

MESTRADO CIÊNCIAS DO MAR - RECURSOS MARINHOS
ESPECIALIZAÇÃO EM AQUACULTURA E PESCAS

Estágio Curricular na Empresa Riasearch, Lda.

Igor Bernardo

M

2021



Estágio Curricular na Empresa Riasearch, Lda.

Igor Bernardo



IGOR SANTOS BERNARDO

Estágio Curricular na Empresa Riasearch, Lda.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Ciências do Mar – Recursos Marinhos
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas
de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Rui Jorge Miranda Rocha

Categoria – Diretor de Operações, Inovação e
Desenvolvimento

Afiliação – Riasearch, Lda

Co - Orientador – Doutor Benjamin Costas
Refojos

Categoria – Investigador Principal

Afiliação – Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental

Declaração de honra

Declaro que o presente trabalho é de minha autoria e não foi utilizado previamente noutro curso ou unidade curricular, desta ou de outra instituição. As referências a outros autores (afirmações, ideias, pensamentos) respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, e encontram-se devidamente indicadas no texto e nas referências bibliográficas, de acordo com as normas de referenciação. Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico";

Igor Santo Bernardo

Agradecimentos:

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores Doutor Rui Rocha e Doutor Benjamin Refojos, pelo contributo na realização deste trabalho, pelo tempo disponibilizado, rigor científico, pela constante abertura para discutir ideias e por me terem integrado nas suas instituições.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe e avó pelo constante incentivo, esforço e por acreditarem em mim, não só no decorrer deste trabalho, mas sempre. Agradeço ao meu avô, pai e amigo, que apesar de já não estar entre nós, foi e sempre será a maior inspiração e exemplo.

Também um obrigado à Adriana Laranjeira, André Barreto, Bruna Silva e Daniel Jerónimo, por todo o conhecimento transmitido e simpatia no decorrer do estágio na empresa Riasearch.

E por fim, um obrigado muito especial à minha namorada e amiga Helena Junqueira por toda ajuda, paciência, dedicação e carinho durante estes meses.

Abstract:

Aquaculture has grown in global importance, to offset the gradual reduction in natural populations of several species and produce resources capable of feeding exponentially increasing human populations. Due to its rapid growth, constant research and optimization of technology is required to safeguard the interests, not only of the population but also of the environment. Riasearch, a pioneer company in Portugal, operates mainly in aquaculture applied research and experimental development, carrying out nutritional trials and supplying an innovative service to the sector. It sets out to validate diets for different aquatic organisms, through digestibility and growth trials. Trials are conducted in their state of art research facilities that contain three recirculating aquaculture systems (RAS) and a demonstration scale integrated multitrophic aquaculture system (IMTA). The main goal of this curricular internship in the company was to establish a first experience in the industrial aquaculture area, integrating the most diverse routines of the installation, as well as to interact with different species such as crustaceans (*Penaeus vannamei*) and fish (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*).

Resumo:

A aquacultura tem crescido em importância global, para compensar a redução gradual das populações naturais de várias espécies e produzir recursos capazes de alimentar populações humanas em crescimento exponencial. Devido ao seu rápido crescimento, é necessária uma constante investigação e otimização da tecnologia para salvaguardar os interesses, não só da população, mas também do ambiente. A Riasearch, uma empresa pioneira em Portugal, opera principalmente na investigação aplicada e desenvolvimento experimental em aquacultura, realizando ensaios nutricionais e fornecendo um serviço inovador ao sector. Pretende validar dietas para diferentes organismos aquáticos, através de ensaios de digestibilidade e crescimento. Os ensaios são conduzidos na instalação de investigação que contém três sistemas de recirculação em aquacultura (RAS) e um sistema de aquacultura multitrófica integrada à escala de demonstração (IMTA). O principal objetivo do estágio curricular na empresa foi o contacto com a realidade empresarial na área da aquacultura, integrando as mais diversas rotinas das instalações, bem como interagir com diferentes espécies como crustáceos (*Penaeus vannamei*) e peixes (*Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*).

Índice:

1.	Introdução	12
1.1.	Aquacultura no Mundo	12
1.2.	Aquacultura em Portugal	13
1.3.	Sistemas de Recirculação em Aquacultura (RAS) e Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)	15
1.4.	I&D em aquacultura.....	17
2.	Riasearch	17
2.1.	Descrição da empresa	17
2.2.	Principais Espécies Utilizadas	18
2.2.1.	Crustáceos – Camarões	18
2.2.1.1.	<i>Penaeus vannamei</i>	18
2.2.2.	Peixes	21
2.2.2.1.	<i>Sparus aurata</i>	21
2.2.2.2.	<i>Dicentrarchus labrax</i>	22
2.2.3.	Plantas Halófitas	23
2.2.3.1.	<i>Salicornia ramosissima</i>	24
3.	Relatório de Estágio	26
3.1.	Objetivos	26
3.2.	Instalações	27
3.2.1.	Zona técnica.....	28
3.2.1.1.	Captação e Tratamento da Água.....	28
3.2.1.2.	Sistema de RAS	29
3.2.2.	Biotério	32
3.2.3.	Estufa.....	33
3.2.4.	Segundo Armazém	34
3.3.	Manutenção e Rotinas	36
3.4.	Transporte e Aclimação das Pós-Larvas de <i>Penaeus Vannamei</i> ..	39

3.5.	Amostragens.....	40
3.6.	Cultivos Auxiliares	41
4.	Considerações Finais.....	43
5.	Ensaio com <i>Penaeus vannamei</i>	44
5.1.	Enquadramento.....	44
5.2.	Objetivos	45
5.3.	Material e Métodos.....	45
5.3.1.	Aclimação e Sistema Experimental.....	45
5.3.2.	Desenho Experimental	46
5.3.3.	Amostragem	48
5.3.4.	Resultados	49
5.3.4.1.	Crescimento.....	49
5.3.5.	Discussão.....	51
6.	Bibliografia.....	53
7.	Anexos.....	59
7.1.	Protocolo de Limpeza do Filtro da Bomba de Calor.....	59
7.2.	Protocolo para Substituição do Filtro Mecânico	61
7.3.	Protocolo da Sonda Multi-paramétrica.....	67
7.4.	Protocolo para Calibração Sonda Redox	69
7.5.	Protocolo de Limpeza do Filtro de Areia	71
7.6.	Protocolo para Trocas de Água.....	73
7.7.	Protocolo de Limpeza dos Permutadores.....	77
7.8.	Protocolo de Rega.....	79

Índice de Figuras:

Figura 1 - Produção mundial de pescado (captura e produção em aquacultura)..	12
Figura 2 - Contribuição regional para a pesca e produção aquícola mundial.....	13
Figura 3 - Produção de aquacultura em Portugal.....	14
Figura 4 - Estrutura do volume de produção em aquicultura, por espécie (2017-2018)	14
Figura 5 - Riasearch, Lda e logótipo.....	18
Figura 6 - Ciclo de vida do <i>Penaeus vannamei</i> . Adaptado de FAO, 2018.....	19
Figura 7 - <i>Penaeus vannamei</i> adulto.....	20
Figura 8 - <i>Sparus aurata</i>	22
Figura 9 - <i>Dicentrarchus labrax</i>	23
Figura 10 - <i>Salicornia ramosissima</i> na estufa de produção da RIASEARCH.	25
Figura 11 - Esquema Riasearch, Lda. (A - Laboratório e Escritório; B - Zona técnica, C - Biotério e Armazém 2; E - Estufa, Leiras de salicórnia e Sistema dos camarões).	27
Figura 12 - Reservatórios de água e filtro de areia	28
Figura 13 - Esquema do sistema de RAS da Riasearch, Lda.....	29
Figura 14 - Filtro mecânico, escumador e filtro biológico.....	31
Figura 15 - A - Sistema UV, B - Permutadores de calor, C - Sistema SCADA	31
Figura 16 - Tanques biotério.....	32
Figura 17 - Tanques de aclimação e respetiva sump.	33
Figura 18 - A - Leiras com salicórnia durante a rega, B - cultivo de crustáceos .	34
Figura 19 - Sistema do segundo armazém.	35
Figura 20 - A - Sonda multi-paramétrica, B - frascos para análise de Amónia e Nitrito	37
Figura 21 - Alimentadores automáticos (HFS FEEDER e Fishmate F14, respetivamente).....	38
Figura 22 - Sacos de polietileno e Pós-larvas com 12 dias à chegada.....	39
Figura 23 - A - PL11; B - Camarão <i>P. vannamei</i> com 8 meses; C - Amostragem de <i>S. Aurata</i> ; D - Rebentos de <i>S. ramosissima</i> ; E - <i>S. ramosissima</i> ; F - Mesas de secagem de <i>S. ramosissima</i>	40
Figura 24 - A - Pacote comercial de Cistos de artémia; B - Tanque para eclosão de artémia; C - Cistos de artémia durante o procedimento; D - Sep-Art Artemia Cysts;	

E – Saída dos náuplios de artémia do Sep- Art com natação livre; F – Aparência final dos náuplios.	42
Figura 25 - Distribuição das dietas por tanque.....	46
Figura 26 - Limpeza e pesagem dos alimentadores.....	47
Figura 27 - Pós-larvas e pesagem.	49
Figura 28 - Peso médio corporal húmido final (FBW) das Pós-larvas alimentados com as diferentes microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais). As diferentes letras subscritas indicam diferenças estatísticas (P<0,05) entre as dietas.....	50
Figura 29 - Os valores da taxa de conversão alimentar (FCR) e da taxa de crescimento relativo (RGR) dos camarões Pós-larvas alimentados com as microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais). As diferentes letras subscritas indicam diferenças estatísticas (P<0,05) entre as dietas.....	50
Figura 30 - A sobrevivência das Pós-larvas alimentadas com diferentes microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais).....	51

Lista de Abreviaturas

As	Arsénio
BFT	Tecnologia de Biofloc
Cd	Cádmio
Cr	Crómio
DGRM	Direção-Geral de Recursos Marítimos
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCR	Feed Conversion Rate
g	Gramas
GnRH	Hormona Libertadora De Gonadotropina
IMTA	“Integrated Multitrophic Aquaculture System”
I&D	Investigação & Desenvolvimento
kg	Quilograma
L	Litros
N_i	Número Inicial
N_f	Número Final
Pb	Chumbo
P_i	Peso Inicial
P_f	Peso Final
PL	Pós – Larvas
RAS	“Recirculation Aquaculture System”

RGR	“Relative Growth Rate”
S	Sobrevivência
Se	Selênio
SD	Desvio Padrão
USD	“United State Dolar”
UV	Ultravioleta
VIH	“Vitellogenesis-Inhibiting Hormone”
Zn	Zinco
°C	Grau Celsius
μm	Micrómetro

1. Introdução

1.1. Aquacultura no Mundo

A aquacultura é um dos setores que registou um crescimento considerável nos últimos anos, suprimindo assim a disponibilidade limitada dos recursos haliêuticos sobre explorados. Estima-se que a produção global de pescado tenha atingido cerca de 179 milhões de toneladas em 2018 (fig. 1), com um valor total de primeiras vendas estimado em 401 mil milhões de dólares (USD), dos quais 82 milhões de toneladas, avaliadas em 250 mil milhões de USD, provêm da produção aquícola (FAO, 2020).

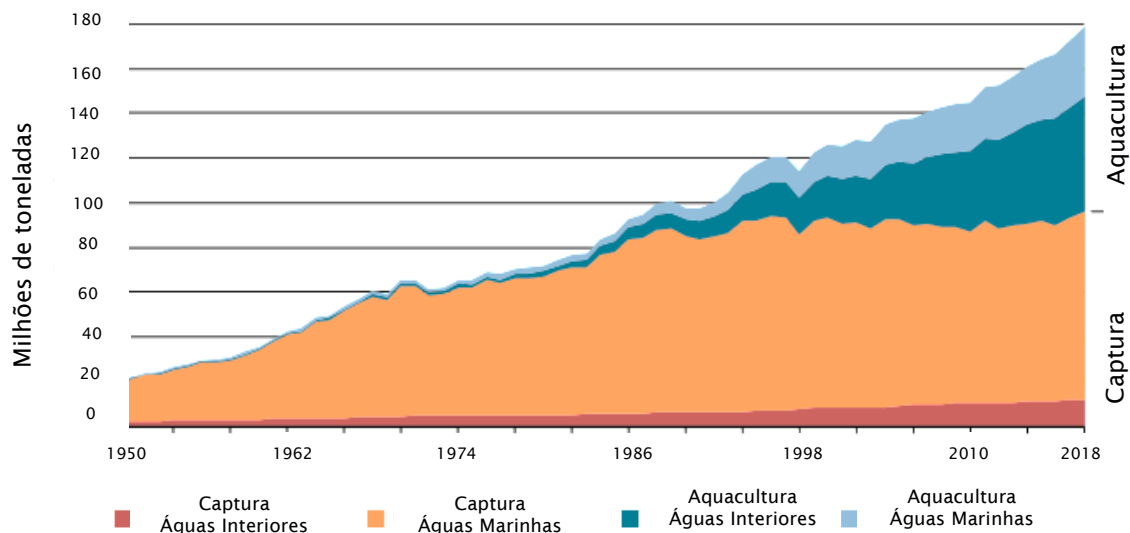


Figura 1 - Produção mundial de pescado (captura e produção em aquacultura). Fonte: FAO.

Este setor representa também um complemento para cobrir parte da dependência externa da balança comercial, no que diz respeito aos produtos da pesca, ajudando a estabilizar o preço de certas espécies e também a acrescentar valor nutricional aos produtos, através do fornecimento de ingredientes de qualidade em quantidades consideráveis e a preços acessíveis (INE and DGRM, 2020).

A aquacultura apresenta ainda uma distribuição heterogénea e um desenvolvimento díspar entre países e regiões dentro dos países. Os dados referentes a 2019 apontam a China como um grande produtor, representando 35

% da produção global aquícola. Se excluirmos a China, uma parte significativa da produção aquícola de 2019 veio da Ásia (34 %), seguida pelo continente Americano (14 %), Europa (10 %), África (7 %) e, por fim, a Oceânia (1 %) (FAO, 2020) (fig.2).

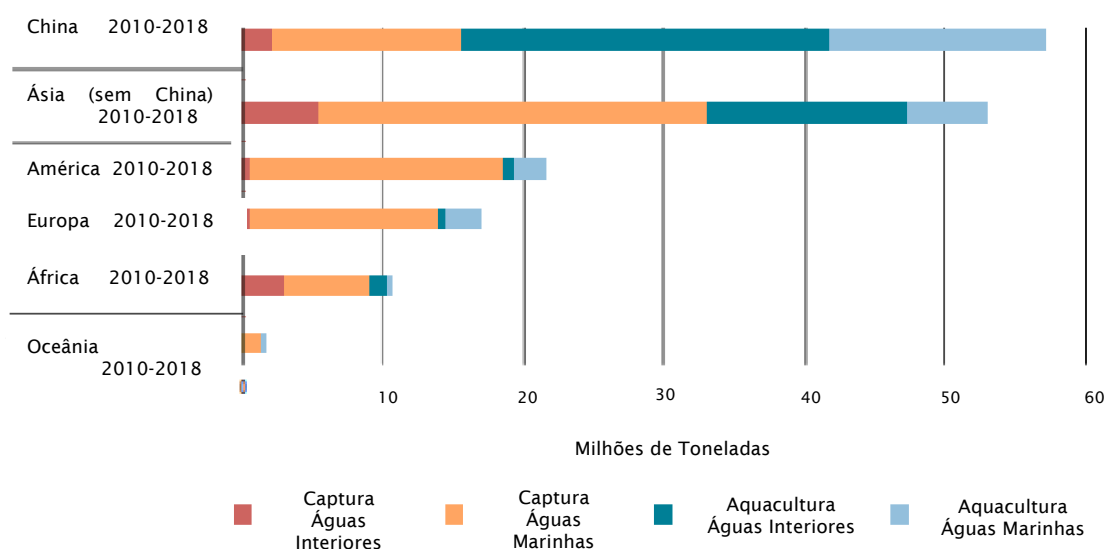


Figura 2 - Contribuição regional para a pesca e produção aquícola mundial. Adaptado de FAO.

No relatório de 2020, a FAO afirma que o consumo de peixe *per capita* em 2018 foi de 20,5 kg, enquanto em 1961 era apenas de 9,0 kg. A expansão do consumo foi impulsionada não apenas pelo aumento da produção, mas também por uma combinação de muitos outros fatores, incluindo redução de desperdício, melhor utilização, melhores canais de distribuição e procura crescente, ligados ao crescimento da população, aumento da renda e urbanização (FAO, 2018).

1.2. Aquacultura em Portugal

No ano de 2019, a produção aquícola em Portugal foi de 14 336 toneladas (fig. 3), o que se traduz num aumento de 2,5 %, face ao ano anterior. Este valor traduz-se num aumento de 22,4 % das receitas (118,5 milhões de euros) relativamente ao ano anterior (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

Relativamente aos regimes de exploração (fig. 4), a produção em águas interiores permaneceu quase unicamente pela produção intensiva de trutas. Já a produção em águas de transição e marinhas apresentou, em 2019, 38.7 % da sua

produção em regime intensivo, 10,7 % em regime semi-intensivo e os restantes 50,5 % em regime extensivo.

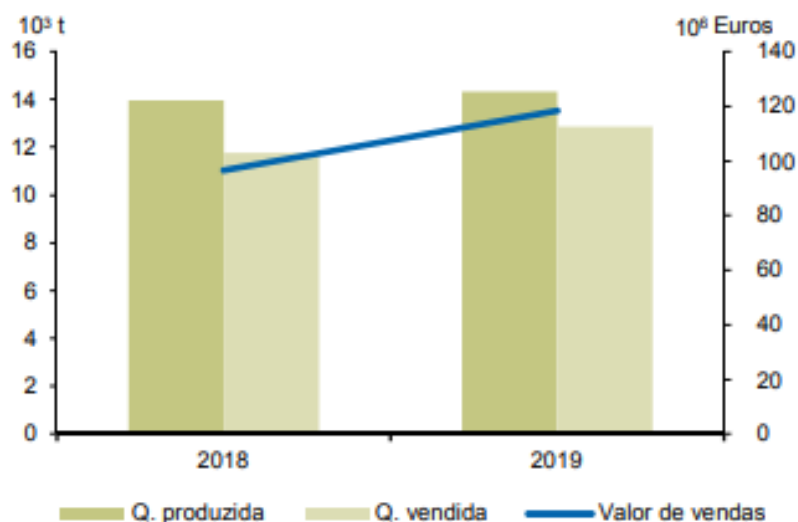


Figura 3 - Produção de aquicultura em Portugal. Fonte: DGRM, Estatísticas da aquicultura.

A produção de peixe em águas de transição em 2019 correspondeu a 93,4 % da produção total, valor praticamente idêntico relativamente ao ano anterior. Deste tipo de produção, 93,4 % é constituída por pregado, dourada e robalo em regime intensivo (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

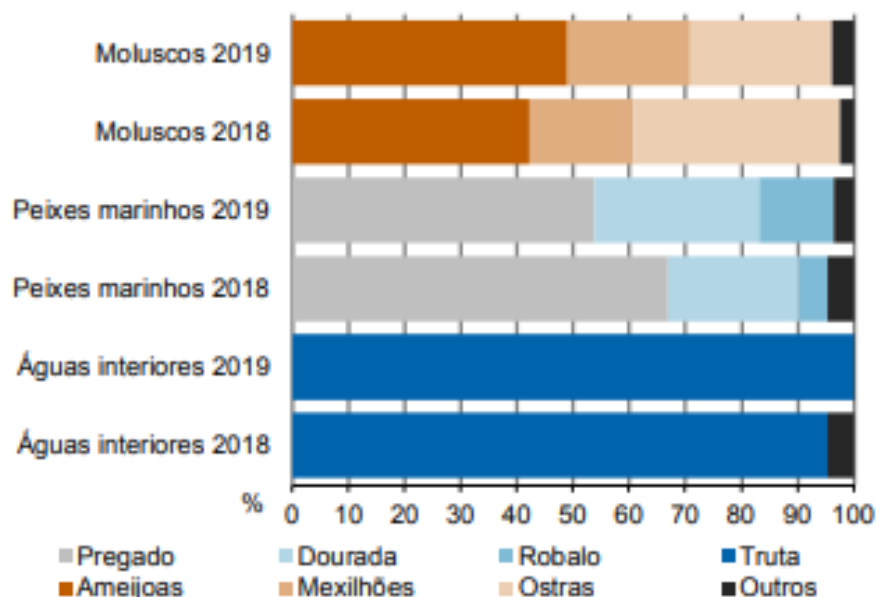


Figura 4 - Estrutura do volume de produção em aquicultura, por espécie. Fonte: DGRM, Estatísticas da aquicultura.

Já a produção de moluscos e crustáceos diminuiu 28,9 %, representando assim somente 46,6 % da produção total. Nesta prática, as amêijoas permaneceram como

a espécie mais significativa (3 276 toneladas) (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

Existiam em Portugal, no final de 2019, 1 265 estabelecimentos licenciados em aquacultura para águas interiores, marinhas e de transição, ou seja, menos 250 unidades do que no ano anterior (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

1.3. Sistemas de Recirculação em Aquacultura (RAS) e Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)

Apesar da aquacultura ser uma opção exequível para suprir a carência de alimentos, existem crescentes preocupações relativamente à sua sustentabilidade, visto que vários métodos de cultivo estão associados à poluição ambiental (Blancheton, 2000; Skjølstrup et al., 1998; Twarowska et al., 1997).

Em infraestruturas de produção em terra, as possíveis causas de poluição podem ser a dificuldade em remover sólidos que se acumulam no fundo (tanques de terra) e/ou descarga de efluentes não tratados (aquacultura em “raceways”). Já na aquacultura *offshore*, a acumulação de detritos como, por exemplo, alimentos não consumidos, fezes e produtos metabólicos excretados no corpo de água envolvente podem representar grandes prejuízos a nível ambiental (Mirzoyan et al., 2010; Piedrahita, 2003).

Devido às restrições ambientais e económicas, como recursos de água limitados, custos crescentes de terreno e a poluição, a indústria da aquacultura viu-se obrigada a criar métodos de produção mais eficazes e sustentáveis (Badiola et al., 2018; Díaz et al., 2012; Mirzoyan et al., 2010; Piedrahita, 2003). A fim de mitigar estes problemas surgem, cada vez mais, os Sistemas de Recirculação em Aquacultura (RAS – “Recirculating Aquaculture Systems”) (Badiola et al., 2018; Díaz et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Os sistemas de RAS, tal como o nome indica, permitem o tratamento (mecânico, químico e biológico) contínuo e a reutilização da água, com pequenas substituições parciais de água, bem como um elevado controlo das condições de produção (Martins et al., 2010; Mirzoyan et al., 2010; Rijn, Van, 2013; Zhang et al., 2011).

Entre as vantagens do RAS destaca-se a redução do consumo de água nas explorações aquícolas, uma vez que a reutilização da água permite minimizar a sua substituição nos tanques de cultura e compensar uma possível insuficiência no abastecimento de água (marés baixas, contaminação, seca). Além disso, estes sistemas também permitem um elevado nível de controlo sobre parâmetros de qualidade da água de forma a garantir condições ótimas de cultivo, uma maior higiene e gestão de doenças, redução da produção de resíduos e descarga no meio natural, além de um menor impacto visual (Badiola *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2010; Mirzoyan *et al.*, 2010; Rijn, Van, 2013; Zhang *et al.*, 2011).

Em contrapartida, os custos de investimento e funcionamento dos RAS representam algumas desvantagens. Os investimentos de capital inicial, os custos operacionais e energéticos exigidos são mais elevados comparativamente aos restantes métodos de cultivo, que funcionam sem recirculação da água. Além disso, devido à sua complexidade mecânica, estes sistemas estão mais expostos a falhas técnicas, portanto, é necessária uma gestão cautelosa em termos de água, bem como na manutenção do equipamento (Badiola, Mendiola and Bostock, 2012; Martins *et al.*, 2010; Ray e Lotz, 2017; Rijn, Van, 2013; Schneider *et al.*, 2012).

Nos sistemas de aquacultura intensiva como, por exemplo, os sistemas de RAS, cerca de 25 % dos nutrientes inseridos são absorvidos pelas espécies cultivadas, sendo fulcral o manejo dos resíduos provenientes de dietas artificiais ao longo do processo produtivo (Buschmann *et al.*, 2008). Para tal é fundamental otimizar a composição das dietas e os métodos/estratégias de alimentação, de forma a maximizar a ingestão e assimilação de nutrientes, diminuindo assim o desperdício (ração não ingerida) e excreção, o que por sua vez contribui para uma redução considerável dos resíduos ao longo do processo produtivo.

Como uma forma de minimizar os impactos associados a estas práticas surge a aquacultura multitrófica integrada (IMTA) (Lopes and Lemos, 2016). Tal como o nome indica, o termo multi-trófico refere-se à integração de espécies de diferentes níveis no mesmo sistema. Através desta prática, teoricamente, os resíduos de produção de uma determinada espécie são reutilizados como recursos para outras espécies (Barrington, 2014). Desta forma, é possível aumentar a produtividade de uma exploração aquícola e reduzir os desperdícios, através de um sistema ambientalmente sustentável que recria as condições do meio natural (Hughes e Black, 2016).

1.4. I&D em Aquacultura

De forma a fornecer continuamente produtos de alta qualidade através de um sistema de produção sustentável, a aquacultura enfrenta diversos desafios a diferentes níveis. Para atingir este objetivo é necessário abordar novas estratégias de gestão e aplicar tecnologias de ponta para controlar e salvaguardar diversos fatores como o bem-estar, a segurança, a nutrição e as patologias, que são diretamente responsáveis pela qualidade do produto final.

Muitas das inovações na aquacultura, que contribuíram para o crescimento da produtividade, foram possíveis graças à investigação financiada pelo setor público e privado. O setor público tem desempenhado um papel ativo tanto no financiamento como na realização de I&D através de instituições públicas de investigação e universidades, como é o caso do CIIMAR. No setor privado, as empresas farmacêuticas e de rações para peixes também desempenharam papéis fundamentais no financiamento e execução de I&D relacionada com a alimentação, saúde e vacinação, como é o caso da Riasearch.

2. Riasearch

2.1. Descrição da Empresa

Em 2016, devido à inexistência de empresas destinadas à realização de ensaios nutricionais, surge a empresa Riasearch (fig. 5), localizada no Cais da Ribeira de Pardelhas, na freguesia da Murtosa, Aveiro. A Riasearch é pioneira na investigação aplicada e desenvolvimento experimental na área da aquacultura através da realização de ensaios nutricionais com a espécie *Penaeus vannamei*, fornecendo um serviço inovador para o setor da aquacultura.

Com o passar dos anos, e com a elevada procura, a Riasearch consegue hoje realizar diversos ensaios zootécnicos, com uma ampla gama de espécies aquáticas, como peixes marinhos (p. ex. *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Solea*

senegalensis), invertebrados (p. ex. *Penaeus vannamei*, *Paracentrotus lividus*, *Holothuria forskali*), entre outros.

A Riasearch presta também serviços de consultoria em aquacultura e em tecnologia de recirculação.

A empresa desenvolve também projetos de I&D em colaboração com parceiros académicos e industriais, a nível nacional e internacional, assim como centros de investigação por toda a Europa. Estes projetos têm como objetivo o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos no setor da aquacultura.



Figura 5 - Riasearch, Lda e logótipo

2.2. Principais Espécies Utilizadas

2.2.1. Crustáceos – Camarões

2.2.1.1. *Penaeus vannamei*

O “camarão-branco-do-Pacífico” (fig. 7), *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), é a principal espécie de camarão produzida a nível mundial, devido ao seu crescimento rápido e à sua qualidade organolética (Fu, Chen and Wang, 2014). Esta espécie

encontra-se em habitats marinhos tropicais, em águas com temperaturas normalmente superiores a 20 °C durante todo o ano (FAO, 2018).

O cultivo de *Penaeus vannamei* tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido a uma série de vantagens competitivas inerentes à espécie, tais como: uma elevada taxa de crescimento, um requerimento proteico relativamente baixo, uma elevada tolerância a densidades elevadas de cultivo, possibilidade de reprodução e/ou domesticação com taxas baixas de patogenicidade e, ainda, uma extrema capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo locais, nomeadamente a parâmetros como a salinidade e a temperatura da água (Bondad-Reantaso *et al.*, 2012).

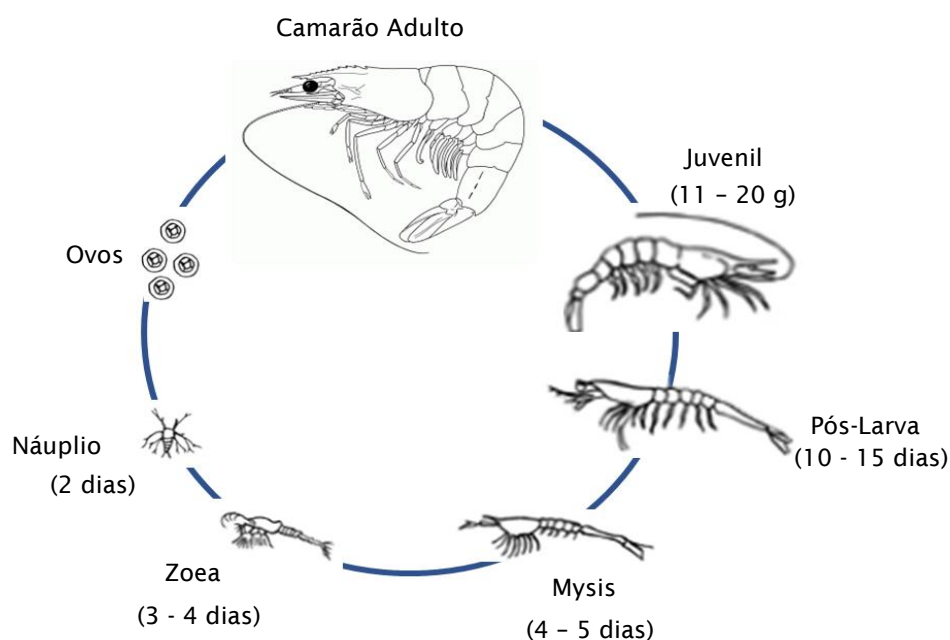


Figura 6 - Ciclo de vida do *Penaeus vannamei*. Adaptado de FAO, 2018

Os adultos desta espécie habitam e reproduzem-se no oceano aberto, enquanto as fases larvares e juvenis migram para estuários, lagunas e mangais até à maturação. As fêmeas com cerca de 6/7 meses libertam cerca de 100 a 250 mil ovos os quais são fertilizados e eclodem cerca de 16 horas depois. Após a eclosão os náuplios passam por diversas metamorfoses, representadas no esquema da figura 6.

Em aquacultura, a técnica mais utilizada para a reprodução desta espécie é a ablação do pedúnculo ocular da fêmea, que por sua vez induz a maturação dos ovários (Kannan and Thirunavukkarasu, 2015; Uawisetwathana *et al.*, 2011). Esta

técnica advém do facto da hormona inibidora da vitelogénese (“Vitellogenesis-Inhibiting Hormone” - VIH) ser sintetizada predominantemente no complexo de glândulas orgânicas X/sinus, localizado nas órbitas dos olhos. Quando a base ocular é removida a síntese do VIH diminui e a GnRH (hormona libertadora de gonadotropina) ativa as vias de sinalização do cálcio, o que por sua vez leva ao aumento do ião de cálcio intracelular, o que estimula a foliculogénese, estradiol e a produção de progesterona no ovário. Por fim, a progesterona induz a maturação dos oócitos na fase 1 em oócitos da fase 4 (Kannan and Thirunavukkarasu, 2015; Uawisetwathana *et al.*, 2011). Apesar desta prática ser regular em todo o mundo, atualmente, algumas empresas já conseguem induzir a reprodução desta espécie sem a ablação do pedúnculo ocular como, por exemplo, a Aquasul Camarão Marinho no Brasil.

Devido ao interesse económico da espécie e a necessidade de substituir a farinha de peixe por outras fontes proteicas, nos últimos anos, vários esforços têm sido depositados em compreender melhor a sua biologia, a fim de aperfeiçoar a sua produção, otimizar os seus custos e melhorar o bem-estar dos animais.

Na Riasearch os ensaios com *P. vannamei* são efetuados com Pós-larvas, juvenis ou adultos e têm, na maioria dos casos, como objetivo testar novas microdietas de alto desempenho destinadas a sustentar o crescimento e desenvolvimento durante fases específicas do seu desenvolvimento, diminuir as taxas de canibalismo e potenciar o sistema imunitário.



Figura 7 – *Penaeus vannamei* adulto.

2.2.2. Peixes

2.2.2.1. *Sparus aurata*

A dourada *Sparus Aurata* (fig. 8) foi uma das primeiras espécies marinhas a ser produzida em aquacultura, continuando a ser uma das principais espécies produzidas no Mediterrâneo (Grécia, Turquia, Itália, Espanha e Portugal). Dependendo das condições (sobretudo temperatura) o período de cultivo varia entre 18 e 24 meses para alcançar o tamanho comercial (peso médio de 400g), embora algumas empresas prolonguem o período de cultivo para comercializar peixe com mais de 1 kg (FAO, 2018).

Apesar de uma fase larvar em que são muito suscetíveis à manipulação, na fase juvenil a dourada é uma espécie consideravelmente mais resistente do que com outras espécies marinhas, sendo bastante tolerante às variações climáticas e ao tipo de alimento nas fases de desenvolvimento posteriores. Estas características tornaram a dourada uma das espécies mais importantes da aquacultura marinha, sendo por isso utilizada como uma espécie modelo em muitos estudos de investigação, para a qual se desenvolveram diversas ferramentas moleculares que permitem aprofundar o conhecimento sobre vários processos biológicos.

De referir que a dourada pertence ao grupo de espécies que muda de sexo, neste caso caracteriza-se por apresentar um hermafroditismo protândrico, ou seja, a gónada masculina aparece primeiro. Com o crescimento e desenvolvimento ocorre inversão de sexo, pelo amadurecimento da gónada feminina.

Na Riasearch a dourada é utilizada em ensaios de nutrição, maioritariamente focados na substituição da farinha e óleo de peixe por ingredientes de carácter mais sustentável.



Figura 8 - *Sparus aurata*.

2.2.2.2. *Dicentrarchus labrax*

O robalo, *Dicentrarchus labrax* (fig.9), devido à firmeza da sua “carne”, é uma espécie de elevado valor comercial, bastante apreciada em Portugal e em toda a Europa. O robalo, juntamente com a dourada, foi das primeiras espécies marinhas a ser produzida em aquacultura com objetivo comercial.

Como outras larvas de peixes marinhos, a alimentação da fase larvar é feita com alimento vivo, primeiro rotíferos e depois Artémia. Esta espécie possui um protocolo, desenvolvido em França, que permite que as suas primeiras alimentações sejam de artémia. Assim, após a eclosão as larvas de robalo são mantidas a baixa salinidade e em total escuridão, por cerca de 7 dias, de forma a permitir que as reservas endógenas (vitelo e gota lipídica) sejam utilizadas lentamente para o crescimento larvar, de forma que ao 7º dia a larva de robalo tem uma boca suficientemente grande para ingerir um náuplio de artémia (Darias *et al.*, 2010).

Para além da investigação em nutrição e no desenvolvimento sustentável da atividade, esta espécie também é usada na Riasearch para testar dietas de acabamento, que permitam melhorar os níveis de determinados nutrientes para

benefícios Humanos, como é o exemplo dos ácidos gordos de cadeia longa (ômega-3).



Figura 9 - *Dicentrarchus labrax*.

2.2.3. Plantas Halófitas

É de conhecimento geral que o planeta está a atravessar uma crise no que se refere às reservas naturais de água doce e aumento da salinização do solo e dos lençóis de água (Singh *et al.*, 2014; Ventura and Sagi, 2013). Tendo em conta esta questão, torna-se essencial o desenvolvimento de novos tipos de cultivos (Ventura *et al.*, 2015), sendo uma das opções para mitigar este problema a domesticação de plantas que possuem tolerância inerente ao sal para produção comercial (Rozema and Schat, 2013).

As plantas halófitas, tolerantes ao sal, crescem no solo, perto da costa, ou em águas com níveis elevados de salinidade, tais como nos mangais, pântanos, praias e semidesertos salinos. Atualmente, este tipo de plantas tem ganhado mais importância, tendo em consideração as suas numerosas aplicações e potencialidades comerciais, tais como: recuperação de terrenos degradados, produção de biomassa, forragem e sementes oleaginosas com elevado valor nutricional, utilização como precursor de biocombustíveis, dessalinização de águas costeiras e podem ser utilizadas como metabolitos secundários em produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e nutracêuticos (Buhmann *et al.*, 2015; Fan *et*

al., 2013; Glenn *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1996; Swingle, Glenn e Squires, 1996).

São vários os exemplos deste tipo de plantas e são consideradas diferentes classificações mediante as características dos habitats, a composição química dos brotos ou a capacidade de segregar iões (Ruan *et al.*, 2010). Dentro da grande variedade de espécies de plantas halófitas existentes destacam-se, atualmente, as Salicórnia devido ao seu elevado potencial económico, tendo ganho uma grande popularidade especialmente na culinária.

2.2.3.1. *Salicornia ramosissima*

As plantas do género Salicórnia crescem em habitats costeiros ou interiores, distribuídos pela Eurásia, América do Norte e África do Sul (Davy, Bishop and Costa, 2001). Tal como dito anteriormente, o interesse destas plantas pelos seus produtos comerciais versáteis tem vindo a crescer, tornando-as promissoras candidatas à produção em sistemas integrados (Ventura *et al.*, 2011). Este género despertou também interesse devido às suas capacidades de fitorremediação, na remoção de nutrientes (Brown *et al.*, 1999) e na acumulação de vestígios de metais (Sharma *et al.*, 2010), pelo que o seu cultivo com o objetivo de eliminar compostos orgânicos em excesso, que se tornam tóxicos, e remover elementos, tais como Se, Pb, Cr, Cd, Zn, As, produtos petrolíferos ou núcleos radioativos através da fitorremediação e biorremediação está de facto em desenvolvimento.

A *Salicornia ramosissima* (fig. 10) é uma planta comum e generalizada na costa europeia (Davy, Bishop and Costa, 2001), nomeadamente nos sapais da Península Ibérica (Castroviejo and Coello, 1980). O crescimento ótimo para esta planta está em baixa salinidade (5 a 10), mas também pode tolerar níveis elevados de salinidade (20 a 30). No entanto, a sua germinação é significativamente maior com salinidades inferiores a 1 (Rubio-Casal *et al.*, 2003). Estas características, juntamente com a distribuição geográfica e o potencial de biorremediação do género Salicórnia, fazem da *Salicornia ramosissima* uma excelente candidata à fitorremediação.

Na Riasearch a produção de salicórnia está ligada ao projeto “AQUACOMBINE” e passa por fornecer a biomassa de salicórnia necessária e liderar o

desenvolvimento e teste de halófitas com base em rações para robalo, dourada e camarão (Thomsen, 2019).



Figura 10 - *Salicornia ramosissima* na estufa de produção da RIASEARCH.

3. Relatório de Estágio

3.1. Objetivos

O estágio na Riasearch teve como principal objetivo o contacto com a realidade empresarial na área da aquacultura, integrando as mais diversas rotinas com diferentes espécies e sistemas.

O estágio possibilitou-me a oportunidade de pôr em prática a experiência teórica e prática que tenho vindo a adquirir durante o primeiro ano do mestrado, tendo participado em diferentes ensaios. No decorrer do relatório será descrito um dos ensaios realizados com a espécie *Penaeus vannamei*, com o objetivo de descrever, de uma forma geral, como se realizam ensaios com camarão.

3.2. Instalações

A empresa está dividida em 4 espaços principais (fig. 11): área de laboratório e escritório (A), zona técnica (B), salas de ensaios (C_1 e C_2) e estufa (E_1 – leiras; E_2 – sistema experimental para camarões). Estes espaços serão descritos nos próximos tópicos.

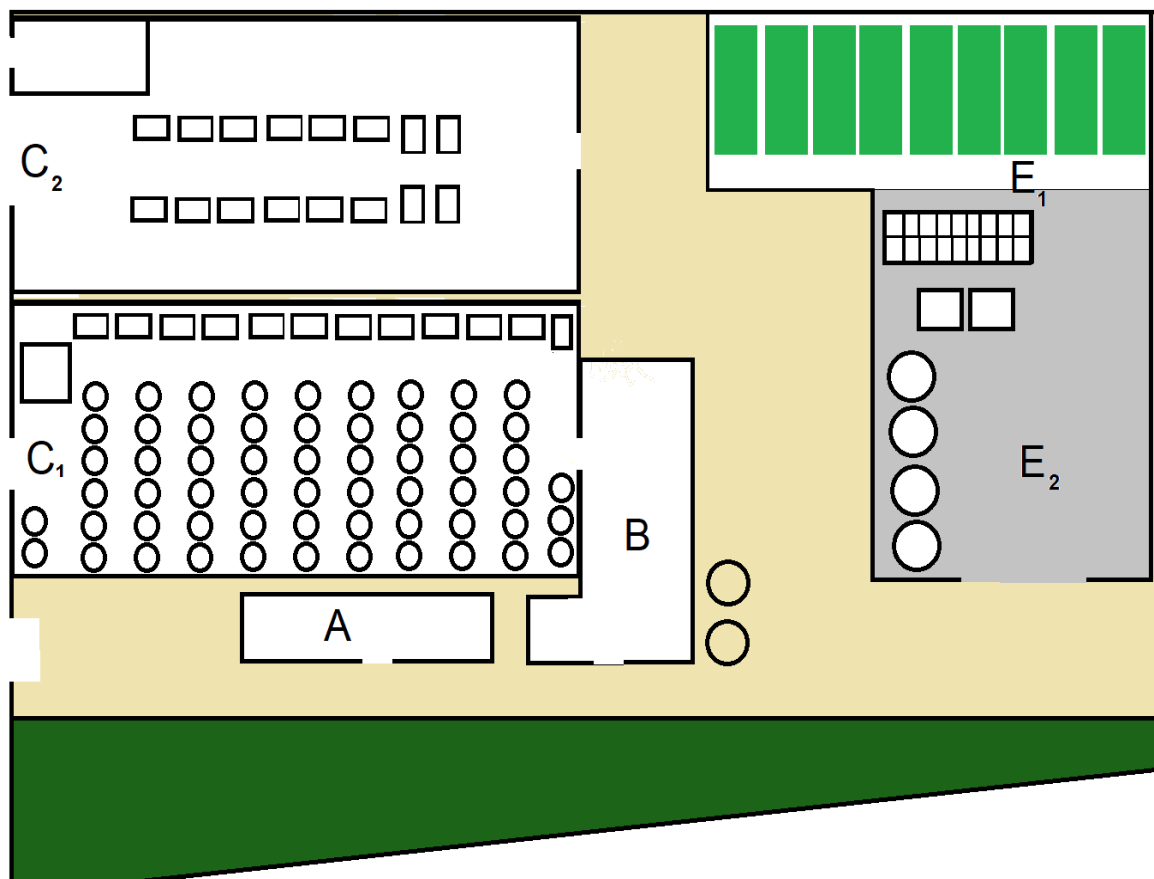


Figura 11 - Esquema Riasearch, Lda. (A – Laboratório e Escritório; B – Zona técnica, C – Biotério e Armazém 2; E – Estufa, Leiras de salicórnia e Sistema dos camarões).

3.2.1. Zona Técnica

3.2.1.1. Captação e Tratamento da Água

A zona técnica (fig. 11 - B) é o coração da empresa, onde se encontra o furo principal de captação de água e todos os equipamentos referentes aos circuitos de RAS.

A água, com salinidade 18 ± 1 , é captada através de um furo, com cerca de 8 metros de profundidade, para dois reservatórios interligados, localizados na parte exterior, junto à zona técnica (fig. 7 - A). Esta água é rica em ferro dissolvido e, de modo a remover este metal, é utilizado um equipamento que injeta ar (sistema Venturi) de modo a oxidar o ferro existente. Posteriormente, a água segue para um filtro de areia (fig. 12) que remove as partículas de ferro precipitadas. Após este tratamento prévio, a água pode ser desviada para qualquer sistema pretendido, por gravidade ou através de bombas.



Figura 12 - Reservatórios de água e filtro de areia.

3.2.1.2. Sistema de RAS

A Riasearch utiliza no seu sistema principal um “Recirculating Aquaculture System” (RAS), esquematizado na figura 13, com um volume total de 40 m³ de capacidade máxima (50 tanques de 350 litros). Neste sistema, os efluentes provenientes dos tanques de cultivo são direcionados para dois reservatórios subterrâneos na zona técnica. Destes tanques, a água é bombeada para dois filtros mecânicos (fig. 14) de sacos de polipropileno (que podem conter filtros de 25 ou 50 µm), os quais vão remover os sólidos suspensos da água (fezes e restos de alimento). Em seguida, a água é bombeada para o escumador, onde as substâncias orgânicas dissolvidas são removidas. O escumador (fig. 14), através de um sistema de Venturi, injeta uma mistura de ar e ozono (O₃) na parte inferior da câmara de reação, de forma a criar bolhas de gás na coluna de água. À medida que as bolhas ascendem à superfície, estas absorvem as partículas mais finas, colóides e sólidos

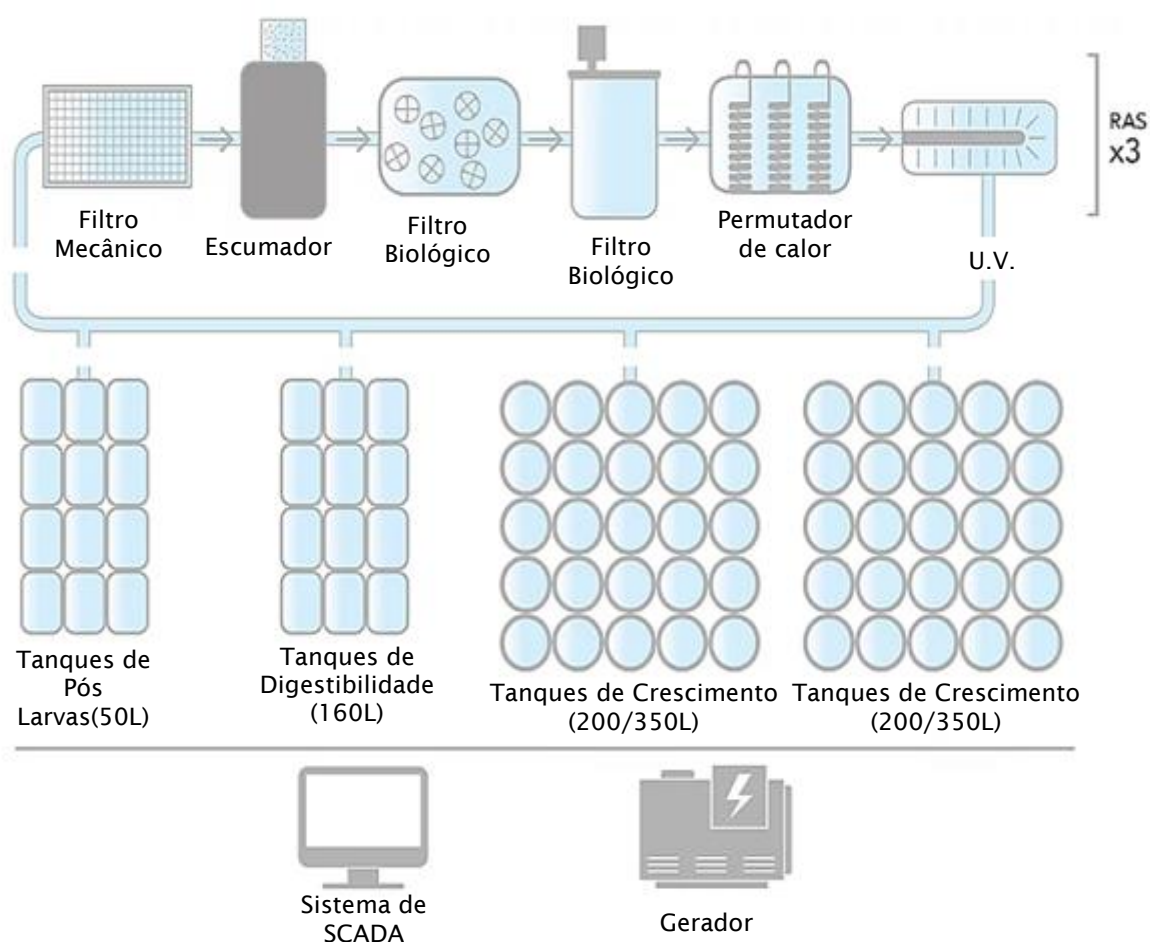


Figura 13 - Esquema do sistema de RAS da Riasearch, Lda. Fonte: Riasearch

dissolvidos presentes na água. Quando atingem a superfície são expelidas da água devido à sua flutuabilidade, em forma de espuma, sendo posteriormente recolhidas no copo do escumador.

A introdução de ozono no escumador tem como objetivo minimizar potenciais patogênicos, decomposição de resíduos orgânicos, reduzir a turbidez da água e assim melhorar a sua qualidade global. De forma a minimizar a produção de subprodutos tóxicos, associados à desinfecção por ozono, esta é controlada através de uma Sonda de Potencial Redox (ORP – “Oxidation Reduction Potencial”), com limites de segurança estabelecidos.

Depois de passar pelo Escumador, a água é bombeada para o filtro biológico (fig. 14) por aspersão (“trickling tower”), onde se dá a oxidação da amónia (NH_3 e NH_4^+) em nitritos (NO_2^-) e dos nitritos em nitratos (NO_3^-), e, simultaneamente, o processo de desgaseificação. Este biofiltro está completo com biobolas plásticas, nas quais existem colónias de bactérias heterotróficas nitrificantes (p. ex. dos géneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) responsáveis pelo processo de nitrificação. Os nitratos são a forma final e menos tóxica do processo de nitrificação, sendo de um modo geral bem tolerados pelos animais. À medida que a água passa pelas biobolas, o oxigénio do ar é absorvido, enquanto o dióxido de carbono desgaseifica. Este sistema possibilita níveis superiores de oxigénio na água, porém existe um compressor de gás atmosférico que é ativado automaticamente (por uma sonda) caso o nível baixe, garantindo assim a aerificação individual dos tanques de cultivo. Após a filtração biológica, a água é direcionada para dois reservatórios subterrâneos (denominados de “reservatórios de água limpa”), de onde segue para o filtro ultravioleta (UV) (fig. 15 – A). No UV dá-se o processo de desinfecção através da incidência da luz ultravioleta (UV-C, 200 - 280 nm) na água. Este procedimento danifica/destrói o material genético (DNA/RNA) dos organismos presentes na água (Sharrer *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2002), o que resulta na sua inibição, controlando assim potenciais doenças. A irradiação por ultravioleta, ao contrário do ozono, não produz resíduos tóxicos e, além disso, promove a remoção de resíduos de ozono dissolvido (Summerfelt *et al.*, 2004).



Figura 14 - Filtro mecânico, escumador e filtro biológico.

Por fim, a água passa pelos permutadores (fig. 15 -B) de calor e segue para os tanques de cultivo. O permutador baseia-se no conjunto de placas, onde a energia é transferida das placas com água doce aquecida ou refrigerada, para as placas com água salgada do sistema. A água doce é aquecida ou refrigerada através de uma bomba de calor que liga automaticamente consoante a temperatura pretendida.

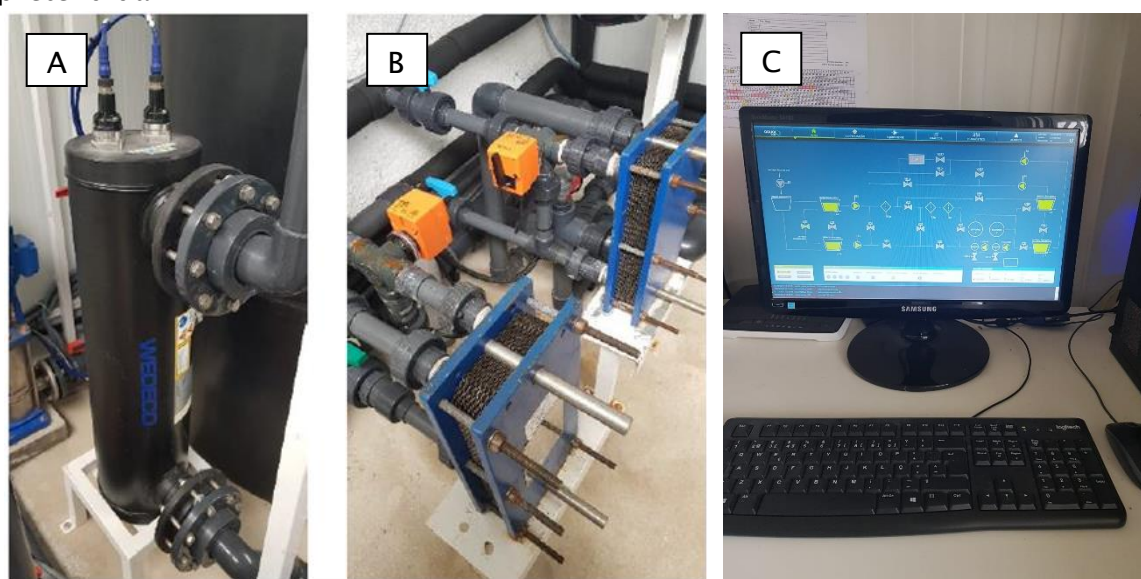


Figura 15 - A - Sistema UV, B - Permutadores de calor, C - Sistema SCADA.

O sistema de RAS pode ser dividido em 2 sistemas RAS independentes, visto todos os equipamentos descritos anteriormente existirem em duplicado. As instalações são monitorizadas por um sistema de automação e controlo (SCADA) (fig. 15 - C) que abrange as bombas, o oxigénio, a temperatura e a iluminação. Este sistema encontra-se ligado a um sistema de alarme de 24 horas, permitindo uma melhor supervisão e minimizando riscos. Existe também um gerador na parte

exterior das instalações que, em caso de falha da rede elétrica, assume o fornecimento de energia automaticamente.

3.2.2. Biotério

O biotério é a área onde estão localizados os tanques do sistema (RAS) previamente descrito. Esta zona contém 50 tanques (fig. 16), com capacidade entre os 200 e os 350 L, podendo ser utilizados num único sistema ou em 2 sistemas independentes de 25 réplicas.

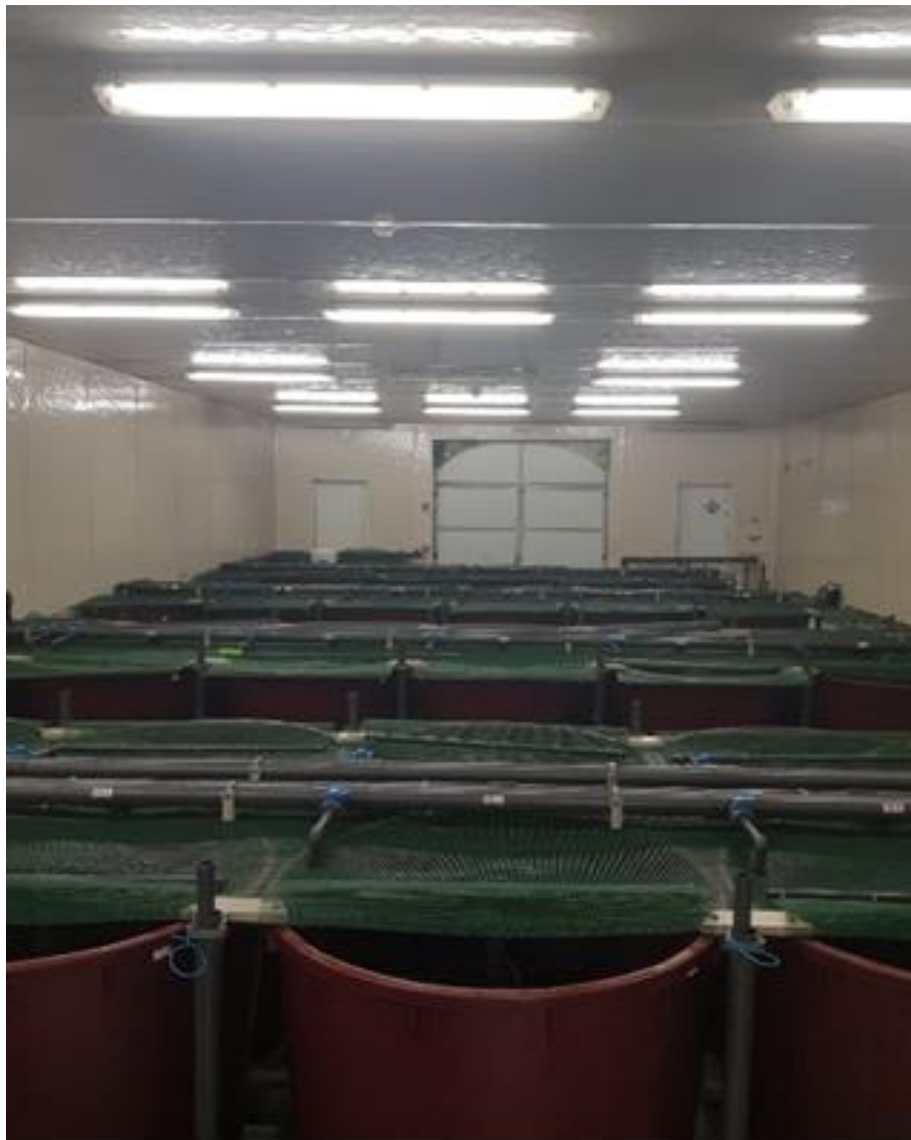


Figura 16 – Tanques biotério.

Em fevereiro de 2021, foi criado um sistema para a aclimação de PL de camarão, de forma a facilitar o procedimento e minimizar a mortalidade. Este sistema pode também ser ligado diretamente ao sistema principal.

O novo sistema é constituído por 12 tanques (de 160 L) e uma sump de 400 L (fig. 17). O sistema baseia-se no sistema de RAS principal, mas em menor escala, sendo constituído por duas mangas de 25 micrómetros (filtração mecânica), dois escumadores, filtro biológico, um filtro UV e 2 termostatos. Cada tanque é aerificado individualmente, de forma a garantir níveis ótimos de oxigénio.



Figura 17 - Tanques de aclimação e respetiva sump.

3.2.3. Estufa

A estufa é dividida em 2 zonas, uma zona para cultivo de plantas halófitas e uma para cultivo de crustáceos em RAS (fig. 18 – A e B).

A zona de cultivo de plantas atualmente contém 9 leiras para cultivo de *Salicornia ramosissima*. Destas leiras, cinco possuem um sistema de rega gota a gota, enquanto as restantes quatro utilizam um sistema de rega por nebulização. A rega pode ser feita com água doce da companhia (que passa por um filtro de cloro) ou água salgada do biotério.

A área para cultivo de crustáceos é constituída por um sistema de RAS constituído por dezoito tanques de 50L, atualmente utilizados para ensaios com Pós-larvas (PL) e juvenis de camarão, e quatro tanques de 600L, utilizados para armazenar o stock de indivíduos. Estes são suportados por uma sump (constituída por dois tanques de 400 L interligados). Os efluentes provenientes dos tanques de stock e dos tanques de ensaio passam por um filtro mecânico de cartucho e 2 filtros de mangas de 50 micrómetros antes de entrar na sump. Na sump encontra-se um escumador e um filtro biológico. Posteriormente, a água é bombeada para o UV e para o refrigerador. Todos os tanques possuem um sistema de aerificação individual de forma a garantir níveis de oxigénio ótimos.



Figura 18 - A - Leiras com salicórnia durante a rega, B - cultivo de crustáceos;

3.2.4. Segundo Armazém

O segundo armazém, adquirido em 2020, será uma nova área de ensaios da Riasearch. Devido à pandemia, as obras e a instalação de novos sistemas de RAS ainda não foram possíveis.

Atualmente, o segundo armazém contém 2 sistemas (RAS) (fig. 19), ambos constituídos por 6 tanques e 2 sumps de 180L. Estes sistemas podem ser interligados funcionando como um sistema único de 12 tanques.

A água dos tanques cai por gravidade para o esgoto e dirige-se para a sump. Antes de chegar à sump a água passa por um filtro mecânico, onde são recolhidas as partículas sólidas. Nesta sump parte da água é recolhida pelo escumador, com injeção de ozono, e segue para a segunda sump, onde se encontram 2 bombas. Uma das bombas envia a água para o refrigerador, UV e biofiltro, que posteriormente cai por gravidade para a sump. A segunda bomba retorna a água para os tanques de cultivo.



Figura 19 - Sistema do segundo armazém.

3.3. Manutenção e Rotinas

Devido aos diferentes tipos de ensaios realizados na Riasearch, as rotinas diárias podem variar consoante as diferentes espécies e com as diferentes densidades. Estas rotinas são essenciais para o bom funcionamento dos sistemas, que asseguraram a sobrevivência, saúde e o bem-estar dos animais alojados nos tanques.

Uma das rotinas essenciais é a verificação diária de todos os tanques, de forma a identificar possíveis alterações de comportamento ou fisiologia nos animais, assim como algum problema com o sistema. Em caso de algum animal estar morto, este é removido do tanque, pesado e congelado para futura recolha por parte da Ambimed, Lda, especialistas em gestão integrada de resíduos.

A limpeza das sondas redox, localizadas nos escumadores do sistema principal, é também uma tarefa diária, de forma a garantir uma leitura correta dos valores de ORP. Estas sondas, que além de controlarem os níveis de ozono injetados nos sistemas também medem a temperatura, são devidamente calibradas todos os meses, assim como as sondas de oxigénio localizadas junto a elas (protocolo de calibração em anexo).

Para assegurar a boa qualidade da água são também realizadas análises dos parâmetros físico-químicos da água. Os parâmetros analisados diariamente são o oxigénio dissolvido (O_2), salinidade, a temperatura ($^{\circ}C$) e o pH, através de uma sonda multi-paramétrica portátil (HANNA instruments, Portugal) (fig. 20 - A). Semanalmente são analisados nitritos, os nitratos, a amónia e o ferro dissolvido, através de um espectrofotómetro (HACH DR 1900) (fig. 20 - B). Em caso de necessidade, estes são analisados com maior frequência.

Caso os valores de pH sejam inferiores ao pretendido é adicionado bicarbonato de sódio à água do sistema de forma a aumentar a alcalinidade e consequentemente o pH.

São também feitas diariamente trocas de água entre 10 e 25 % em todos os sistemas (protocolos de trocas de água em anexo). A frequência destas pode ser maior, caso os parâmetros estejam fora dos valores normais.

A substituição dos filtros mecânicos (protocolos em anexo) de todos os sistemas é também feita diariamente, assim como a limpeza dos tanques. Esta pode ser feita com um camaroeiro (tanques do biotério) ou com um sifão. Semanalmente são limpos os tubos de nível e as saídas de água de forma a eliminar o biofilme formado. Este biofilme também se acumula dentro das placas do permutador de calor, que são limpas de 15 em 15 dias (protocolo em anexo).

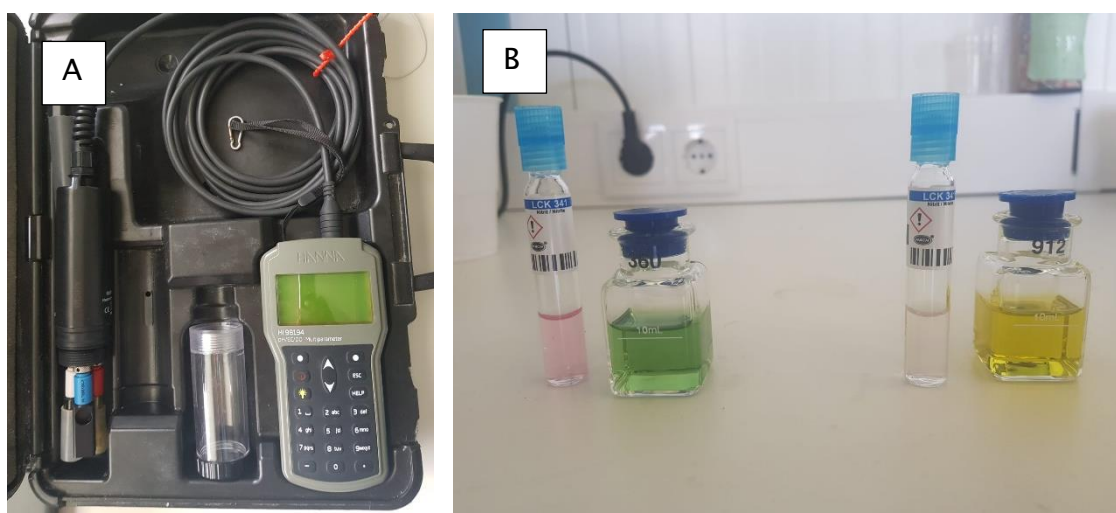


Figura 20 – A - Sonda multi-paramétrica, B - frascos para análise de Amônia e Nitrito.

No que toca às alimentações, os animais são alimentados várias vezes ao dia, conforme as especificações de cada ensaio. Para os ensaios com dourada e robalo as alimentações são feitas manualmente e a ração pesada e registada ao fim do dia. Nas PL de camarão as alimentações são feitas através de alimentadores automáticos, previamente cheios com uma quantidade de ração determinada (Fishmate F14) (fig. 21). As alimentações dos tanques de stock de camarões são asseguradas por alimentadores automáticos (HFS FEEDER) que podem ser ajustados através de um controlador integrado (fig. 21).

Estas e outras rotinas menos frequentes estão descritas passo a passo nos protocolos em anexo. Estes protocolos foram criados com o intuito de facilitar estes procedimentos para futuros estagiários e trabalhadores.

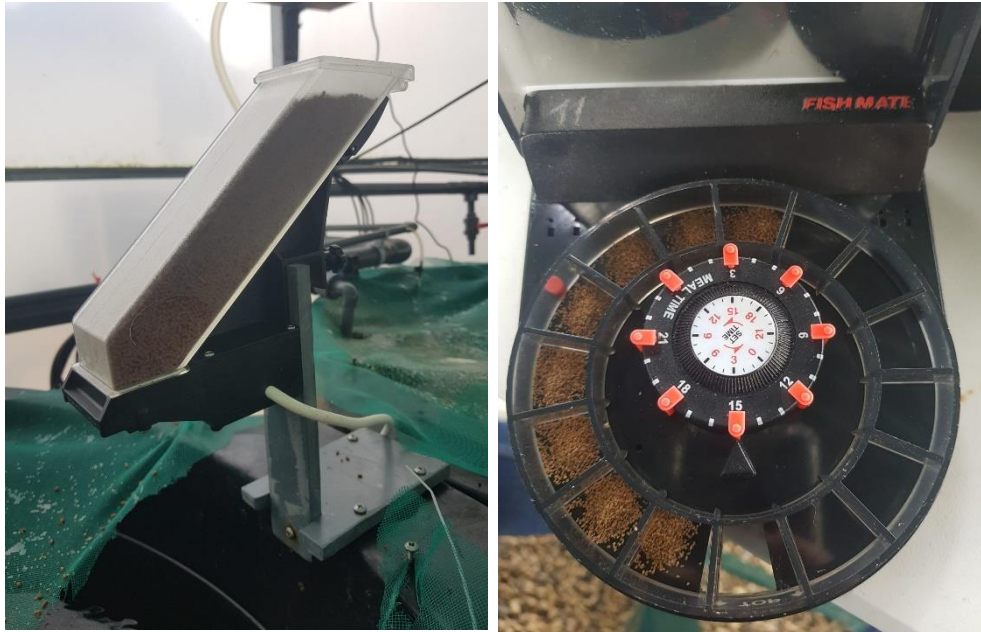


Figura 21 - Alimentadores automáticos (*HFS FEEDER* e *Fishmate F14*, respetivamente)

3.4. Transporte e Aclimação das Pós-Larvas de *Penaeus vannamei*

Durante o estágio participei em duas receções de PL de camarão *P. vannamei*. Os exemplares foram adquiridos a maternidades nos Estados Unidos da América, enviados por avião para Lisboa e, posteriormente, de automóvel para a Riasearch. Nos 2 envios o tempo de transporte foi cerca de 72 horas e, à chegada, as PL encontravam-se na fase PL12 (fig. 22).

As PL foram transportadas em sacos de polietileno resistentes a furos, cheios com um terço de água do mar filtrada e dois terços com oxigénio puro (fig. 22). Após a selagem, os sacos foram colocados em caixas de poliestireno juntamente com “heat packs” para manter a temperatura durante o transporte.

À chegada foi distribuído um saco de poliestireno por tanque (vazio) e foi iniciado um sistema de conta gotas com a água do sistema. Este procedimento permite que a subida de temperatura seja de 1°C por hora e que a salinidade e o PH se alterem de forma gradual.

A aclimação finaliza quando a temperatura da água dos tanques atinge a temperatura da água do sistema. Por fim, o fornecimento de água dos tanques é calibrado para o caudal pretendido.



Figura 22 - Sacos de polietileno e Pós-larvas com 12 dias à chegada

3.5. Amostragens

Durante o estágio tive a oportunidade de participar em diversas amostragens de *P. vannamei*, *S. aurata*, *D. labrax* e *S. ramosissima* (fig. 23). No entanto, devido à confidencialidade dos ensaios, os detalhes dos procedimentos não serão revelados.

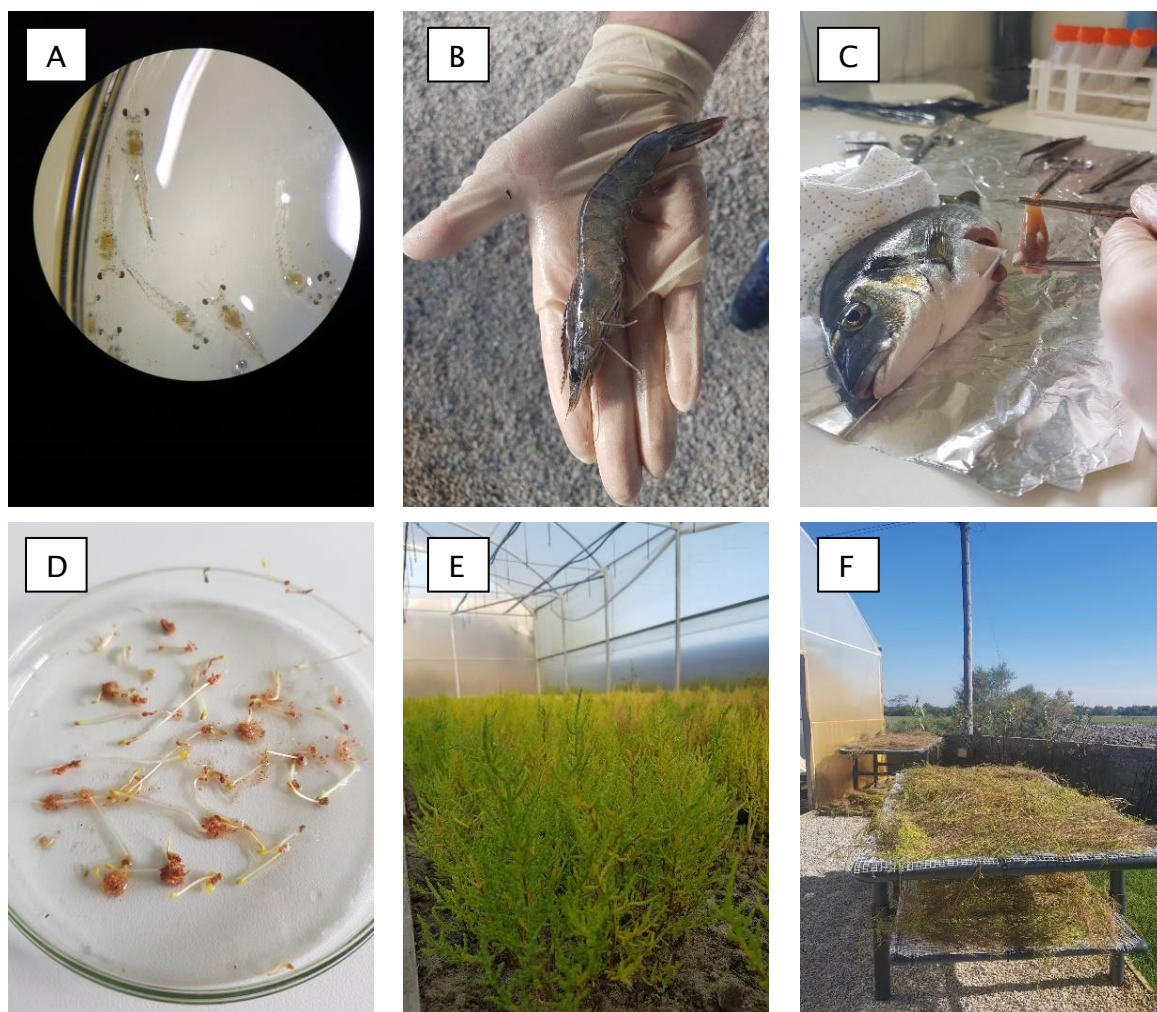


Figura 2315 – A – PL's com 11 dias; B – Camarão *P. vannamei* com 8 meses; C – Amostragem de *S. Aurata*; D – Rebentos de *S. ramosissima*; E – *S. ramosissima*; F – Mesas de secagem de *S. ramosissima*.

As amostragens, de uma forma global, consistiram em sedação e eutanásia, pesagens, medição de comprimento, recolha de sangue, fezes, órgãos, muco e músculo. Nas amostragens de salicórnia, participei na apanha, secagem, embalamento e colheita. Tive também a oportunidade de participar na melhoria e montagem de alguns dos sistemas da empresa, entre elas, melhoria sistema de

rega, construção do sistema do 2º armazém, alteração do sistema de aclimação das PL e melhoria do sistema dos camarões.

3.6. Cultivos Auxiliares

A artémia spp., embora não seja uma dieta natural, é considerada um alimento ideal para diversas espécies em fase larvar, por apresentar inúmeras vantagens, tais como, o elevado valor nutricional (após a eclosão), tamanho reduzido, mobilidade e, conseqüentemente, o incentivo à predação (Lavens and Sorgeloos, 2000).

Os náuplios de artémia recém-eclodidos (que não se alimentam) são nutricionalmente mais ricos que a fase seguinte pois, ainda têm reservas vitelinas com aminoácidos essenciais e ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa. O uso de artémia em fases mais avançadas do seu desenvolvimento, após o consumo das reservas, requer enriquecimento para garantir elevados valores nutricionais.

Tal como anteriormente dito, as Pós-larvas são alimentadas inicialmente com artémia recém eclodida. Os cistos de artémia salina são incubados num tanque cilindro-cônico de 80L, durante 24 horas, nas seguintes condições: temperatura a 28°C, salinidade 27, com forte arejamento da água (sem pedra difusora) e iluminação constante (fig.24 – B e C).

A quantidade de cistos de artémia que é utilizada é calculada através do número de larvas que se pretende alimentar. Após a eclosão dos náuplios, é necessário separá-los dos restantes materiais resultantes da eclosão, nomeadamente, cistos não eclodidos, cápsulas e metabolitos. De forma a facilitar este processo são utilizados cistos de artémia com um revestimento magnético (Sep-Art Artemia Cysts) (fig. 24 - A). Isto possibilita a separação dos náuplios de artémia dos cistos não eclodidos, que são capturados por um conjunto de ímans no Sep-Art Separator (fig. 24 - D), permanecendo os náuplios de artémia (não magnéticos) prontos para serem recolhidos.

Posteriormente, segue-se a lavagem dos náuplios com água do próprio sistema através de um crivo (fig. 24 - E), mantendo-os num recipiente com arejamento e volume conhecido (fig. 24 - F).

Para serem fornecidos às PL os náuplios são contabilizados com o auxílio de uma pipeta volumétrica.



Figura 24 – A – Pacote comercial de Cistos de artémia; B – Tanque para eclosão de artémia; C – Cistos de artémia durante o procedimento; D – *Sep-Art Artemia Cysts*; E – Saída dos náuplios de artémia do *Sep- Art* com natação livre; F – Aparência final dos náuplios.

4. Considerações Finais

A realização deste estágio permitiu consolidar as aprendizagens adquiridas ao longo do meu percurso académico. Proporcionou-me a aquisição de conhecimentos científicos e práticos com diversas espécies e sistemas, que por sua vez se conjugaram com diversas unidades curriculares lecionadas previamente.

A participação em diversas amostragens e ensaios, com diferentes espécies e metodologias permitiram adquirir competências para organizar e integrar ensaios/amostragens futuras.

A participação na construção e melhoria de sistemas permitiram uma maior compreensão das necessidades básicas dos sistemas de RAS, idealizar e modificar sistemas em pequena escala, assim como realizar a sua manutenção.

5. Ensaio com *Penaeus vannamei*

5.1. Enquadramento

O camarão *P. vannamei*, tal como dito anteriormente, é uma espécie muito procurada em aquacultura e, nos últimos anos, a sua produção tem crescido exponencialmente por todo o mundo.

O sucesso na produção desta espécie depende principalmente de fatores essenciais como a qualidade da água e a gestão da alimentação. A baixa qualidade da água demonstrou causar stress que eventualmente leva à perda de apetite, baixos índices de crescimento e maior suscetibilidade a doenças. A fim de manter a qualidade da água e prevenir doenças, nos últimos anos, foram empregues esforços no desenvolvimento de práticas inovadoras, tais como a produção de camarão sob tecnologia de biofloc (BFT) e sistemas fechados de recirculação de aquacultura (RAS) (Ray and Lotz, 2017; Yun *et al.*, 2016).

A proteína é um nutriente essencial e o mais caro nas dietas para camarão. Índices baixos de proteína podem levar a uma redução drástica do crescimento, pelo que as dietas devem ser cuidadosamente formuladas de modo a satisfazer as necessidades do camarão cultivado em determinada fase de vida (Yun *et al.*, 2016). Estudos sobre as necessidades proteicas nas várias fases de vida do camarão de perna branca permitiram formular várias rações para uma melhor digestibilidade dos nutrientes, através da utilização simultânea de quantidades óptimas de proteínas (Yun *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2015).

É extremamente importante compreender estas necessidades nutricionais em todas as fases da vida do camarão de perna branca, mas especialmente nas fases larvares. O desenvolvimento de dietas e protocolos alimentares adequados são essenciais, não só para ajudar na transição de alimentos vivos para dietas artificiais, mas também para melhorar o crescimento e a ingestão de rações, e em última análise, aumentar a eficiência da produção desta espécie.

5.2. Objetivos

Este ensaio, inserido no projeto SHELLWIN, teve como objetivo avaliar o desempenho de crescimento, condição imunitária e estado oxidativo de Pós-larvas de camarão alimentados com diferentes microdietas: quatro formulações experimentais criadas no âmbito do projeto e duas dietas de referência.

Apesar dos dados obtidos serem confidenciais, a inserção deste tópico no relatório de estágio é relevante para dar a conhecer a metodologia aplicada em vários projetos ao longo dos meses de estágio.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Aclimação e Sistema Experimental

As Pós-larvas de *P. vannamei* utilizados para o ensaio foram obtidos através de uma maternidade especializada (Miami Aquaculture, Flórida, EUA) e aclimatados tal como descrito no ponto 2.5.

O ensaio teve a duração de 21 dias e foi realizado através da utilização de 18 tanques de 40 L do sistema de produção de crustáceos, descrito no ponto 2.3.3.

Durante o ensaio, diariamente, foram efetuadas trocas de água (10 %), os tanques foram sifonados individualmente e foram medidos os parâmetros: pH, temperatura, salinidade e oxigénio dissolvido. Os níveis de amónia e nitritos foram medidos semanalmente para garantir a boa qualidade da água. Estes parâmetros foram mantidos de acordo com a tabela 1. Para este ensaio foi utilizado o fotoperíodo natural diário.

Tabela 1 - Parâmetros da água durante o ensaio

Parâmetro	Valor
Temperatura	27,04 ± 0,8 °C
Oxigênio dissolvido	5,4 ± 0,3 mg/L
pH	7,8 ± 0,1
Salinidade	21,6 ± 0,3
Amônia	0,0 ± 0,0
Nitritos	0,0 ± 0,0

5.3.2. Desenho Experimental

Para o ensaio foram distribuídos aleatoriamente grupos de 300 PL por tanque, com um peso corporal médio inicial de 5 mg. Para cada uma das 6 dietas testadas foram atribuídos 3 tanques aleatoriamente, com cerca de 40 L, como é possível observar na figura 25.

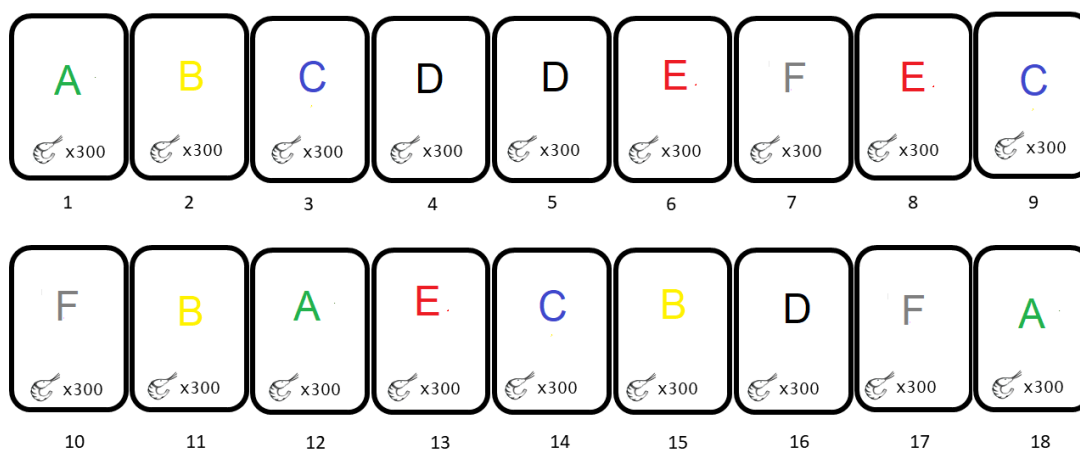


Figura 25 - Distribuição das dietas por tanque

A alimentação foi fornecida de 3 em 3 horas através de alimentadores automáticos (fishmate F14), perfazendo assim 8 alimentações diárias *ad libitum*. De forma a ajustar a quantidade de ração fornecida, todas as manhãs era efetuada uma avaliação visual de cada tanque, sendo fornecida uma pontuação (tabela 2) que seria contabilizada no próximo dia. Esta pontuação baseia-se na quantidade de comida aferida visualmente no fundo do tanque. Caso não seja visível a ração é dada uma pontuação de 2 (+20 %), caso seja visível muita ração é dada a pontuação -2 (-

20 %), os restantes valores são utilizados para casos intermédios. Esta avaliação permitia controlar a quantidade de ração fornecida às PL evitando assim desperdícios ou falta de alimento. Antes de recarregar os alimentadores estes eram limpos e procedia-se à pesagem da ração retida, para o cálculo correto da ração fornecida a cada tanque (fig. 26).



Figura 26 - Limpeza e pesagem dos alimentadores.

Tabela 2 - Pontuação para estimar alterações na ração fornecida

Pontuação	Quantidade	
-2	- 20 %	Diminuir
-1	- 10 %	
0	0 %	Sem Alteração
1	+10 %	Aumentar
2	+20 %	

5.3.3. Amostragem

Para a amostragem inicial foram selecionados aleatoriamente 120 indivíduos/tanque e pesados em grupos de 30 para determinação do peso húmido. Após a pesagem estes foram armazenados a -20 °C para posterior determinação do peso seco. Para a análise da composição corporal, foram recolhidos 9 g de PL do stock inicial e armazenados a -20 °C. Além disso, 90 camarões foram selecionados aleatoriamente para análise de stress oxidativo, parâmetros imunitários e reservas energéticas e 10 camarões para análise de biologia molecular. Estes foram armazenados a -80 °C para as análises subsequentes. Os camarões amostrados para análise de biologia molecular foram armazenados submersos em RNAlater (Sigma) numa proporção de volume 1:10, a 4 °C durante 24 horas previamente a serem armazenados a -20 °C.

Após 21 dias de ensaio, as PL de cada tanque foram recolhidas e contabilizadas para calcular a taxa de sobrevivência por tanque. Os indivíduos contabilizados foram pesados em grupos de 30 (fig. 27). Para a análise da composição corporal, um total de 9 g de PL foram recolhidos aleatoriamente de cada tanque. Além disso, 1,5 g de PL foram selecionadas aleatoriamente de cada tanque para análise de stress oxidativo, parâmetros imunitários e reservas energéticas e 5 camarões para análise de biologia molecular. Estes foram armazenados seguindo os mesmos procedimentos descritos para a amostragem inicial.

A taxa de crescimento relativo (“Relative Growth Rate” - RGR) e a taxa de conversão alimentar (“Feed Conversion Ratio” - FCR) para cada tratamento foram avaliadas para a duração da experiência, enquanto a sobrevivência foi determinada no final da experiência.

A taxa de crescimento relativo (RGR, % peso seco dia⁻¹) foi calculada como: $RGR = (e^g - 1) \times 100$, onde $g = (\ln P_f - \ln P_i) \times t^{-1}$. P_f e P_i correspondem ao peso final e ao peso inicial, respetivamente. O rácio de conversão alimentar (FCR) foi calculado como: $FCR = (C_r / P_g)$, em que C_r corresponde ao consumo de ração (g) e P_g ao ganho médio de peso (g). A sobrevivência foi expressa como percentagem e calculada como: $S = (N_f / N_i) \times 100$, em que N_i e N_f correspondem ao número inicial e final de Pós-larvas nos tanques, respetivamente. As diferenças no desempenho de

crescimento e sobrevivência entre as dietas foram avaliadas utilizando ANOVA's One-way, seguidos de testes de comparação múltipla de Tukey. As diferenças de FCR entre tratamentos foram avaliadas utilizando uma ANOVA de Via Única, seguida de um teste de comparação Duncan. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD). Nos resultados expressos em percentagem, foi realizada uma transformação arcsina antes de qualquer teste estatístico: $T = \text{ASIN}(\text{SQRT}(\text{valor} / 100))$. O nível de significância considerado foi $P < 0,05$ para todos os testes realizados.



Figura 27 – Pós-larvas e pesagem.

5.3.4. Resultados

5.3.4.1. Crescimento

Os resultados finais demonstram que as PL alimentadas com a dieta D obtiveram um peso corporal final significativamente superior aos alimentados com a dieta B e as dietas comerciais E e F (fig. 28).

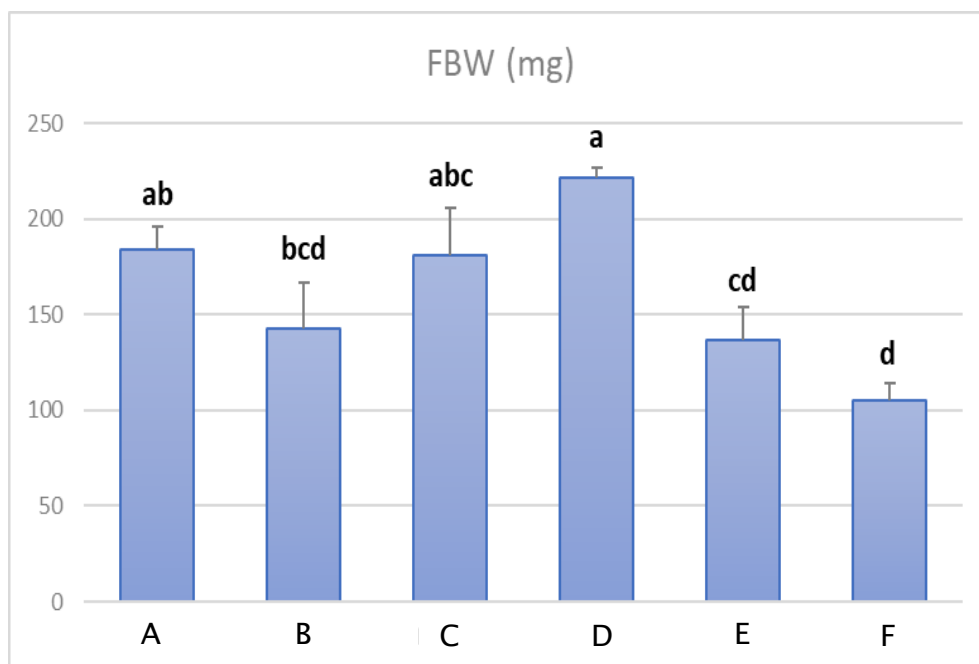


Figura 28 - Peso médio corporal húmido final (FBW) das Pós-larvas alimentados com as diferentes microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais). As diferentes letras subscritas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as dietas.

Os valores FCR de todas as dietas experimentais foram significativamente mais baixos do que os das dietas comerciais exceto a dieta B (Figura 29). Quanto ao RGR, a dieta D apresentou valores significativamente mais elevados do que as dietas B, E e F. Tanto a dieta A como a dieta C apresentaram valores de RGR significativamente mais elevados do que a dieta F (fig.30).

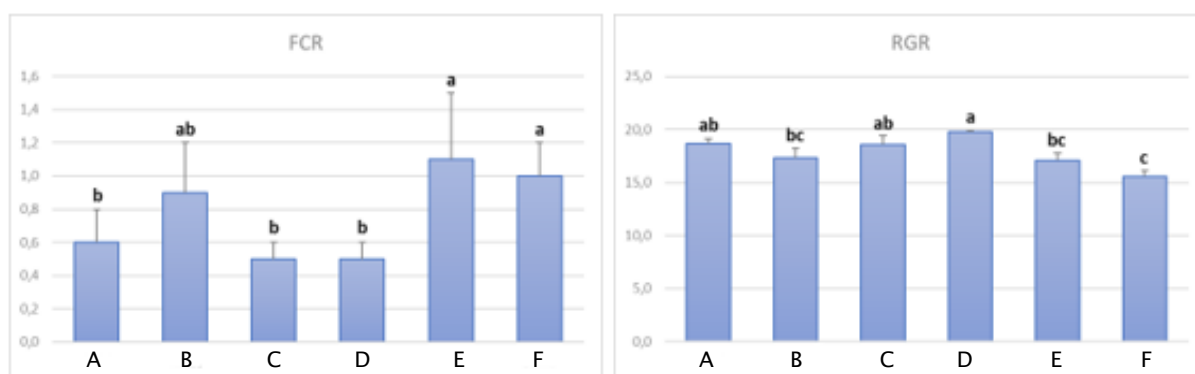


Figura 29 - Os valores da taxa de conversão alimentar (FCR) e da taxa de crescimento relativo (RGR) dos camarões Pós-larvas alimentados com as microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais). As diferentes letras subscritas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as dietas.

Quanto à sobrevivência, os valores foram elevados (entre 79 e 91 %), sem diferenças significativas entre os tratamentos observados (fig. 30).

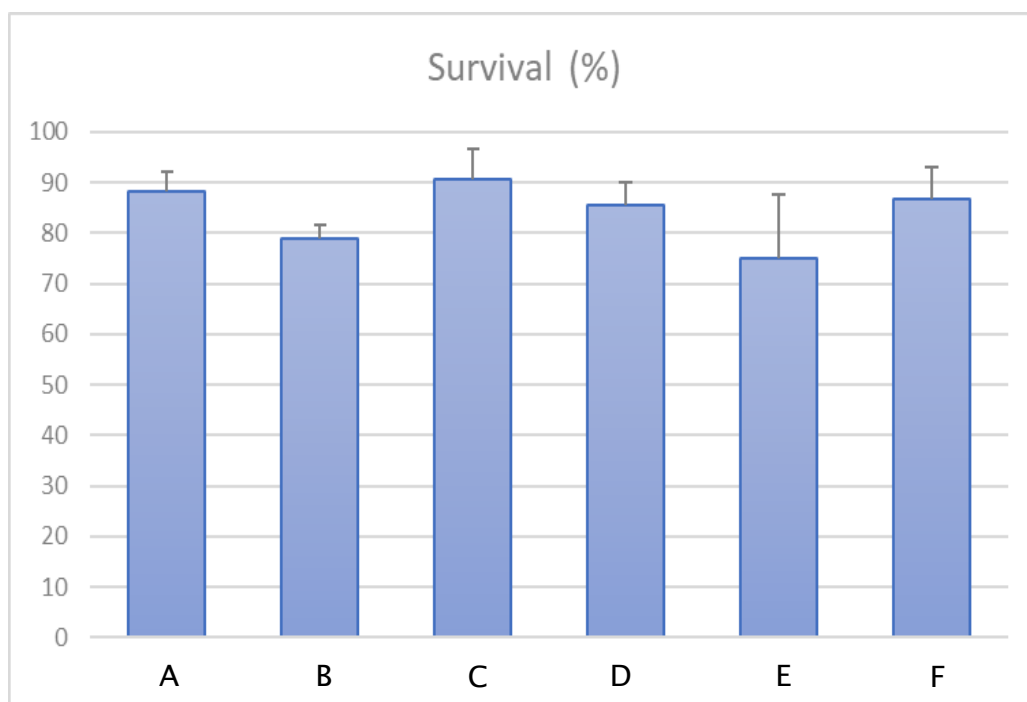


Figura 30 - A sobrevivência das Pós-larvas alimentadas com diferentes microdietas experimentais no final do período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ SD (n=3 unidades experimentais).

Os resultados relativos às reservas energéticas, stress oxidativo e à avaliação dos parâmetros imunitários ainda estão em curso e não há resultados disponíveis neste momento.

5.3.5. Discussão

Os resultados globais de crescimento e sobrevivência obtidos neste ensaio estão em linha com os obtidos em ensaios anteriores realizados no âmbito do projeto SHELLWIN.

Através dos resultados obtidos podemos afirmar que a ração D obteve os melhores resultados visto possuir o valor de FCR mais baixo e o valor de RGR e FBW mais altos, no entanto esta dieta não afeta significativamente a taxa de sobrevivência da PL em relação às restantes dietas testadas.

É de salientar que a análise do stress oxidativo e dos parâmetros imunitários podem contradizer ou comprometer estes resultados, caso se obtenham resultados negativos.

6. Bibliografia

BADIOLA, M. *et al.* - Energy use in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A review. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 81:2018) 57–70. doi: 10.1016/j.aquaeng.2018.03.003.

BADIOLA, M.; MENDIOLA, D.; BOSTOCK, J. - Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 51:2012) 26–35. doi: 10.1016/j.aquaeng.2012.07.004.

BARRINGTON, K. - Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In Integrated Mariculture: a Global review. SOTO, D., FAO, 2009. ISBN 2070-70 .

BLANCHETON, J. - Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. Em **Aquacultural Engineering**. [S.l.] : Elsevier, 1 Mai. 2000. doi: 10.1016/S0144-8609(00)00030-3

BONDAD-REANTASO, M. G. *et al.* - The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. **Journal of Invertebrate Pathology**. ISSN 00222011. 110:2 (2012) 158–165. doi: 10.1016/j.jip.2012.03.010.

BROWN, J. J. *et al.* - Halophytes for the treatment of saline aquaculture effluent. **Aquaculture**. ISSN 00448486. 175:3–4 (1999) 255–268. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00084-8.

BUHMANN, A. K. *et al.* - Optimization of culturing conditions and selection of species for the use of halophytes as biofilter for nutrient-rich saline water. **Agricultural Water Management**. ISSN 0378-3774. 149:2015) 102–114. doi: 10.1016/j.agwat.2014.11.001.

BUSCHMANN, A. H. *et al.* - Mariculture Waste Management. Em **Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set**. [S.l.] : Elsevier Inc., 2008. ISBN 9780080914565. p. 2211–2217.

CASTROVIEJO, S.; COELLO, P. - Datos cariológicos y taxonómicos sobre las

«Salicorniinae» A.J.Scott ibéricas. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**. ISSN 0211-1322. 37:1 (1980) 41-73.

DARIAS, M. J. *et al.* - Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**. ISSN 01758659. 26:2 (2010) 280-285. doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x.

DAVY, A. J.; BISHOP, G. F.; COSTA, C. S. B. - *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. woods, *S. ramosissima* J. woods, *S. europaea* L., *S. obscura* PW ball & tutin, *S. nitens* PW ball & tutin, *S. fragilis* PW ball & tutin and *S. dolichostachya* moss). **Journal of Ecology**. ISSN 1365-2745. 89:4 (2001) 681-707. doi: 10.1046/J.0022-0477.2001.00607.X.

DÍAZ, V. *et al.* - Kinetics of nitrogen compounds in a commercial marine Recirculating Aquaculture System. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 50:2012) 20-27. doi: 10.1016/j.aquaeng.2012.03.004.

FAN, P. *et al.* - Transcriptome Analysis of *Salicornia europaea* under Saline Conditions Revealed the Adaptive Primary Metabolic Pathways as Early Events to Facilitate Salt Adaptation. **PLoS ONE** 8(11): e80595 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0080595.

FAO - **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Rome : FAO, 2020 Disponível em WWW:<URL:<https://doi.org/10.4060/ca9229en>>. ISBN 9789251326923.

FU, L. L.; CHEN, X.; WANG, Y. - Quality evaluation of farmed whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, treated with different slaughter processing by infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. ISSN 18737072. 151: (2014) 306-310. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.012.

GLENN, E. *et al.* - Water requirements for cultivating *Salicornia bigelovii* Torr . with seawater on sand in a coastal desert environment. **Journal of Arid Environments**. 36:4 (1997) 711-730 ISSN 0140-1963. doi: 10.1006/JARE.1997.0253.

HUGHES, A. D.; BLACK, K. D. - Going beyond the search for solutions : understanding trade-offs in European integrated multi-trophic aquaculture development. **Aquaculture Environment Interactions**. 8: (2016) 191 - 199. doi:

10.3354/aei00174.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - Estatísticas da Pesca : 2020. Lisboa : INE, 2021. Disponível na www: <url:https://www.ine.pt/xurl/pub/280980980>. ISSN 0377-225-X. ISBN 978-989-25-0566-4 KANNAN, D.; THIRUNAVUKKARASU, P. - Procedure for Maturation and Spawning of Imported shrimp *Litopenaeus vannamei* in Commercial Hatchery, South East Coast of India. **Fisheries and Aquaculture Journal**. 06:04 (2015). doi: 10.4172/2150-3508.1000146.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. - The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. **Aquaculture**. ISSN 00448486. 181:3-4 (2000) 397-403. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00233-1.

LOPES, S.; LEMOS, M. F. L. - Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors ' major challenges? - a review. **Review. Aquaculture**. 8:3 (2016) 283-300. doi: 10.1111/raq.12093.

MARTINS, C. I. M. *et al.* - New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 43:3 (2010) 83-93. doi: 10.1016/j.aquaeng.2010.09.002.

MIRZOYAN, N.; TAL, Y.; GROSS, A. - Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems: Review. **Aquaculture**. ISSN 00448486. 306:1-4 (2010) 1-6. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.028.

MIYAMOTO, S. *et al.* - Growth , water use and salt uptake of four halophytes irrigated with highly saline water. **Journal of Arid Environments**. 32:2 (1996) 141-159. doi: 10.1006/JARE.1996.0013.

PIEDRAHITA, R. H. - Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. **Aquaculture**. ISSN : 0044-8486. 226:1-4 (2003) 35-44. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00465-4

RAY, A. J.; LOTZ, J. M. - Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems. **Aquaculture Research**. ISSN 1365-2109. 48:8 (2017) 4390-4398. doi: 10.1111/ARE.13262.

RIJN, J. V. - Waste treatment in recirculating aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 53: (2013) 49–56. doi: 10.1016/j.aquaeng.2012.11.010.

ROZEMA, J.; SCHAT, H. - Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. **Environmental and Experimental Botany**. ISSN 00988472. 92:2013) 83–95. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.08.004.

RUAN, C. *et al.* - Halophyte Improvement for a Salinized World. **Critical Reviews in Plant Sciences**. ISSN 1549-7836. 29:6 (2010) 329–359. doi: 10.1080/07352689.2010.524517.

RUBIO-CASAL, A. E. *et al.* - Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. **Journal of Arid Environments**. ISSN 01401963. 53:2 (2003) 145–154. doi: 10.1006/jare.2002.1042.

SCHNEIDER, O. *et al.* - Welfare interventions in flatfish recirculation aquaculture systems and their economical implications. **Aquaculture Economics and Management**. ISSN 13657305. 16:4 (2012) 399–413. doi: 10.1080/13657305.2012.729252.

SHARMA, A. *et al.* - Accumulation of heavy metals and its biochemical responses in *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte. **Marine Biology Research**. ISSN 17451000. 6:5 (2010) 511–518. doi: 10.1080/17451000903434064.

SHARRER, M. J. *et al.* - Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 33:2 (2005) 135–149. doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.12.001.

SINGH, D. *et al.* - *Salicornia* as a crop plant in temperate regions: Selection of genetically characterized ecotypes and optimization of their cultivation conditions. **AoB PLANTS**. ISSN 20412851. 6: (2014). doi: 10.1093/aobpla/plu071.

SKJØLSTRUP, J. *et al.* - Performance characteristics of fluidised bed biofilters in a novel laboratory-scale recirculation system for rainbow trout: nitrification rates, oxygen consumption and sludge collection. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 18:4 (1998) 265–276. doi: 10.1016/S0144-8609(98)00037-5.

SUMMERFELT, S. T. *et al.* - Dissolved ozone destruction using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 32:1 (2004) 209–223. doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.06.004.

SWINGLE, R. S.; GLENN, E. P.; SQUIRES, V. - Growth performance of lambs fed mixed diets containing halophyte ingredients. **Animal Feed Science and Technology**. ISSN 0377-8401. 63:1-4 (1996) 137–148. doi: 10.1016/S0377-8401(96)01018-8.

THOMSEN, M. H. - **The AQUACOMBINE Project**, atual. 2020. [Consult. 26 jul. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.aquacombine.eu/>>.

TWAROWSKA, J. G.; WESTERMAN, Philip W.; LOSORDO, Thomas M. - Water treatment and waste characterization evaluation of an intensive recirculating fish production system. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 16:3 (1997) 133–147. doi: 10.1016/S0144-8609(96)01022-9.

UAWISETWATHANA, U. *et al.* - Insights into Eyestalk Ablation Mechanism to Induce Ovarian Maturation in the Black Tiger Shrimp. **PLOS ONE**. ISSN 1932-6203. 6:9 (2011) e24427. doi: 10.1371/journal.pone.0024427.

VENTURA, Y. *et al.* - Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. **Scientia Horticulturae**. ISSN 03044238. 128:3 (2011) 189–196. doi: 10.1016/j.scienta.2011.02.001.

VENTURA, Y. *et al.* - The development of halophyte-based agriculture: Past and present. **Annals of Botany**. ISSN 10958290. 115:3 (2015) 529–540. doi: 10.1093/aob/mcu173.

VENTURA, Y.; SAGI, Moshe - Halophyte crop cultivation: The case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. **Environmental and Experimental Botany**. ISSN 0098-8472. 92:2013) 144–153. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.07.010.

YUN, H. *et al.* - Effects of bioflocs on dietary protein requirement in juvenile whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**. ISSN 1365-2109. 47:10 (2016) 3203–3214. doi: 10.1111/ARE.12772.

ZHANG, S. *et al.* - An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for

land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. **Aquacultural Engineering**. ISSN 01448609. 45:3 (2011) 93–102. doi: 10.1016/j.aquaeng.2011.08.001.

ZHOU, Y. G.; DAVIS, D. A.; BUENTELLO, A. - Use of new soybean varieties in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**. ISSN 1365-2095. 21:5 (2015) 635–643. doi: 10.1111/ANU.12181.

ZHU, S. *et al.* - Evaluation of UV Disinfection Performance in Recirculating Systems. **International Journal of Recirculating Aquaculture**. ISSN 1547-917X. 3:0 (2002). doi: 10.21061/ijra.v3i1.1458.

7. Anexos

7.1. Protocolo de Limpeza do Filtro da Bomba de Calor

1. Desligue a bomba de calor (no quadro elétrico e na bomba);
2. Feche as válvulas vermelhas (na parte exterior);
3. Abra o painel da bomba de calor;
4. Rode a válvula vermelha sob o manómetro (círculo **vermelho**);
5. Rode o filtro para a esquerda para desaparafusar (círculo **listrado verde**);
6. Limpe o filtro com água;
7. Aparafusar o filtro no lugar;
8. Abra as duas válvulas vermelhas;
9. Ligue a bomba de calor;



Figura 1 - Bomba de calor na parte externa da empresa

Protocol to Clean the Heat Bomb Filter

1. Turn off the heat bomb (in the switchboard and in the bomb);
2. Close the red valves (on the exterior side);
3. Open the heat bomb panel;
4. Turn the red valve under the manometer (red circle);
5. Turn the filter to the left to unscrew (green striped circle);
6. Clean the filter with water;
7. Screw the filter in place;
8. Open the two valves;
9. Turn the heat bomb on;



Figure 1 – Heat bomb on the external part of the company

7.2. Protocolo para Substituição do Filtro Mecânico



Closed



Opened

1. Feche as válvulas de entrada e de saída, contendo os mesmos símbolos (fig.1 - **círculo**), cada símbolo significa um filtro diferente (* ou Δ);
1. Abra a valvula de esgoto (fig.1 - **círculo azul cortado**);
2. As válvulas devem estar na posição da fig. 1 - B;
3. Desaperte o parafuso branco da tampa para aliviar a pressão (fig. 2 - **seta pequena**);

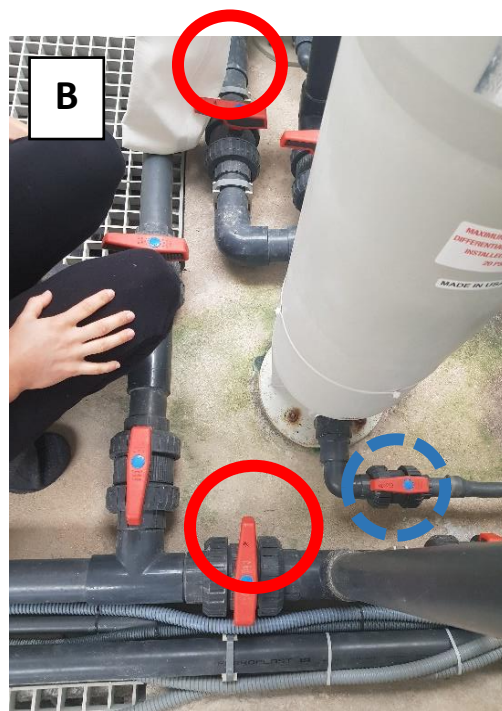


Figure 1 - A - Válvulas do filtro mecânico abertas (válvulas de entrada e saída / círculo recortado - válvula de esgoto fechada) / B - Válvulas do filtro mecânico (fechadas) e válvula de esgoto (aberta) durante o procedimento.

4. Remova a tampa (fig 2. - **seta grande**), e o suporte, (fig. 2 - B);
5. Depois da água ter sido drenada, remova o filtro de manga (fig. 3);
6. Fechar a válvula de esgoto (fig.1 - **círculo recortado**);

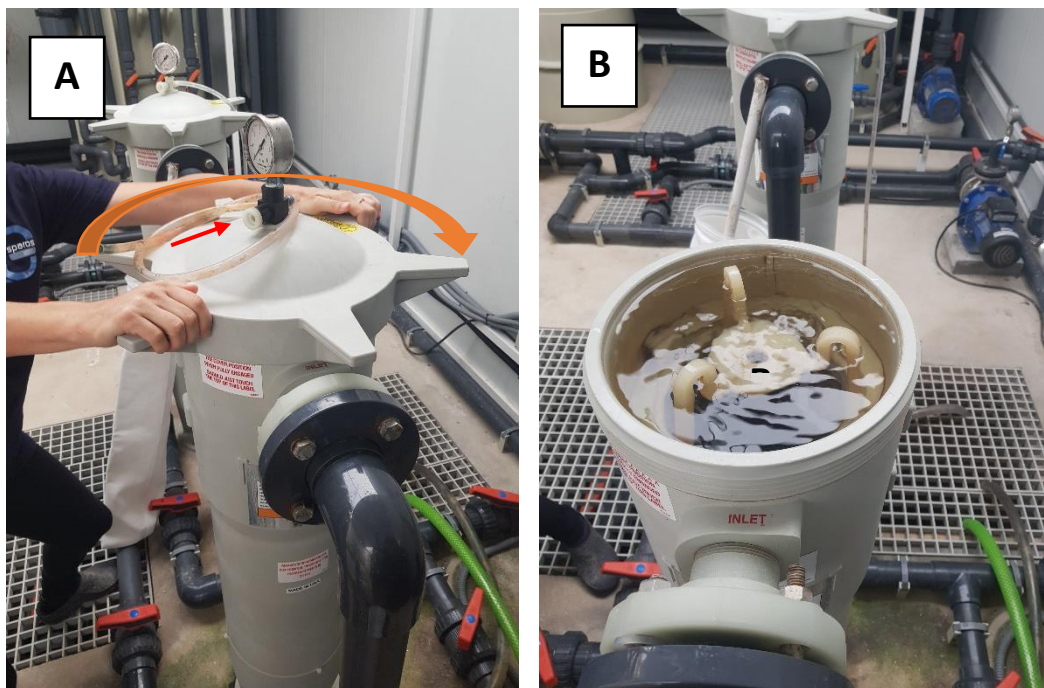


Figure 2 - Abertura do filtro mecânico (seta pequena - válvula de pressão / seta grande - movimento de abertura) B – Suporte do filtro.

7. Insira o novo filtro e o suporte (fig. 3);
8. Encha metade do filtro abrindo a válvula de entrada (fig. 4);
9. Insira a tampa e encha o restante. Atenção, a válvula branca deve permanecer aberta até sair todo o ar;



Figura 3 - Manga do filtro mecânico utilizada e limpa.

10. Feche a válvula branca, abra a válvula de entrada e de saída, como na fig. 1 (existem marcas para a posição correta da válvula) (fig.4 - B);

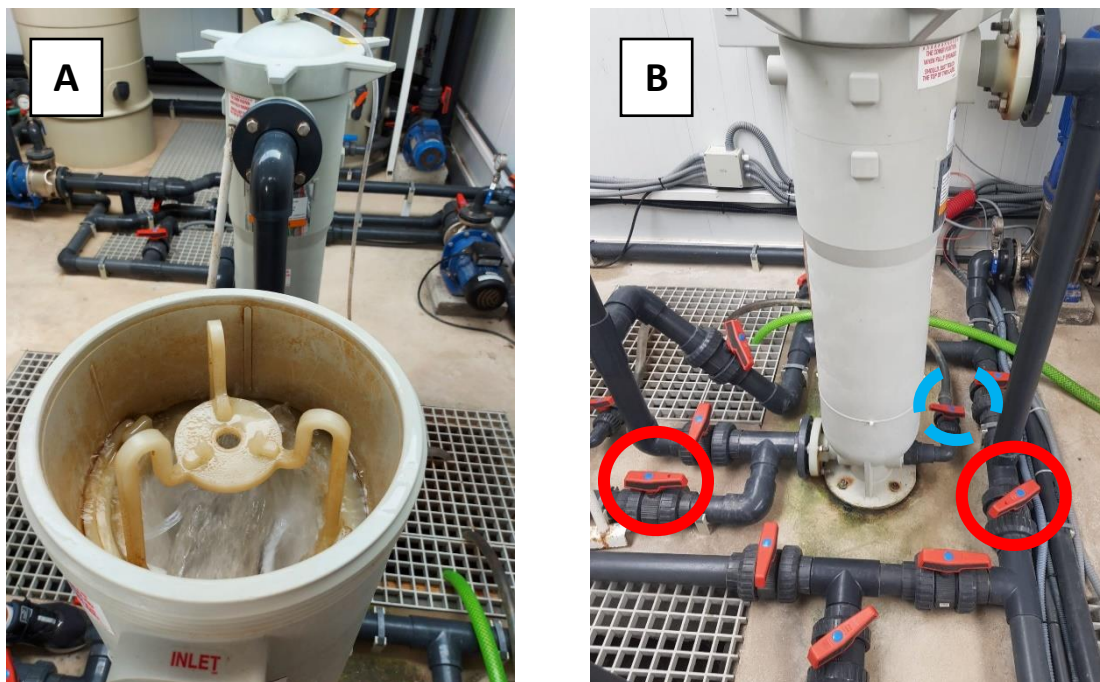


Figura 4. A- Entrada de água no filtro mecânico, B - posição final das válvulas.

Protocol for Mechanical Filter Replacement



Closed



Opened

1. Close the inlet and outlet valves, containing the same symbols (fig.1 - **circle**), each symbol stands for a different filter (* or Δ);
2. Open the sewer valve ("Esgoto") (fig.1 - **stripped circle**);
3. Valves must be as fig. 1 - B;
4. Unscrew the white screw to relieve the pressure (fig. 2 - **small arrow**);



Figure 1 – A – Mechanical filter valves opened (circle – inlet and outlet valves / stripped circle – sewer valve closed opened) / B – Mechanical filter valves(closed) and sewer valve (opened) during the procedure.

5. Remove the cover (fig 2. - **big arrow**), and the filter holder, if any (fig. 2 - B);
6. After the water is fully drained, remove the used sleeve (fig. 3);
7. Close the sewer valve (fig.1 - **stripped circle**);



Figure 2 - Mechanic filter opening (arrow - pressure valve / big arrow - opening movement) B – Filter holder.

8. Insert the new filter sleeve and place the holder (fig. 3);
9. Fill half the filter by opening the inlet valve (fig. 4);
10. Insert the cover and open the inlet valve. Be aware, the pressure valve must be opened to remove any air left in the filter;



Figure 3 - Mechanical filter used and cleaned sleeves.

11. Close the pressure valve and open the inlet and outlet valves as in 1 (there are marks in the valves for the correct positioning) (fig.4 - B);

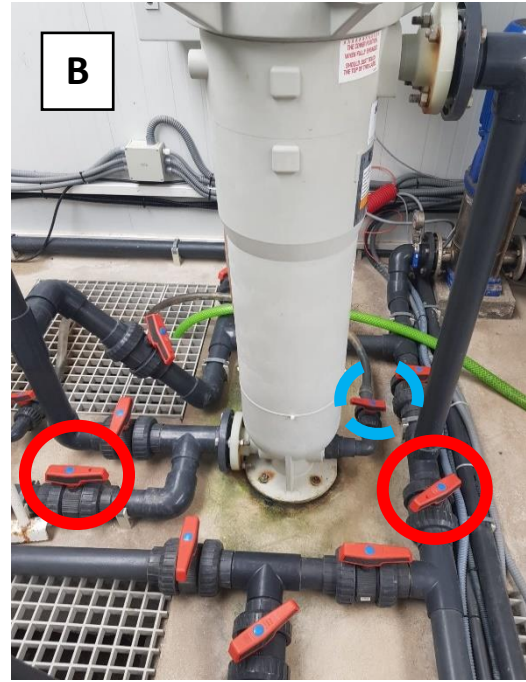


Figure 4. A- Filling the mechanic filter, B - final valves position.

7.3. Protocolo da Sonda Multi-paramétrica

Registrar parâmetros com a sonda:

1. Remova as tampas das sondas (esteja ciente, a tampa do pH contém líquido para manter a humidade. Se necessário, coloque algumas gotas de solução tampão pH 7.01);
2. Insira a tampa de proteção para não danificar as sondas;
3. Clique no botão vermelho para ligar;
4. Selecione "Measurement";
5. Clique no número 6 para ver todos os parâmetros;
6. Mergulhe a sonda na água e aguarde alguns minutos até que os parâmetros estabilizem;
7. Selecione:
 1. "Inserir";
 2. "Uma amostra no registo";
 3. "Não";
8. Lave a sonda, retire a tampa de proteção e coloque as respetivas tampas nas sondas;

Consulte os parâmetros guardados:

1. "Registo";
2. "Voltar ao registo";
3. "Lote";
4. Escolha o lote que deseja consultar;
5. "Ver";
6. "Informação";
7. "Saltar";
8. Escolha o último número;



Figura 1 - Sonda Multi-paramétrica

Protocol for Parameters

Take and record parameters with the probe:

1. Remove the covers from the probes (be aware, the pH cover contains liquid to maintain humidity. If needed put a few drops of pH 7.01 buffer solution);
2. Insert the protective cover in order not to damage the probes;
3. Click on the red button to turn it on;
4. Select “Medição”;
5. Click on the number 6 to see all parameters;
6. Submerge the multi-probe in the water and wait a few minutes until the parameters stabilize;
7. Select:
 - a) “Registro”;
 - b) “Uma amostra no medidor”;
 - c) “Não”;
8. Wash the multi-probe, remove the protective cover and place the respective covers in the probes;

See saved parameters:

1. “Registro”;
2. “Voltar ao registro”;
3. “Lote”;
4. Choose the lote you desire to consult;
5. “Ver”;
6. “Info”;
7. “Saltar”;
8. Choose the last number;



Figura 1 - Multi-probe

7.4. Protocolo para Calibração da Sonda Redox

1. O visor deve apresentar um sinal de aviso na opção ORP ("⚠") (fig.1)
2. Primeiro, verifique se é necessária uma calibração:
 - a. Menu
 - b. Diagnósticos
 - c. pH203440201
 - d. CAL NECESSÁRIO
3. Volte ao menu e selecione:
 - a. CONFIGURAÇÃO DO SENSOR
 - b. pH203440201
 - c. Calibrar
 - d. Manual de 1 ponto
 - e. Ativo
4. Coloque o sensor, situado na chávena do skimmer, na solução padrão ph 7.01;
5. Pressione entrar para terminar.



Figura 1 - Sinal de aviso na opção ORP

Protocolo for Redox Probe Calibration

1. The display must show a warning signal in the ORP option (“⚠”) (fig.1)
2. First verify if a calibration is needed:
 - a. Menu
 - b. Diagnostics
 - c. pH203440201
 - d. **CAL REQUIRED**
3. Go back to the menu and select:
 - a. SENSOR SETUP
 - b. pH203440201
 - c. Calibrate
 - d. 1 point manual
 - e. Active
4. Put the sensor, located in the cup of the skimmer, into the standard ph 7.01 solution;
5. Press enter to finish.



Figure 1 - warning signal in the ORP option

7.5. Protocolo de Limpeza do Filtro de Areia



Closed



Opened

1. Abra a V2 e feche a V1;
2. Desligue a bomba;
3. Rode a válvula de filtro para **BLACKWASH**;
4. Ligue a bomba (aguarde cerca de 5 min, dependendo da sujidade);
5. Desligue a bomba;
6. Rode a válvula de filtro (VF) para **ENXAGUAR**;
7. Ligue a bomba (aguarde 1 min);
8. Desligue a bomba;
9. Rode a válvula de filtro para **filtração**;
10. Abra a V1 e feche o V2;
11. Ligue a bomba;

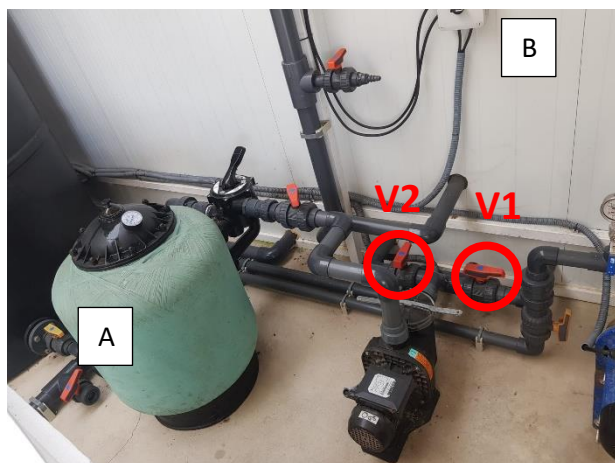


Figura 1 – A - Filtro de areia; B - Switch, V2 - Fechado, V1 - Aberto



Figura 2 - Válvula de filtro

Protocol for Sand Filter Cleaning



Closed



Opened

1. Open V2 and close V1;
2. Switch off the pump;
3. Turn the Filter Valve to **BLACKWASH**;
4. Switch on the pump (wait for about 5min, depending on the dirt);
5. Switch off the pump;
6. Turn the Filter Valve (VF) to **RINSE**;
7. Switch on the pump (wait for 1min);
8. Switch off the pump;
9. Turn the Filter Valve to **FILTRATION**;
10. Open V1 and close V2;
11. Switch on the pump;

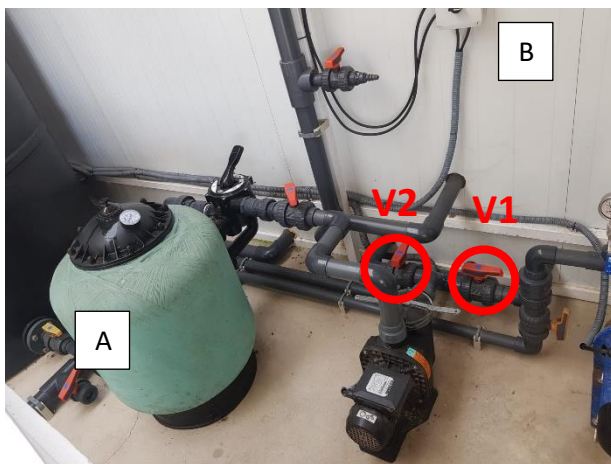


Figure 1 – A - Sand filter; B – Switch, V2 – Closed, V1 - Opened

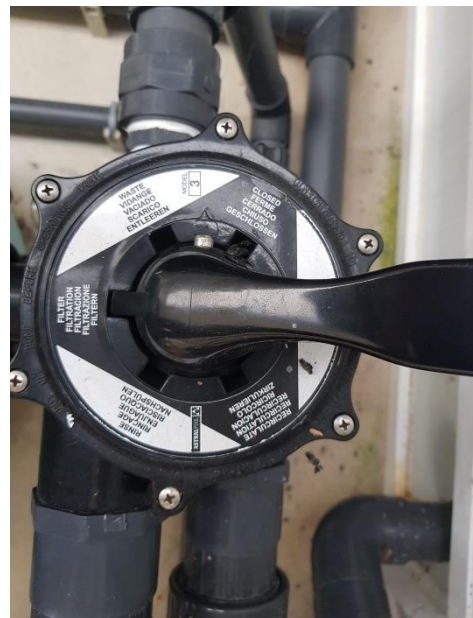


Figure 2 - Filter Valve

7.6. Protocolo para Trocas de Água



Closed



Opened

1. Abra as válvulas de esgoto dos dois skimmers (fig.1 - **círculo**);



Figura 1 - Skimmers, e respectivas válvulas de esgoto;

2. No sistema SCADA, aguarde que o nível em "Depósito água suja" atinja 1,25 (fig. 2 - A - **círculo**);
3. Feche as válvulas de esgoto dos dois skimmers (igual ao ponto 1);
4. Abra as válvulas de entrada (fig.2 - B - **círculos listrados**) para encher os tanques de água limpa (aguarde até que o sensor SCADA atinja 1.60)

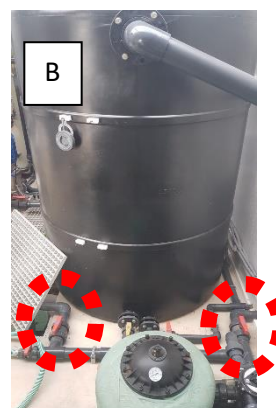
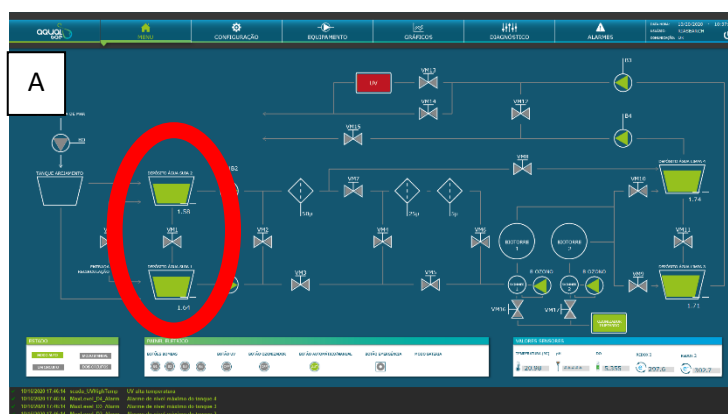
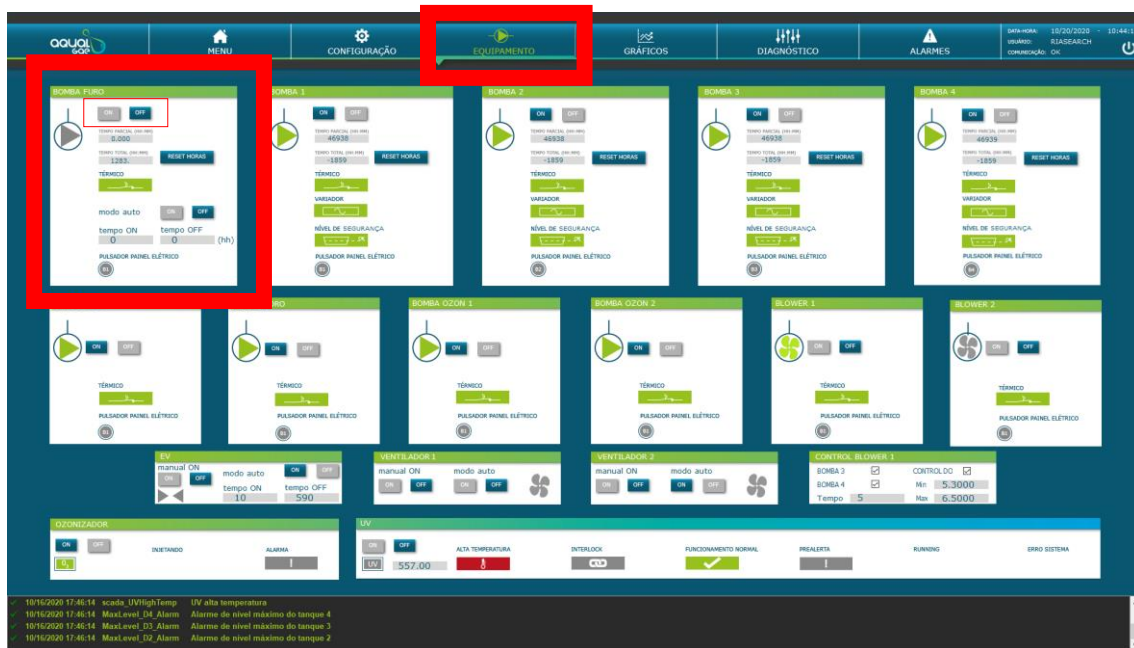


Figura 2 - Sistema SCADA, válvulas de água de entrada (aberto)

- (fig. 2 - A - **círculo**);
5. Feche as válvulas de entrada (as mesmas que o passo 4);

6. No sistema SCADA clique em "equipamento" e em seguida "bomba furo" (fig. 3 - **quadrados**).
7. Verifique os depósitos azuis fora da zona técnica, a água deve estar a passar entre os dois depósitos pelo tubo exterior;
8. Depois de os tanques azuis estarem prontos, pressione o botão na "bomba furo".



Sinal 3SCADA, opção "equipamento"

Nota: Aguarde pelo menos duas horas para fazer outra mudança de água (certifique-se de que o filtro de areia e a bomba de hidro estão ligados durante essas horas.)

Protocol for Water Changes



Closed



Opened

1. Open the sewer valves of the two skimmers (fig.1 - **circle**);



Figure 4 - Skimmers, and respective sewer valves;

2. In the SCADA system, wait for the level in “Depósito água suja” to reach 1.25 (fig. 2 - A - **circle**);
3. Close the sewer valves of the two skimmers (same as the step1);
4. Open the inlet valves (fig.2 - B - **striped circles**) to fill the clean water tanks (wait until the SCADA sensor reaches 1.60) (fig. 2 - A - **circle**);

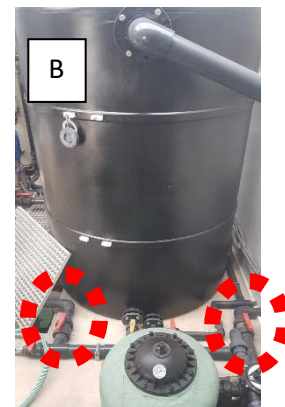
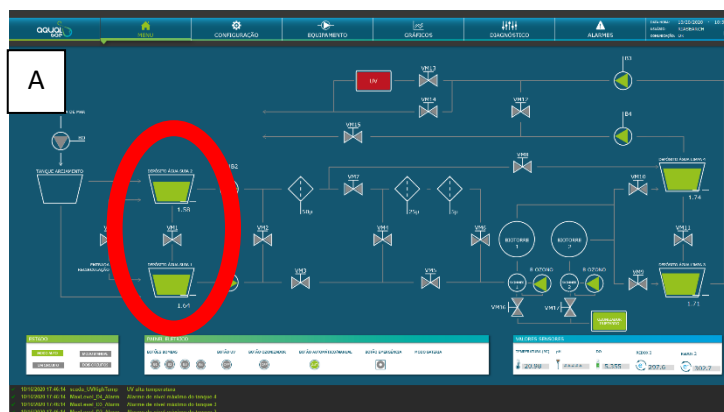


Figure 5 - SCADA system, inlet water valves (opened)

5. Close the inlet valves (same as step 4);
6. In the SCADA system go to “equipamento” and at “bomba furo” press on (fig. 3 - **squares**).

7. Check the blue deposits outside the technical zone, the water must be passing between the two deposits by the outside tube (fig)
8. After the blue tanks are done press the of button at the “bomba furo”.

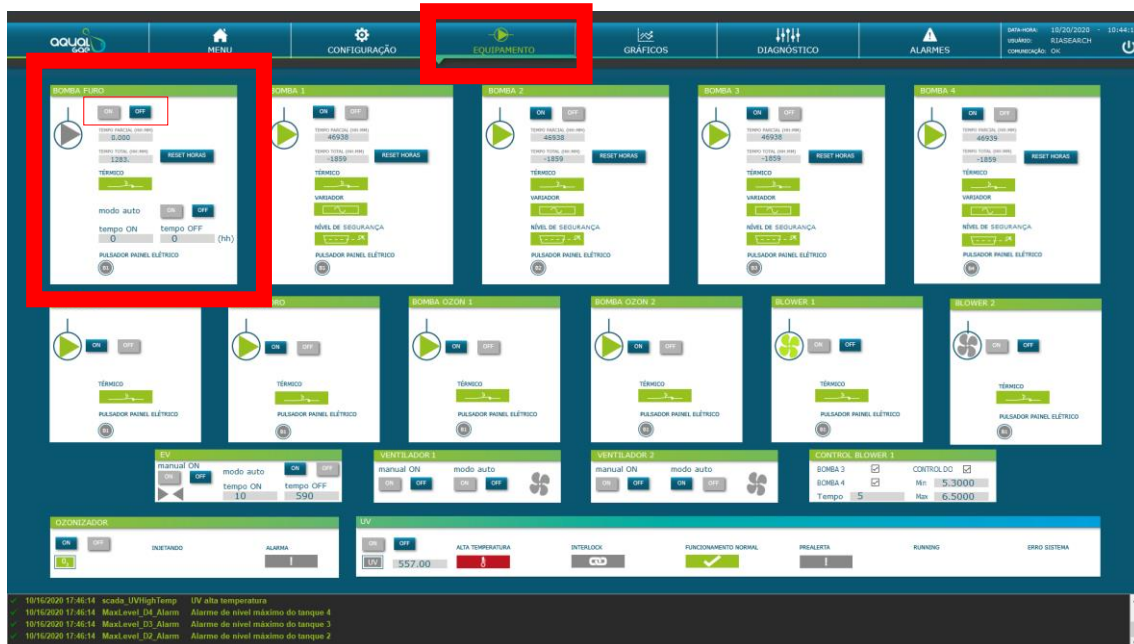


Figure 6 - SCADA system, option "equipamento"

Note: Wait at least two hours to make another water change (make sure the sand filter and the hidro bomb are on during those hours.)

7.7. Protocolo de Limpeza dos Permutadores

1. Desligue a bomba de calor;
2. Feche as 4 válvulas do permutador (fig. 1 - A)



Figura 1 - A -Válvulas de permutador abertas; B - Distância entre as placas azuis;

3. Meça a distância entre as placas (fig. 1 - B) e retire os 6 parafusos;
4. Retire a primeira placa azul (esteja ciente da posição);
5. Prenda as placas interiores com um fio para manter a ordem correta (fig. 2 - círculo **vermelho**);
6. Limpe as placas interiores, esfregue se necessário;
7. Volte a colocar as placas e retire o fio;
8. Coloque a placa azul no lugar e aperte os parafusos à distância original medida em 3;
9. Abra as 4 válvulas do permutador (fig. 1 - A) (se alguma placa estiver deslocada haverá fugas);
10. Ligue a bomba de calor;



Figura 2 - Duração e limpeza de placas interiores

Protocol For Cleaning the Heaters

1. Turn off the heat pump;
2. Close the 4 valves of the exchanger (fig. 1 - A)

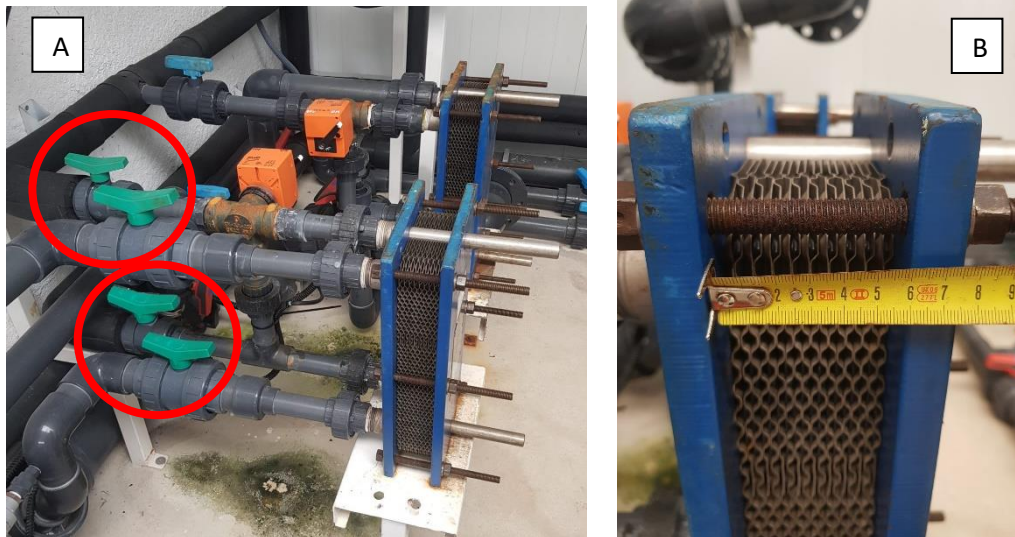


Figure 1 - A -Exchanger valves opened; B - Distance between the blue plates;

3. Measure the distance between the plates (fig. 1 - B) and remove the 6 screws;
4. Remove the first blue plate (be aware of the position);
5. Secure the inner plates with a wire to maintain the correct order (fig. 2 - red circle);
6. Clean the inner plates, scrub if needed;
7. Put back the plates and remove the wire;
8. Put the blue plate in place and tighten the screws to the original distance measured in 3;
9. Open the 4 valves of the exchanger (fig. 1 - A) (if any plate is misplaced there will be leaks);
10. Turn on the heat pump;



Figure 2 - Inner plates dirty and clean

7.8. Protocolo de Rega

Rega com água doce

1. Abra as válvulas dos tanques de água doce (fig. 1 - A) e a torneira de água doce (fig. 1 - B);

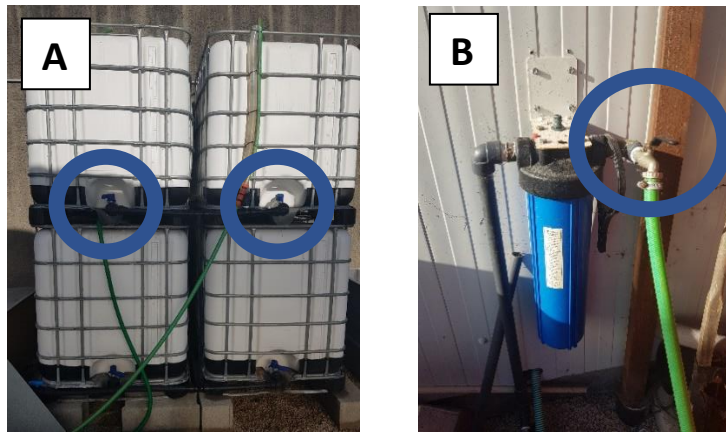


Figure 1 - A - Válvulas dos reservatórios de água doce (circles); B - torneira

Rega com água salgada

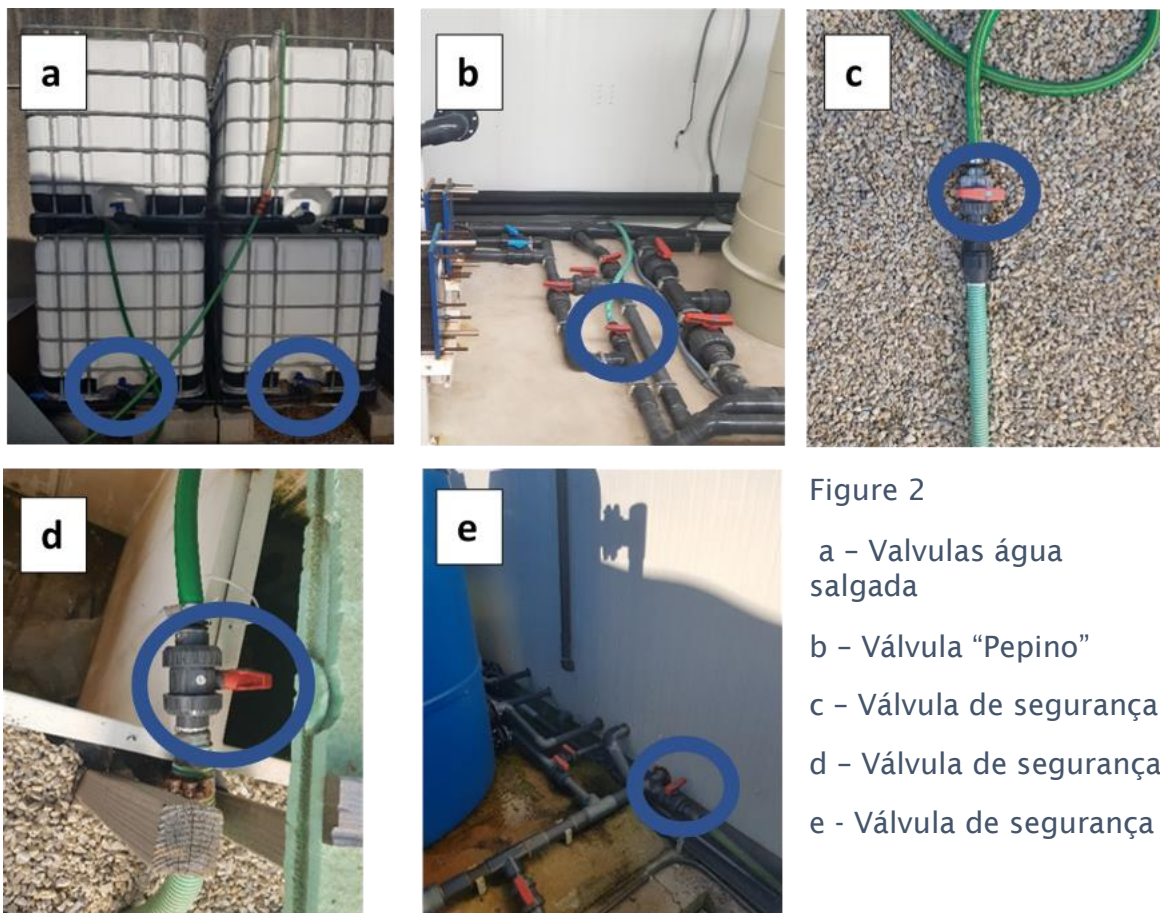


Figure 2

a - Válvulas água salgada

b - Válvula “Pepino”

c - Válvula de segurança

d - Válvula de segurança

e - Válvula de segurança

1. Abra as válvulas dos reservatórios de água salgada (fig. 2 - a) ; Abra a válvula “pepino” (fig. 2 - b) e a válvula de segurança no final da mangueira (fig. 2 - c); Abra a 2ª válvula de segurança (fig. 2 -d) próxima aos tanques azuis e a válvula de segurança no final da mangueira (fig. 2 - e)

Sistema de Irrigação

1. Na estufa, abra o quadro elétrico junto aos tubos (fig 3). Escolha o botão correspondente à leira que pretende regar.

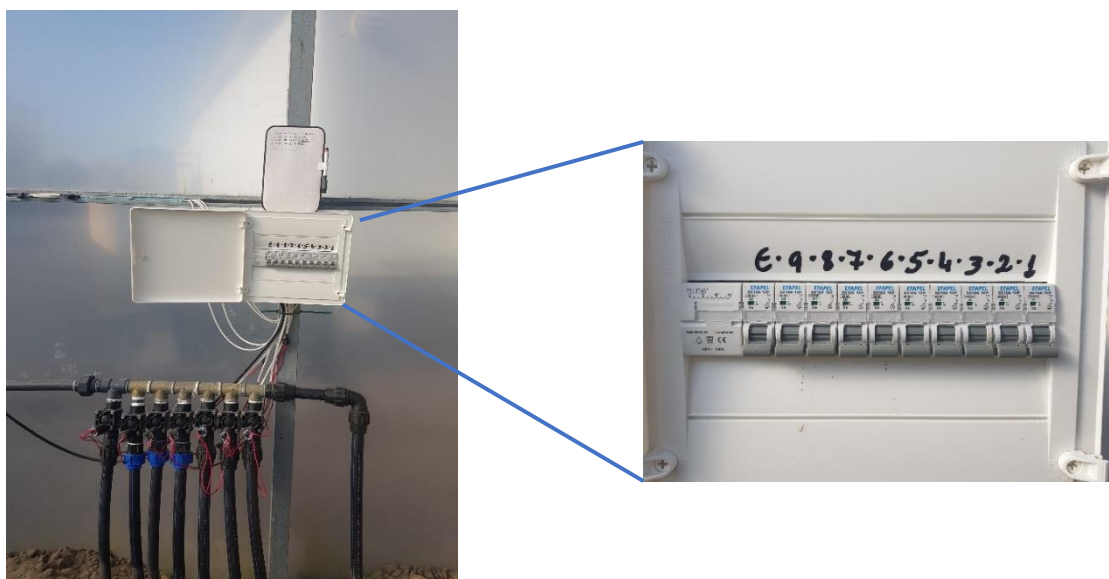


Figure 3 – Sistema de irrigação na estufa

Protocol for Irrigation

Freshwater Irrigation

2. Open the freshwater tank valves (fig. 1 - A) and the water tap (fig. 1 - B);

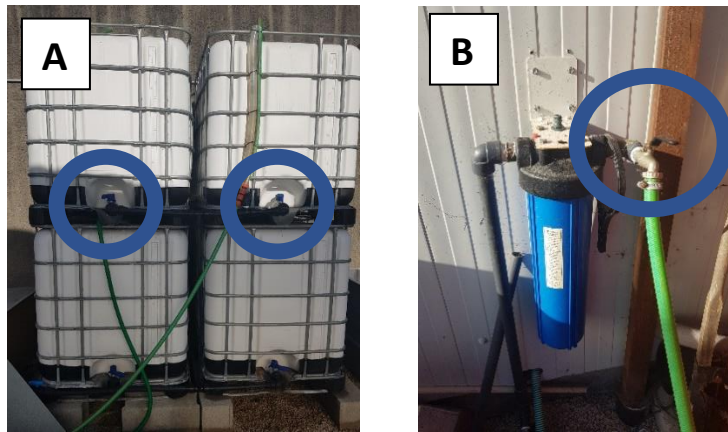


Figure 4 - A - freshwater tank valves (circles); B - water tap

Saltwater Irrigation

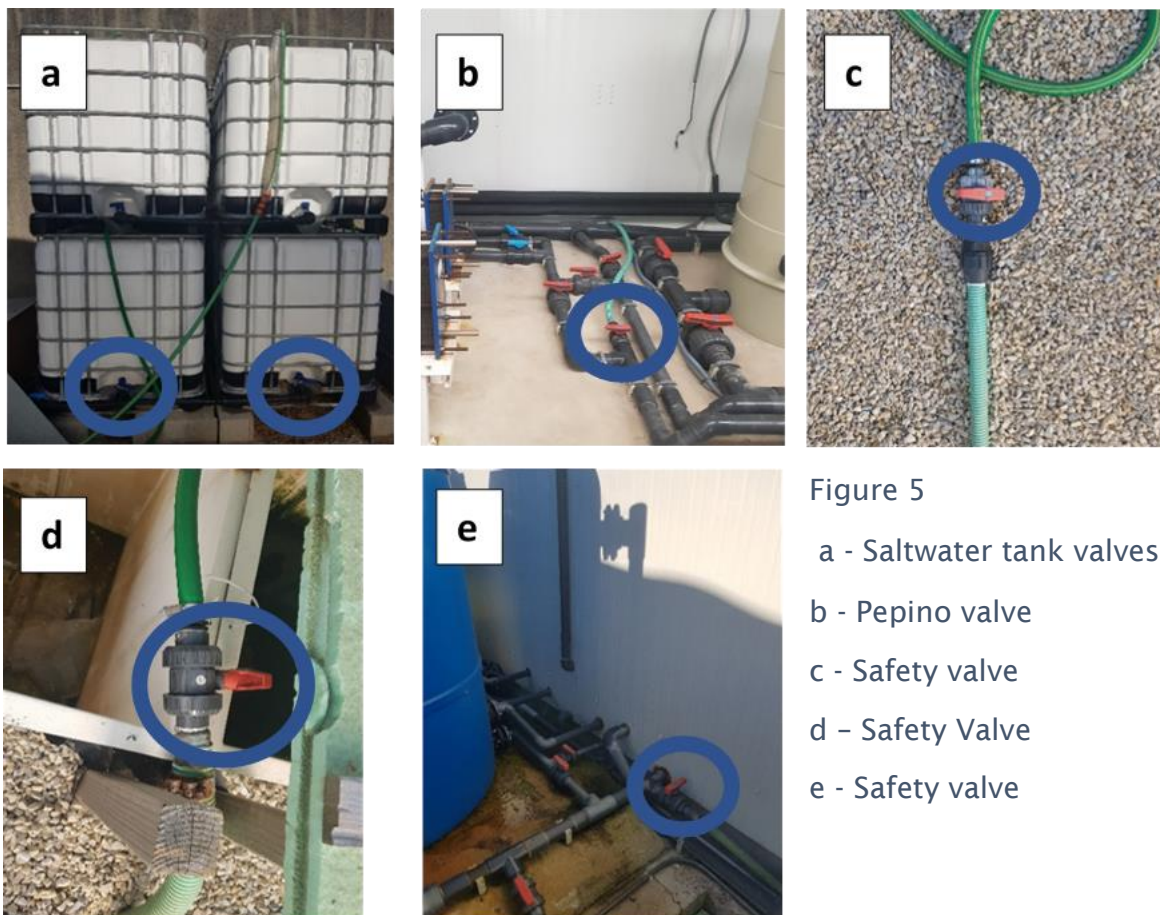


Figure 5

a - Saltwater tank valves

b - Pepino valve

c - Safety valve

d - Safety Valve

e - Safety valve

2. Open the saltwater tank valves (fig. 2 - a) ;Open the pepino valve (fig. 2 - b) and the safety valve in the end of the hose (fig. 2 - c); Open the safety valve (fig. 2 -d) near the blue tanks and the safety valve in the end of the hose (fig. 2 - e)

Irrigation System

2. In greenhouse, open the lid over the pipes (fig 3). Select the button button that corresponds to the irrigation system required.

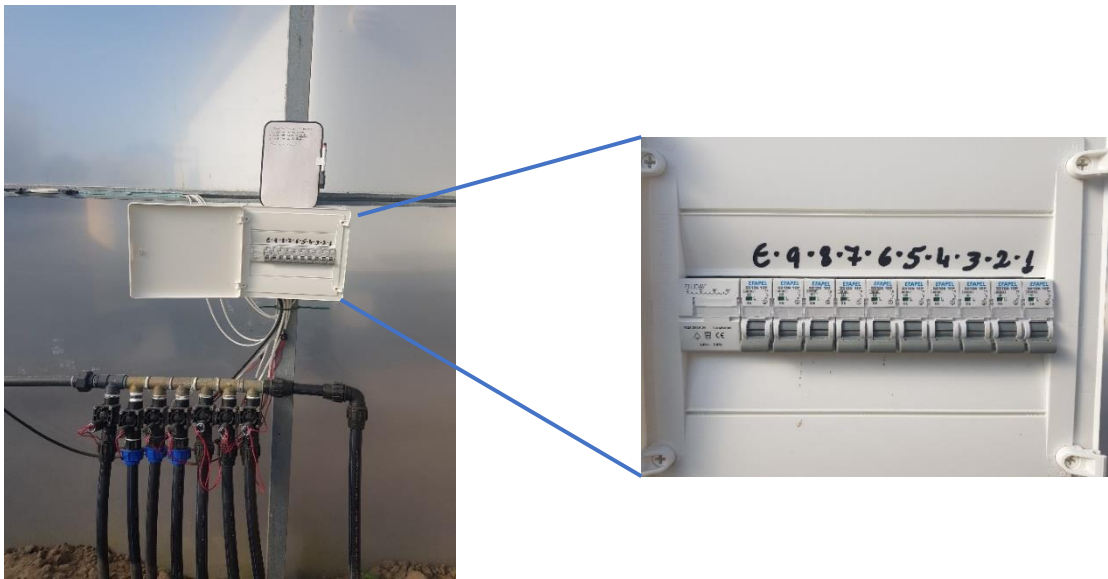


Figure 6 - Irrigation system in the greenhouse