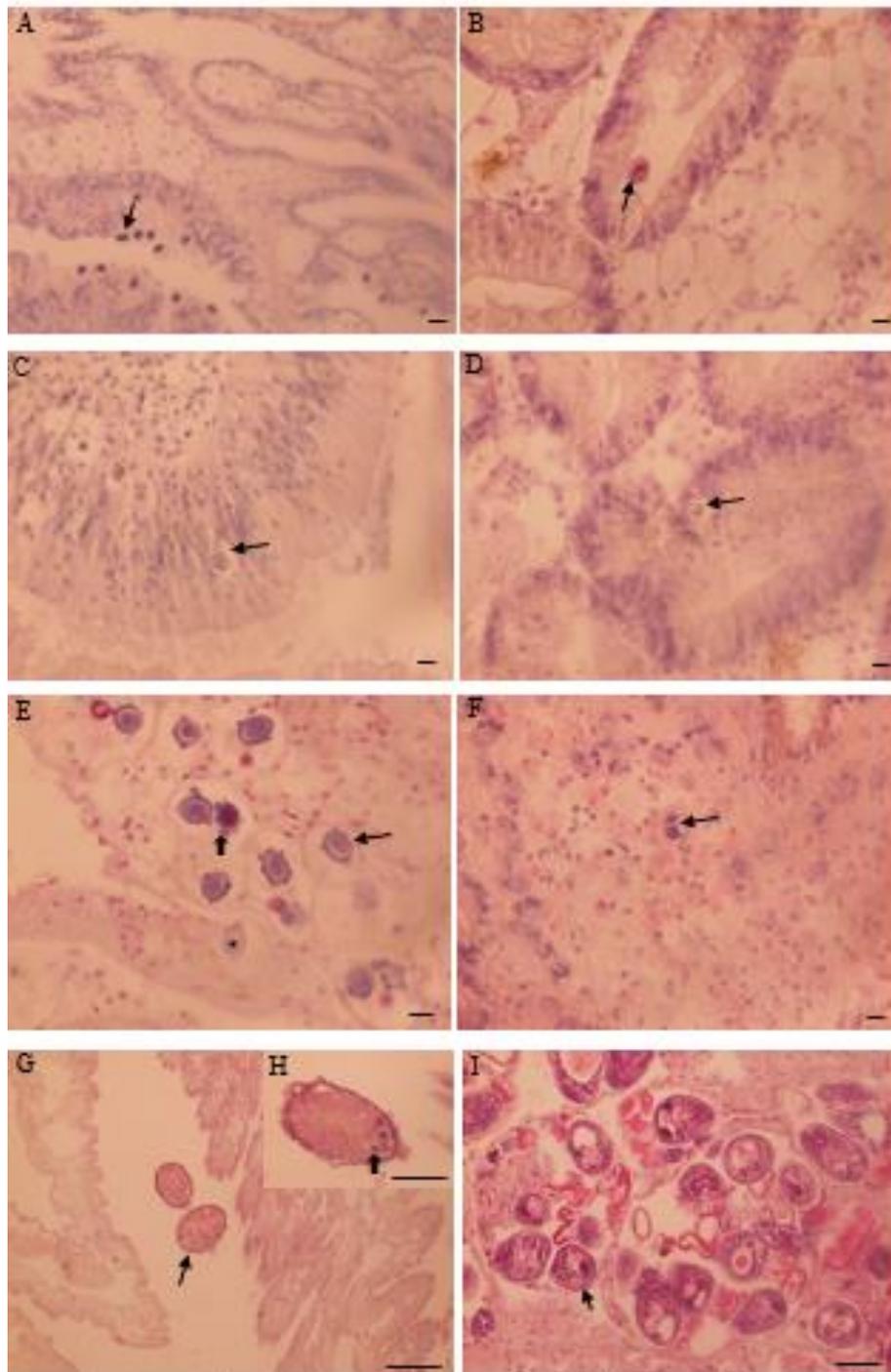


Figura 6. Protozoários e metazoários em associação parasitária com três bivalves. A) *Sphenophrya* sp. (seta) nas brânquias de *Crassostrea rhizophorae*. Barra = 2 μ m; B) *Ancistrocoma* sp. (seta) no lúmen de túbulo da glândula digestiva de *C. rhizophorae*. Barra = 10 μ m; C) *Perkinsus* sp. (seta), como roseta no epitélio intestinal de *C. rhizophorae*. Barra = 5 μ m; D) Trofozoíto de *Perkinsus* sp. (seta) no epitélio dos túbulos da glândula digestiva em *C. rhizophorae*. Barra = 5 μ m; E) *Nematopsis* sp. em vários estágios: oocisto contendo esporozoíto (seta), gimnósforo (seta cheia) e oocisto sem esporozoíto (*) nas brânquias de *C. rhizophorae*. Barra = 10 μ m; F) Fagócito (seta) com dois oocistos de *Nematopsis* sp. no pé de *Mytella guyanensis*. Barra = 6 μ m; G) *Urastoma* sp. (seta) entre os filamentos branquiais de *C. brasiliana*. Barra = 20 μ m; H) Ocelo (seta cheia) de *Urastoma* sp.. Barra = 100 μ m; I) Esporocistos contendo massas germinativas e cercárias (seta) de Bucephalidae na gônada de *M. guyanensis*. Barra = 20 μ m.

5.4. Diagnóstico molecular

As duas amostras de *M. guyanensis* submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação da espécie de trematódeo digenético, produziram *amplicons* de tamanho esperado (entre 500 e 600 pb) e uma banda inespecífica próxima a 400 pb (**Figura 7**).

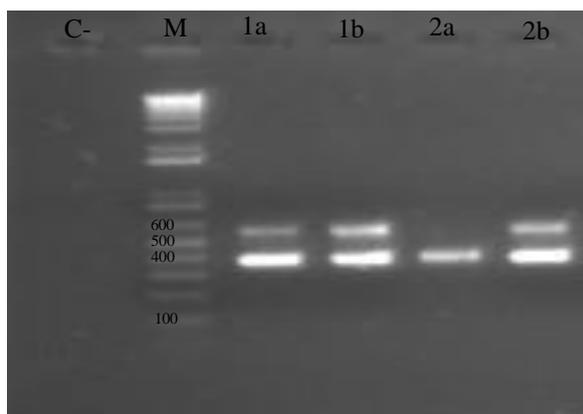


Figura 7. Diagnóstico da PCR em gel de agarose (1,5%) corado com *Sybr* com bandas esperadas entre 500 e 600 pb produzidas pelo par de primers Bcph28SF/Bcph28SR e bandas inespecíficas próximas a 400 pb. Na primeira coluna encontra-se o controle negativo (C-), na segunda o marcador (M) em pares de bases, na terceira e quarta coluna encontra-se a amostra 1 em réplica (1a e 1b) e nas colunas cinco e seis a amostra 2 replicada (2a e 2b).

O sequenciamento gerou resultados somente da amostra 1. O alinhamento das sequências utilizando o BLAST demonstrou similaridade entre 75 e 81% para a banda de tamanho esperado, com sete espécies da família Bucephalidae, sendo que as de similaridade mais alta foram com *Prosorhynchoides paralichthydis* (Corkum, 1961) Overstreet, Cook & Heard, 2009, com 81%, e *Rhipidocotyle transversale* Chandler, 1935, com 78%. *Bucephalus polymorphus* foi observada com similaridade de 76%.

A banda inespecífica (aproximadamente 400 pb) também foi sequenciada e o resultado do alinhamento em conjunto com o BLAST revelou similaridade de 95% para *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (= *Mytilus viridis* Linnaeus 1758) e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram observados protozoários e metazoários associados às três espécies de bivalves investigados, no total de sete espécies de simbiontes, todas já conhecidas como parasitos de bivalves no litoral brasileiro (BOEHS et al., 2012), sendo que a ostra *C. rhizophorae* apresentou a maior riqueza de parasitos (06 espécies), seguida por *C. brasiliana* (04 espécies) e por *M. guyanensis* (02 espécies). Essa diferença de riqueza entre *C. rhizophorae* e *M. guyanensis* está coincidente com observações feitas por Zeidan, Luz e Boehs (2012), embora essas autoras tenham relatado baixa prevalência de *Sphenophrya* sp. e *Urastoma* sp. em *M. guyanensis*, ausentes neste estudo. Por outro lado, os membros da família Bucephalidae, não observados nas ostras deste estudo, já foram observados por outros autores em *C. rhizophorae* ao longo da costa do estado da Bahia (NASCIMENTO et al., 1986; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015), contudo as maiores prevalências de trematódeos digenéticos (de até 10%) foram observadas para *M. guyanensis* (CEUTA; BOEHS, 2012; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012). *Nematopsis* sp. infectando *C. rhizophorae*, *C. brasiliana* e *M. guyanensis* está bem documentada na região litorânea da Bahia. Neste estudo, a prevalência dessas gregarinas foi maior nas ostras do que no sururu, corroborando com Zeidan, Luz e Boehs (2012). A prevalência muito alta desse parasito em *C. rhizophorae* do Ponto 1 - Sapetinga (96%) coincidiu com os resultados obtidos por Pinto e Boehs (2008) (100%), Boehs et al. (2010) (97,5%) naquela mesma área e por Ceuta e Boehs (2012) (100%) na Baía de Camamu, porém em *M. guyanensis*.

Os ciliados do gênero *Sphenophrya* estiveram presentes nas brânquias de *C. rhizophorae* extracelularmente e de forma individualizada, assim como observado por Zeidan, Luz e Boehs (2012), embora essas autoras tenham relatado a formação de xenomas em alguns exemplares, que por sua vez, estiveram ausentes neste estudo, indicando talvez uma infecção mais inicial. A baixa prevalência de *Sphenophrya* sp. observada está coincidente com outras observações feitas no estado da Bahia (NASCIMENTO et al., 1986; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; LUZ; BOEHS, 2015).

Outros ciliados comumente associados a bivalves, considerados parasitos, mas que não causam danos significativos ao hospedeiro são os do gênero *Ancistrocoma* (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994). *Ancistrocoma* sp. esteve presente nas duas espécies de ostras estudadas e apesar de não se ter observado lesões em nenhuma delas, a prevalência desse ciliado foi oito vezes maior em *C. rhizophorae*. Comparando os resultados deste com

outros estudos realizados no Baixo e Litoral Sul da Bahia, foi percebida uma tendência que demonstra que a prevalência de *Ancistrocoma* sp. é maior em baixas temperaturas, o que justificaria a diferença de prevalência observada entre as duas espécies hospedeiras, uma vez que *C. rhizophorae* foi coletada no Ponto 1 – Sapetinga, no mês de junho de 2016, onde a temperatura foi de 23°C, tendo apresentado prevalência de 24%, enquanto que *C. brasiliensis*, coletada no Ponto 4 - Graciosa no mês de julho de 2016, em temperatura de 25°C, apresentou prevalência de 3,3%. Zeidan, Luz e Boehs (2012) observaram algo semelhante na ostra *C. rhizophorae*. Essas autoras observaram prevalência de 16,6% em temperatura de 25,5°C e 6,6% em temperatura de 27,5°C. Ainda de acordo com essas autoras, a menor prevalência (3,3%) foi relatada em local com temperatura de 30°C. Resultado semelhante foi verificado em outro estudo realizado por Brandão, Boehs e da Silva (2013), também no sul da Bahia, em que foram observadas prevalências de 3,3% no verão (temperatura = 31,2°C) e de 6,7% no inverno (23 °C) no mesmo local. Prevalências mais próximas às encontradas no presente estudo (cerca de 20%) foram relatadas por Sabry et al. (2013) no estado do Ceará. Este é o primeiro relato de *Ancistrocoma* sp. no município de Ilhéus, Bahia.

Perkinsus sp. foi observado em todos os pontos amostrados nas duas espécies de ostras, com prevalências entre 10% e 26,1%. Um estudo realizado por Luz et al. (no prelo), relatou correlação positiva da salinidade com a prevalência, fato que foi observado neste estudo, onde os locais com salinidade mais baixa (13 PSU) (Ponto 3 – Cais de Camamu) e zero (Ponto 4 – Graciosa) também tiveram as mais baixas prevalências (12% e 10%, respectivamente). Baixa prevalência de *Perkinsus* sp. foi relatada por Brandão et al. (2013) no cultivo da Graciosa, onde esses autores também registraram salinidade zero. Com relação às prevalências mais altas, embora no Ponto 1 – Sapetinga tenha sido observada salinidade de 35 PSU e prevalência de 20%, enquanto que no Ponto 2 – Cajaíba observou-se 28 PSU de salinidade e 26,1% de prevalência, os resultados estão de acordo com Luz et al. (no prelo), que observou prevalências maiores de *Perkinsus beihaiensis* na região do Baixo Sul (que inclui Cajaíba) em relação a Ilhéus. Ainda segundo o estudo desses autores, foi observado que a salinidade em Ilhéus variou de 18 a 30 PSU, enquanto que no Baixo Sul (Baía de Camamu) se manteve constantemente alta (próximo ou superior a 30 PSU). Esse resultado justifica o porquê de a prevalência de *Perkinsus* sp. ter sido maior no Ponto 2 – Cajaíba, uma vez que o Ponto 1 – Sapetinga, localizado em Ilhéus, sofre uma maior variação de salinidade em função da dinâmica estuarina (interação entre a água fluvial e marinha). Ainda nesse contexto, Luz et al. (no prelo) também observaram prevalência mais alta em *C. rhizophorae* em relação a *C.*

brasiliana e de acordo com esses autores, isso pode estar atrelado ao fato de *C. brasiliana* passar mais tempo submersa, talvez desfavorecendo a infecção por *Perkinsus* sp., interpretando que talvez o nível de estresse do hospedeiro (no caso de *C. rhizophorae*, por exposição ao ar em períodos de maré baixa) pode ser um outro fator que influencie essa associação parasito-hospedeiro. Em conclusão, apesar de neste estudo a prevalência ter sido significativamente diferente entre as espécies de ostras, não foi possível inferir que *C. rhizophorae* é mais suscetível que *C. brasiliana* ao *Perkinsus* sp., uma vez que as comparações ocorreram com base em pontos geograficamente diferentes, embora o estudo tenha indicado uma clara correlação negativa entre prevalência e salinidade, certificando os resultados obtidos por Brandão et al. (2013) e por Luz et al. (no prelo).

Gregarinas do gênero *Nematopsis* possuem um complexo ciclo de vida, incluindo um hospedeiro intermediário, sempre um bivalve, e um hospedeiro definitivo, sempre um crustáceo (LAUCKNER, 1983). Em um estudo realizado por Boehs et al. (2010), a prevalência mais alta de *Nematopsis* sp. em *M. guyanensis* em relação a outras duas espécies estudadas no mesmo local (*Anomalocardia brasiliana* e *Iphigenia brasiliana*), foi atribuída à presença de crustáceos no mesmo ambiente onde o mitilídeo foi coletado (no manguezal). Outro estudo também concluiu que a maior prevalência de *Nematopsis* sp. foi na ostra do mangue (*C. rhizophorae*) em detrimento da ostra *C. brasiliana*, coletada em cultivo adjacente (LUZ; BOEHS, 2015). As autoras concluíram que a ostra coletada no manguezal esteve mais exposta aos crustáceos, enquanto que a cultivada, tendo permanecido totalmente submersa e por isso menos exposta a esse parasito, dificultou a este completar o seu ciclo de vida. O presente estudo confirmou a importância da proximidade com os crustáceos. Assim, no Ponto 1 – Sapetinga e no Ponto 4 – Graciosa, localizados muito próximo a extensos manguezais, as prevalências de *Nematopsis* sp. foram altas, independentemente da espécie de bivalve. Isso se confirmou pelas prevalências intraespecíficas mais baixas de *C. rhizophorae* no Ponto 2 – Cajaíba e no Ponto 3 – Cais de Camamu, locais com maior atividade antrópica (e por isso com degradação dos manguezais *in loco*) em relação ao Ponto 1 – Sapetinga, com extensos manguezais próximos e menos degradados.

Ainda com relação a *Nematopsis* sp., a presença de gimnósporos em parte dos exemplares (37%) indica, conforme Lauckner (1983) infecção inicial do hospedeiro intermediário, sendo assim, é provável que, nesses animais a infecção tenha sido recente à coleta, ainda que concomitantemente, *Nematopsis* sp. maduros tenham sido observados nos mesmos exemplares, indicando infecção recorrente.

O tamanho médio dos oocistos de *Nematopsis* sp. nas ostras (entre 4,1 e 4,5 μm) foi maior do que o tamanho médio em *M. guyanensis* (2,5 μm). Essa diferença no tamanho também foi relatada por Zeidan, Luz e Boehs (2012), que observaram uma média de 7,1 μm em *C. rhizophorae* e de 4,9 μm em *M. guyanensis*. Esses resultados reforçam ainda mais a hipótese de que a espécie de *Nematopsis* que parasita as ostras é distinta da que parasita *M. guyanensis*. Em estudos anteriores, foi identificada *N. mytella* em *M. guyanensis* (AZEVEDO; MATOS, 1999) e *N. gigas* em *Nerita ascencionis* (Gastropoda: Neritidae) (AZEVEDO; PADOVAN, 2004), utilizando-se microscopia eletrônica, mas mediante o uso de ferramentas de diagnóstico distinta da empregue no presente estudo, não é possível afirmar com segurança que se trata de alguma das espécies mencionadas.

Ainda com relação a *Nematopsis* sp., tanto as prevalências encontradas neste estudo, quanto a ausência de danos evidentes nas ostras *Crassostrea* spp., estão de acordo com os trabalhos realizados na Bahia (ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; COVA et al., 2015; LUZ; BOEHS, 2015). Já os danos nos tecidos de *M. guyanensis* quando este parasito se encontrava em alta infestação confirmam as observações nessa mesma espécie feitas por Ceuta e Boehs (2012).

O turbelário *Urastoma* sp. foi encontrado tanto em *C. rhizophorae* do Ponto 1 – Sapetinga quanto em *C. brasiliiana*, coletada apenas no Ponto 4 – Graciosa. A prevalência de 16% e a intensidade de até dois turbelários por corte histológico em *C. rhizophorae*, está de acordo com o estudo realizado por Brandão, Boehs e da Silva (2013), que encontraram prevalência de 16,6% no local equivalente ao Ponto 4 – Graciosa e salinidade igual a zero, a mesma encontrada no presente estudo, entretanto no presente observou-se prevalência de 70% e intensidade de até 13 turbelários por ostra, a mais alta já registrada na Bahia. Zeidan, Luz e Boehs (2012) encontraram prevalência de até 56,6% na ostra *C. rhizophorae* de Canavieiras, na Bahia, mas como se constatou posteriormente que parte das ostras daquela região são, na verdade, *C. brasiliiana* (LUZ et al, no prelo), é possível que o registro dessas autoras tenha sido nessa última espécie. Prevalências maiores que as observadas neste estudo foram relatadas por Robledo et al. (1994) em *Mytilus galloprovincialis* da Espanha, onde estas chegaram a 90%. Segundo esses autores, *C. virginica* pode conter um grande número de *Urastoma cyprinae* durante os meses mais quentes e mais frios, ou seja, não existe uma correlação estabelecida entre intensidade e temperatura. Em um estudo realizado por Luz e Boehs (2015) na Bahia, a prevalência de *Urastoma* sp. foi muito baixa (até 4%), porém na comparação entre as ostras coletadas no mangue e as coletadas do cultivo, as ostras do cultivo

(*C. brasiliiana*) tiveram prevalência mais alta em relação às do mangue. Esse resultado comparado ao obtido neste estudo reforça a hipótese de que a maior densidade e aglomeração de bivalves, situação típica em sistemas de cultivo, contribui na rápida disseminação de parasitos. Em nenhum outro estudo foi relatada intensidade de *Urastoma* sp. tão alta para bivalves do gênero *Crassostrea*.

Observou-se ainda alta intensidade de células marrons (*brown cells*) (73%) na ostra *C. brasiliiana* do Ponto 4 - Graciosa, o que possivelmente está associado a presença de parasitos, possivelmente a *Urastoma* sp. e a *Nematopsis* sp. A relação entre a presença dessas células e parasitos foi mencionada por Cheng e Burton (1965) em relação a trematódeos digenéticos.

Com relação ao Bucephalidae, Ceuta e Boehs (2012) também relataram baixa prevalência e evidência de castração desse trematódeo digenético em *M. guyanensis*. Como revisado por Boehs et al. (2012), bucefalose ou “doença laranja” é o nome dado à enfermidade causada por espécies da família Bucephalidae em mitilídeos. Ainda segundo a revisão das autoras supracitadas, a característica alaranjada do manto e o aspecto fibroso do tecido podem ser observados macroscopicamente em um pequeno número de casos em *M. guyanensis*, o que foi confirmado no presente estudo em 50% dos casos.

Os resultados da análise molecular demonstraram que o par de *primers* desenhado e utilizado neste estudo não foi totalmente eficiente, uma vez que resultou em anelacção em regiões inespecíficas, gerando resultados falso-positivos. Os resultados do sequenciamento dessas regiões revelaram similaridade com a família Mytilidae, a qual pertence *M. guyanensis*. Sendo assim, fica estabelecido que o par de *primers* Bcph28SF e Bcph28SR, revelou um controle falso-positivo, com tamanho aproximado de 400 pb para espécies da família Mytilidae. Com relação a região de interesse (aproximadamente 600 pb), foi observado que o processo de purificação comprometeu em parte a integridade do DNA e conseqüentemente a qualidade do sequenciamento (apenas uma das duas amostras gerou resultado). Contudo, os resultados obtidos foram suficientes para afirmar, com confiabilidade, que a parasitose observada em *M. guyanensis* trata-se de uma bucefalose inespecífica. As duas espécies mais similares à sequenciada neste estudo, *Proisorhynchoides paralichthydis* e *Rhipidocotyle transversale*, foram observadas por Nolan et al. (2015) em uma Ilha do Mississippi (Estados Unidos da América). Já todos os estudos realizados na Bahia até o momento, associam a causa da bucefalose ao gênero *Bucephalus* (NASCIMENTO et al., 1986; CEUTA; BOEHS, 2012; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012; BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013; LUZ; BOEHS, 2015). De acordo com Nolan et al. (2015), vários estudos têm

demonstrado dificuldade na identificação dos gêneros da família Bucephalidae. Os gêneros *Prosorhynchoides*, *Rhipidocotyle* (ambos revelados como mais similares a amostra sequenciada neste estudo) e *Bucephalus*, têm 88, 74 e 79 espécies descritas, respectivamente. Segundo esses autores, além de comporem os principais e maiores gênero dessa família, possuem características compartilhadas que comprometem sua distinção, como por exemplo, a posição da boca que se abre perto do meio do corpo, uma faringe pré-ovariana e um ceco semelhante ao saco. Nesse sentido, a identificação via PCR continua sendo a ferramenta mais eficaz na identificação, apesar de no presente estudo não ter sido possível afirmar com confiabilidade a espécie que ocorre no Baixo Sul da Bahia.

Os caranguejos pinoterídeos são bastante conhecidos por se associarem a bivalves, geralmente, como comensais (BOEHS; MAGALHÃES, 2004). Neste estudo, a presença dos caranguejos da espécie *Pinnotheres ostreum* não esteve associada a danos na ostra *C. rhizophorae*, diferentemente de um estudo realizado na Baía de Todos os Santos, Bahia, por Nascimento e Pereira (1980), em que *P. ostreum* foi apontada como parasito da ostra. Essas mesmas autoras também relataram uma relação entre a prevalência de *P. ostreum* e o tamanho do hospedeiro, sendo que a altura de *C. rhizophorae* no intervalo de 4 a 6 cm teve prevalência de 10,7% de *P. ostreum*. Tais resultados coincidiram com os do presente estudo, no qual o intervalo da altura foi de 4,5 a 5 cm, enquanto que a prevalência foi de 12%. Nenhum estudo até o momento mencionou a presença do par (1 macho e 1 fêmea) em associação com *C. rhizophorae*, sendo, portanto, este o primeiro registro.

Em conclusão, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, *Perkinsus* sp., *Nematopsis* sp. e o representante da família Bucephalidae, continuam sendo os parasitos que causam os principais danos a bivalves de interesse econômico no Litoral e Baixo Sul da Bahia, por esta razão devem continuar sendo constantemente monitorados.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o estado geral de saúde das ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. brasiliana* não foi significativamente comprometido por nenhuma das associações parasitárias, ainda que *Perkinsus* sp. tenha causado desorganização dos tecidos intestinais. O mesmo foi observado para *Mytella guyanensis*, que apesar da saúde ter sido comprometida por *Nematopsis* sp, as gregarinas só causaram danos em alguns exemplares altamente infectados; por sua vez, o Bucephalidae, embora tenha causado castração parasitária, foi observado em baixa prevalência, o que leva à conclusão que esta espécie não encontra-se severamente ameaçada na região do Baixo Sul da Bahia. Dentre as ostras, pode-se dizer que *C. brasiliana* apresentou melhor estado de saúde em relação à *C. rhizophorae*, sendo, portanto, especialmente indicada para o cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. M.; MAY, R. M. Regulation and stability of host-parasite population interactions. **Journal of Animal Ecology**. London, v. 47, p. 219-247. 1978.

AZEVEDO, C.; MATOS, E. Description of *Nematopsis mytella* n. sp. (Apicomplexa), parasite of the mussel *Mytella guyanensis* (Mytilidae) from the Amazon Estuary and description of its oocysts. **European Journal of Protistology**, v. 35, p. 427-433, 1999. DOI: 10.1016/S0932-4739(99)80052-2

AZEVEDO, C. PADOVAN, I. *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a Parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 51, n. 2, p. 214-219. 2004.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865-869, 2004.

BOEHS, G.; LENZ, T.M.; VILLALBA, A. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 457-458, 2009. DOI: 10.1590/S1519-69842009000200032

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: Silva-Souza, A.T.; Lizama, M.A. P.; Takemoto, R.M. (eds.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Massoni: Maringá. 2012.

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L. O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2009.10.008

BOWER, S.M.; McGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; da SILVA, P.M. Health assessment of the oyster *Crassostrea rhizophorae* on the southern coast of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 84-91, 2013.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S. A; QUEIROGA, F.R.; da SILVA, P. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138-141, 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2012.11.003

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997. PMID:9267395. <http://dx.doi.org/10.2307/3284227>

CEUTA, L.O.; BOEHS, G. Parasites of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 1-7, 2012. DOI: 10.1590/S1519-69842012000300002

CHENG, T.C.; BURTON, R.W. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: Histopathology and sites of infection. **Chesapeake Science**. v. 6, n. 3, p. 3-16. 1965. DOI:10.2307/1350618

Conselho Regional de Administração da Bahia – CRA. Publicações, Bahia, 1995. Salvador (BA).

COVA, A. W.; JÚNIOR, M. S.; BOEHS, G.; SOUZA, J. M. Parasites in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoá, Bahia. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 24, n. 1, p. 21-27. 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura. 2012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **Partnering to achieve resilience and food and nutrition security**. n. AX274, p. 2. 2016.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Washington, D. C.: US Government Printing Office, **Fish and Wildlife Service Bulletin**, v. 64, 480 p., 1964.

HOWARD, D. W.; LEWIS, E. J.; KELLER, B. J.; SMITH, C. S. **Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans**. Oxford: MD, NOAA Technical Memorandum, NOS NCCOS5, 2004, 218p.

IBAMA. **Diagnóstico da carcinicultura do Ceará**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (MMA), 2005.

KINNE, O. **Diseases of Marine Animals**. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, v. 2, Introduction, p. 467-475. 1983.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Kinne, O. (ed.). **Diseases of Marine Animals**. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, v. 2, p. 477-552. 1983.

LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink NH microwell plate sandwich hybridization. **Journal of Microbiological Methods**. v. 53, n. 2, p.199-209. 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00032-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00032-0). PMID:12654491

LOWE, D.M.; SALKELD, P.N., CARR, M. R. The effect of geographical location on the cellular composition of the mantle tissue of the mussel, *Mytilus edulis*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 225-232, 1994. DOI: 10.1017/S0025315400035785

LUZ, M. S.A; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 7, p. 120-128, 2015.

LUZ, M. S. A.; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* em cultivo e em estoque natural na Baía de Camamu, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, p. 191, 2016.

LUZ, M. S. A.; CARVALHO, F. S.; OLIVEIRA, H. C.; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** (Impresso). (no prelo)

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: Brasil 2011. Brasília (DF).

MPA. Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura: Brasil 2014. Brasília (DF).

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A. Efeitos do caranguejo *Pinnotheres ostreum* em ostras *Crassostrea rhizophorae*. **Boletim do Instituto Oceanográfico**. São Paulo. v. 29, n. 2, p. 261-265. 1980. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0373-5524198000020>

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; KERN I.I.F.; PEREIRA, A.S. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 340-349, 1986. DOI: 10.1016/0022-2011(86)90105-9

NOLAN, M. J.; CURRAN, S. S.; MILLER, T. L.; CUTMORE, S. C.; CANTACESSI, C.; CRIBB, T. H. *Dollfustrema durum* n. sp. and *Heterobucephalopsis perardua* n. sp. (Digenea: Bucephalidae) from the giant moray eel, *Gymnothorax javanicus* (Bleeker) (Anguilliformes: Muraenidae), and proposal of the Heterobucephalopsinae n. subfam. **Parasitology International**. v. 64, p. 559-70. 2015.

OSTRENSKY, A, BORGHETTI, J. R; SOTO, D. (Eds.). **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, p. 279. 2007.

PINTO, T.R.; BOEHS, G. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 45, p. 95-100, 2008.

PINTO, T. R.; BOEHS, G.; PESSOA, W. F. B; LUZ, M. S. A.; COSTA, H. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 1-4. 2016.

RIBEIRO, M.M.; OLIVEIRA, J. B.; BOEHS, G. Parasitism by a Digenea in *Lucina pectinata* (Mollusca: Lucinidae). **Brazilian Journal of Biology** (Impresso) (no prelo).

RIOS, E.C. **Compendium of Brazilian Sea Shells**. Rio Grande, Porto Alegre, 2009.

ROBLEDO, J.A.F.; CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; SLUYS, R.; FIGUERAS, A. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 18, p. 203-210, 1994. DOI: 10.3354/dao018203.

SABRY, R. C. **Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC**. 46p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SABRY, R.C., GESTEIRA T.C.V.; MAGALHÃES, A.R.M; BARRACCO, M.A; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; VIANNA, R.T.; da SILVA, P.M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti river estuary, Ceará state, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24-32, 2013.

SEPLAN. Secretaria do Planejamento. Bahia 2016. Salvador (BA).

SILVA NETA, M.T.; MACIEL, B.M.; LOPES, A.T.S.; MARQUES, E.L.S.; REZENDE, R.P.; BOEHS, G. Microbiological quality and bacterial diversity of the tropical oyster *Crassostrea rhizophorae* in a monitored farming system and from natural stocks. **Genetics and Molecular Research**. v.14, n. 4, p. 15754-15768. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.1.27>

ZEIDAN, G.C.; LUZ, M.S.A.; BOEHS, G. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 391-398. 2012.