

**“Estudos do cultivo de algas vermelhas e castanhas
em laboratório para aplicação em sistemas de
Aquacultura Integrada Multitrófica”**

Bruna Lopes da Silva

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos,
Especialização em Ecologia Marinha

Bruna Lopes da Silva

“Estudos do cultivo de algas vermelhas e castanhas em laboratório para aplicação em sistemas de Aquacultura Integrada Multitrófica”

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.

Orientadora – Doutora Isabel Sousa Pinto

Categoria – Professora Auxiliar do Departamento de Botânica

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Co-orientador – Doutor Rui Pereira

Categoria – Investigador de Pós-Doutoramento

Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

AGRADECIMENTOS

Pela possibilidade de estágio agradeço ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), em particular ao Laboratório de Biodiversidade Costeira (LBC) e pela orientação à Doutora Isabel Sousa Pinto e co-orientação ao Doutor Rui Pereira.

Além disso, quero expressar o meu agradecimento a todo o pessoal do CIIMAR por facilitarem a minha integração e pela sua inteira disponibilidade, em particular ao pessoal do LBC, à Dr.^a Helena Abreu, à Dr.^a Raquel Vieira, ao Doutor Marcos Rubal, ao Doutor Francisco Arenas, à Dr.^a Rita Araújo e a duas colegas de outros laboratórios a Dr.^a Maria Inês Páscoa e a Dr.^a Agnès Marhadour um Muito Obrigado por tudo...

Quero agradecer também, toda a ajuda e disponibilidade demonstradas ao longo da escrita da tese pela Dr.^a Susana Mendes, de Estatística.

E, como os últimos são sempre os primeiros, um Muito Obrigado à minha Família, aos meus Amigos e ao Daniel☺.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
RÉSUMÉ	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Algas marinhas	1
1.2. Revisão mundial do estado das pescas e aquacultura.....	3
1.3. Medidas existentes para o tratamento de efluentes de aquaculturas	4
1.4. Eficiência das algas como biofiltradores	7
1.5. Caracterização das espécies em estudo.....	9
1.5.1. <i>Stypocaulon scoparium</i> (Linnaeus (Kützinger), 1843)	11
1.5.1.1. Sistemática	11
FIGURA 1. <i>Stypocaulon scoparium</i> : (a) Fotografia tirada no decorrer deste trabalho, no CIIMAR; (b) – porção de <i>S. scoparium</i> em estado reprodutivo observado no microscópio óptico (ampliação x10).	11
1.5.1.2. Características morfológicas	11
1.5.1.3. Distribuição geográfica.....	12
1.5.1.4. Potenciais aplicações.....	12
1.5.2. <i>Chondracanthus acicularis</i> (Kaup, 1858).....	12
1.5.2.1. Sistemática	12
FIGURA 2. <i>Chondracanthus acicularis</i> (Kaup, 1858). (Fotografia tirada no decorrer do trabalho no CIIMAR).....	13
1.5.2.2. Características morfológicas	13
1.5.2.3. Distribuição geográfica.....	13
1.5.2.4. Potenciais aplicações.....	13
2. OBJECTIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. <i>Chondracanthus acicularis</i>	15
3.1.1. Determinação da taxa de crescimento de <i>Chondracanthus acicularis</i> a diferentes fotoperíodos.....	15
3.1.2. Determinação da taxa de crescimento de <i>C. acicularis</i> a diferentes temperaturas e na presença <i>versus</i> ausência de arejamento	16
3.1.2.1. Análise estatística	16
3.2. Experiência com diferentes espécies de macroalgas marinhas	18
3.3. <i>Stypocaulon scoparium</i>	19
QUADRO 2. Diferentes condições testadas nas experiências realizadas com a alga <i>S. scoparium</i>	19

3.3.1. Determinação da taxa de crescimento da <i>Stypocaulon scoparium</i> a diferentes intensidades luminosas e na presença versus ausência do meio VSE	19
3.3.1.1. Análise estatística	20
3.3.2. Determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes temperaturas e intensidades luminosas.....	21
3.3.2.1. Análise estatística	21
3.3.3. Determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes salinidades	22
3.3.3.1. Análise estatística	23
3.3.4. Determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes densidades de cultivo e intensidades luminosas.....	24
3.3.4.1. Análise estatística	24
3.3.5. Avaliação da remoção de nutrientes (N e P) da água por <i>S. scoparium</i>	25
QUADRO 3. Concentrações utilizadas (em μmol) para as 2 formas de N.....	26
FIGURA 3. Autoanalisador (San ⁺⁺ Continuous Flow Analyzer) utilizado na análise das amostras.....	27
3.3.5.1. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	31
4.1. Taxa de crescimento médio da <i>Chondracanthus acicularis</i> a diferentes fotoperíodos.....	31
GRÁFICO 1. Evolução da taxa de crescimento (n=4), em média, da espécie <i>C. acicularis</i> ao ser submetida a um fotoperíodo neutro (12D:12N) ou a um fotoperíodo curto (8D:16N) para 18°C, meio VSE e 50 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	31
4.2. Taxa de crescimento médio da <i>Chondracanthus acicularis</i> a diferentes temperaturas e na presença versus ausência de arejamento	32
GRÁFICO 2. Evolução da taxa de crescimento (n=3), em média, <i>C. acicularis</i> a 10°C na presença ou ausência de arejamento para o meio VSE e 40 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$... 32	
GRÁFICO 3. Evolução da taxa de crescimento (n=3), em média, <i>C. acicularis</i> a 18°C na presença ou ausência de arejamento para o meio VSE e 40 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$... 32	
4.3. Taxa de crescimento médio de diferentes espécies de macroalgas marinhas	34
GRÁFICO 4. Evolução da taxa de crescimento, em média, de diferentes espécies de macroalgas marinhas em cultura laboratorial para 15°C, meio VSE, fotoperíodo neutro e 50 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	34
4.4. Taxa de crescimento médio da <i>Stypocaulon scoparium</i> a diferentes intensidades luminosas e na presença versus ausência do meio VSE	35
GRÁFICO 5. Evolução da taxa de crescimento da espécie <i>S. scoparium</i> a 15°C e 50 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ na presença/ausência do meio VSE e fotoperíodo neutro.....	36
GRÁFICO 6. Evolução da taxa de crescimento da espécie <i>S. scoparium</i> a 15°C e 150 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ na presença/ausência do meio VSE e fotoperíodo neutro.....	36
4.5. Taxa de crescimento médio da <i>Stypocaulon scoparium</i> a diferentes temperaturas e intensidades luminosas.....	37
GRÁFICO 7. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie <i>S. scoparium</i> ao ser submetida a 10° C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.	37

GRÁFICO 8. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie <i>S. scoparium</i> ao ser submetida a 15°C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.	37
GRÁFICO 9. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie <i>S. scoparium</i> ao ser submetida a 20°C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.	38
4.6. Taxa de crescimento médio da <i>Stypocaulon scoparium</i> a diferentes salinidades.	39
GRÁFICO 10. Evolução da taxa de crescimento ao longo do tempo, em média (n=3), de <i>S. scoparium</i> em diferentes salinidades, meio VSE, 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo neutro a 15°C.	39
4.7. Taxa de crescimento médio da <i>Stypocaulon scoparium</i> a diferentes densidades de cultivo e intensidades luminosas.	40
GRÁFICO 11. Evolução da taxa de crescimento (n = 3) da espécie <i>S. scoparium</i> com meio VSE, a 15°C e com fotoperíodo neutro ao ser submetida a diferentes densidades de cultivo (g pf L ⁻¹) a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	40
GRÁFICO 12. Evolução da taxa de crescimento (n = 3) da espécie <i>S. scoparium</i> com meio VSE, a 15°C e com fotoperíodo neutro ao ser submetida a diferentes densidades de cultivo (g pf L ⁻¹) a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	41
4.8. Cinética de remoção de nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-}) do meio de cultivo.	42
4.8.1. Tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ versus tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ “starved”	42
GRÁFICO 13. Evolução da quantidade média (n=3) de diferentes formas de N presentes no meio, durante 24 horas em luz contínua, a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C através de quatro tratamentos diferentes (tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ vs tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ em que as algas foram sujeitas previamente à privação de N).	42
4.8.2. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	44
GRÁFICO 14. Evolução da quantidade média (n=3) de ambas as formas de N presentes em simultâneo no meio, durante 24 horas em luz contínua, a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C através do tratamento de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	45
4.8.3. Remoção de PO_4^{3-} por parte das algas sujeitas a diferentes tratamentos	45
GRÁFICO 15. Evolução da quantidade média (n=3) de PO_4^{3-} presente no meio, durante 24 horas em luz contínua, a 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C para os tratamentos de disponibilidade de diferentes formas de N: $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, NH_4^+ e NO_3^- “starved” e NH_4^+ e NO_3^- . As linhas horizontais representam as concentrações iniciais de PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/L}$) nos diferentes tratamentos: Amarelo ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$), Vermelho (NO_3^-) e Verde (NH_4^+).	47
4.9. Remoção dos diferentes nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-}) do meio de cultivo a diferentes concentrações.	48
4.9.1. Tratamento com NH_4^+ (150 μmol) e tratamento com NO_3^- (150 μmol)	48
GRÁFICO 16. Evolução da percentagem de NO_3^- e NH_4^+ removidos da água em ambos os tratamentos para concentrações altas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo do tempo.	48
4.9.2. Tratamento com NH_4^+ (5 μmol) e Tratamento com NO_3^- (30 μmol)	49
GRÁFICO 17. Evolução da percentagem de NO_3^- e NH_4^+ removidos da água em ambos os tratamentos para concentrações baixas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo do tempo.	49
4.9.3. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (150 $\mu\text{mol} + 150 \mu\text{mol}$)	50
GRÁFICO 18. Evolução da percentagem de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ removidos ao longo do tempo, quando presentes em simultâneo no meio e em concentrações altas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$	50
4.9.4. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (30 $\mu\text{mol} + 5 \mu\text{mol}$)	51

GRÁFICO 19. Evolução da percentagem de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ removidos ao longo do tempo, quando presentes em simultâneo no meio e em concentrações baixas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$	51
4.9.5. Tratamentos com NO_3^- , com NH_4^+ e com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ às concentrações altas para quantificar a remoção de PO_4^{3-} da água.....	51
GRÁFICO 20. Evolução da percentagem de PO_4^{3-} removido da água para os três tratamentos para concentrações altas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo do tempo.....	52
4.9.6. Tratamentos com NO_3^- , com NH_4^+ e com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ às concentrações baixas para quantificar a remoção de PO_4^{3-} da água.....	52
GRÁFICO 21. Evolução da percentagem de PO_4^{3-} removido da água para os três tratamentos para concentrações baixas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo do tempo.....	53
QUADRO 4. Percentagens médias de remoção dos nutrientes consoante o tratamento a que as algas foram submetidas.	53
4.9.7. Taxa de crescimento de <i>S. scoparium</i> sujeita a diferentes formas de N.....	54
GRÁFICO 22 – Evolução da taxa de crescimento (n=3) da <i>S. scoparium</i> com diferentes tratamentos ao longo do tempo.....	55
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	56
6. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. ANEXOS.....	77
8.1. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da <i>C. acicularis</i> a diferentes temperaturas e na presença/ausência de arejamento	77
QUADRO 5. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	77
QUADRO 6. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	77
QUADRO 7. ANOVA com dois factores fixos.	78
8.2. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes intensidades luminosas na presença/ausência do meio VSE .	78
QUADRO 8. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	78
QUADRO 9. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	78
QUADRO 10. ANOVA com dois factores fixos.	79
8.3. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes temperaturas e com diferentes intensidades luminosas.	79
QUADRO 11. ANOVA com um factor.	79
QUADRO 12. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	79
QUADRO 13. ANOVA com dois factores fixos.	80
8.4. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes salinidades	80
QUADRO 14. ANOVA com um factor.	80
QUADRO 15. Teste Post Hoc de <i>Tukey</i>	81
8.5. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da <i>S. scoparium</i> a diferentes densidades de cultivo e com diferentes intensidades luminosas	81
QUADRO 16. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	81
QUADRO 17. ANOVA com um factor.	82
QUADRO 18. ANOVA com dois factores fixos.	82

QUADRO 19. Teste Post Hoc de <i>Tukey</i>	83
8.6. Tratamento estatístico para a avaliação da remoção de diferentes nutrientes da água pela espécie <i>S. Scoparium</i>	83
QUADRO 20. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	83
QUADRO 21. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	83
QUADRO 22. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	84
QUADRO 23. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	84
8.7. Tratamento estatístico para avaliação da remoção de diferentes nutrientes da água pela espécie <i>S. Scoparium</i> ao longo do tempo	84
QUADRO 24. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	84
QUADRO 25. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	85
QUADRO 26. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	85
QUADRO 27. <i>Teste-t</i> para duas condições independentes.	85
8.8. Tratamento estatístico para avaliar o efeito das diferentes concentrações de nutrientes na taxa de crescimento de <i>S. Scoparium</i>	86
QUADRO 28. ANOVA com um factor.	86

RESUMO

A aquacultura animal intensiva liberta elevadas quantidades de nutrientes no ecossistema aquático que podem conduzir à eutrofização das águas costeiras. Os estudos conduzidos nos sistemas de aquacultura demonstraram que as algas são eficientes na minimização do impacto ambiental da aquacultura ao canalizar os nutrientes para formação de nova biomassa com valor comercial.

O presente trabalho teve como objectivo o estudo do cultivo de macroalgas em laboratório através da determinação da taxa de crescimento a diferentes fotoperíodos, densidades de cultivo, densidades de fluxo de fotões e temperaturas com vista a uma posterior integração em sistemas de aquacultura integrada multitrófica. Pela análise dos resultados obtidos concluiu-se que a espécie *Chondracanthus acicularis* não é uma boa candidata para integrar sistemas de aquacultura integrada multitrófica uma vez que apresentou taxas de crescimento maioritariamente negativas e dificuldades no estabelecimento das culturas por propagação vegetativa. Por outro lado, a espécie *Stypocaulon scoparium* apresentou resultados promissores, uma vez que, além de apresentar uma taxa de crescimento positiva suporta uma variada gama de temperaturas e salinidades. *Stypocaulon scoparium* cresce mais a elevadas densidades de fluxo de fotões ($150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a menores densidades de cultivo ($0,1 \text{ g pf L}^{-1}$).

Outro objectivo foi a avaliação da remoção de nutrientes por *S. scoparium*. A experiência com duração de 24h permitiu concluir que esta espécie removeu maior parte dos nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) no final das 24h. As algas privadas da fonte de N removeram maior quantidade de nutrientes do que as restantes. Quanto à remoção de nutrientes ao longo de duas semanas concluiu-se que a espécie *S. scoparium* apresenta valores de remoção superiores a 90% para concentrações altas de N ($150 \mu\text{mol/L}$) e para ambas as fontes de N e taxas de crescimento na ordem dos $3\% \text{ pf dia}^{-1}$. Quando ambas as fontes de N estavam disponíveis (NO_3^- e NH_4^+), *S. scoparium* removeu preferencialmente NH_4^+ . Verificou-se ainda que é menos eficiente na remoção de fósforo PO_4^{3-} (56-98%). Por estes resultados, *S. scoparium* parece ser uma boa candidata para os sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

Palavras-chave: Aquacultura Integrada Multitrófica, macroalgas, nutrientes *Stypocaulon scoparium*.

ABSTRACT

Animal intensive aquaculture releases large quantities of nutrients in the aquatic ecosystem, which may lead to eutrophication of coastal waters. Studies conducted in aquatic systems have shown that algae are effective in minimizing the environmental impact of aquaculture by directing nutrients for algae biomass which have commercial value.

The objective of the current work was to study the cultivation of macroalgae, in laboratory, by determining the growth rate in different photoperiods, stocking density, photon flux density and temperatures, aiming at the subsequent application in integrated multi-trophic aquaculture systems. It was concluded that the species *Chondracanthus acicularis* is not a good candidate for application in integrated multi-trophic aquaculture systems, since it had negative growth rates and difficulties in establish stable cultures through vegetative propagation. On the other hand, the species *Stypocaulon scoparium* showed promising results since it demonstrated a positive growth rate over a wide range of temperatures and salinities. *Stypocaulon scoparium* grows better at a high photon flux density ($150 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and at stocking densities of 0, 1 g fw L⁻¹.

Another objective was to evaluate the removal of nutrients by *S. scoparium*. The nutrient uptake experiment, with a duration of 24 hours, allowed to conclude that this species removed the majority of nutrients (NO_3^- , NH_4^+ and PO_4^{3-}) by the end of 24 hours. The algae previously deprived of the source of N removed a greater quantity of nutrients than the others. As for the removal of nutrients over a two week period it was concluded that the species *S. scoparium* removes over 90% of N in high concentrations ($150 \mu\text{mol/L}$) for both N sources, growing approximately 3% fw day⁻¹. When the two N sources were simultaneously available (NO_3^- and NH_4^+), *S. scoparium* removed preferentially NH_4^+ . It was also shown that this species seems to be less efficient in removing phosphorus in the form of PO_4^{3-} (56-98%). In conclusion, the results indicate that *S. scoparium* can be a good candidate for integrated multi-trophic aquaculture systems and deserves further studies with that purpose.

Keywords: Integrated multi-trophic aquaculture, macroalgae, nutrients, *Stypocaulon scoparium*.

RÉSUMÉ

L' Aquaculture animal intensive libère de nombreuses quantités d'éléments nutritifs dans l'écosystème aquatique qui peut conduire à l'eutrophisation des eaux côtières. Les études effectuées dans les systèmes d'aquaculture démontrent que les algues sont efficaces en ce qui concerne la minimisation de l'impact de l'environnement de l'aquaculture vu qu'elles canalisent les éléments nutritifs pour la biomasse d'algues qui ont une valeur commerciale.

Ce travail a eu pour but l'étude de la culture des macro algues en laboratoire à travers la détermination du taux de croissance pour de différentes photo-périodes, densités de culture, densités de flux de photons et températures ayant comme objectif une postérieure intégration dans des systèmes d'aquaculture intégrée multi-trophique. D'après l'analyse des résultats obtenus, on peut conclure que l'espèce *Chondracanthus acicularis* n'est pas une bonne candidate pour faire partie des systèmes d'aquaculture intégrée multi-trophique, une fois qu'elle présente des taux de croissance majoritairement négatifs et difficultés dans l'établissement des cultures pour propagation végétative. D'un autre côté, l'espèce *Stypocaulon scoparium* a présenté des résultats prometteurs, vu que, au-delà de présenter un taux de croissance positif, celle-ci supporte une variété de gamme de températures et de salinités, car elle augmente plus grâce à des densités élevées de flux de photons ($150 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et à des plus petites densités de culture ($0,1 \text{ g pf L}^{-1}$).

Un autre objectif a été l'évaluation de déplacement d'éléments nutritifs de la *S. scoparium*. L'expérience d'une durée de 24 heures, nous a permis de conclure que cette espèce a déplacé la majeure partie des éléments nutritifs (NO_3^- ; NH_4^+ ; PO_4^{3-}) à la fin des mêmes 24 heures. Les algues privées de la source N ont déplacées une plus grande quantité d'éléments nutritifs que les restantes. Quant au déplacement d'éléments nutritifs, au long de deux semaines, on peut conclure que l'espèce *S. scoparium* présente des valeurs de déplacement supérieures à 90% pour de hautes concentrations de N ($150 \mu\text{mol/L}$) et pour les deux sources de N et des taux de croissance de l'ordre de $3\% \text{ pf jour}^{-1}$. Quand les deux sources de N sont disponibles (NO_3^- et NH_4^+), *S. scoparium* a déplacé préférentiellement NH_4^+ . Mais cela est moins efficace dans le déplacement du phosphore PO_4^{3-} (56-98%). Ainsi, le *S. scoparium* semble être un bon candidat pour les systèmes d'aquaculture intégrée multi-trophique.

Mots-clés: Aquaculture intégrée multi-trophique, macro algues, éléments nutritifs, *Stypocaulon scoparium*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas marinhas

A ficologia ou algologia é o estudo das algas. A palavra ficologia vem do grego *phycos* que significa alga marinha (Lee, 1999). As algas são um grupo diverso de organismos fotossintéticos que não possuem raízes, folhas e tecidos vasculares (Van Den Hoek *et al.*, 1995).

O fitoplâncton oceânico, com uma produção de vários bilhões de toneladas de peso fresco por ano, forma a base da cadeia alimentar aquática. Portanto, não é uma surpresa que as microalgas que compõem o fitoplâncton tenham um papel crucial na nutrição dos animais na aquicultura marinha, especialmente moluscos, camarão e peixe (Støttrup & McEvoy, 2003).

As microalgas distinguem-se das macroalgas por serem microscópicas em tamanho, muitas vezes unicelulares e são mais conhecidas devido às algas verdes-azuis (cianófitas), diatomáceas e dinoflagelados, que algumas vezes formam “blooms” e contaminam rios, riachos, lagos e zonas costeiras (McHugh, 2003).

As algas marinhas têm espécies em quatro reinos (www.algaebase.com) Bacteria, Protozoa, Plantae e Chromista e diversos filos, entre os quais, Cyanobacteria, Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinophyta, Ochrophyta (inclui as algas castanhas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes) (Graham & Wilcox, 2000).

As algas castanhas são as que podem atingir maiores dimensões. Podem ter tamanhos que vão até aos 50 m de comprimento (kelp gigante, por exemplo, *Macrocystis*), passando por espécies espessas, tipo cabedal, de 2-4 m de comprimento, até espécies mais pequenas com apenas alguns centímetros de comprimento. As algas vermelhas são normalmente mais pequenas, apresentando uma gama que geralmente vai desde alguns centímetros até um metro em comprimento. As algas verdes também são pequenas, quando comparadas com as maiores algas castanhas, com uma gama de tamanhos similar às algas vermelhas (McHugh, 2003).

Desde espécies pequenas com uma única célula com um micrómetro de diâmetro a macroalgas gigantes com mais de 50 metros de comprimento, as algas são organismos antigos e abundantes, que podem ser encontradas em todos os ecossistemas da biosfera. Durante bilhões de anos as algas exerceram um profundo efeito no nosso planeta e na sua biota, e continuam a fazê-lo actualmente (Graham & Wilcox, 2000).

Tradicionalmente, as algas eram colhidas das populações selvagens e utilizadas para comer, para alimento para os animais, como fertilizantes e melhoradores da qualidade do solo. Mais recentemente, as algas tornaram-se uma importante fonte de vários compostos, tais como os ficocolóides. Para além do consumo humano directo (especialmente em países asiáticos) são também importantes na indústria de processamento alimentar, na medicina e na biotecnologia (Pereira *et al.* 2008).

O aumento da procura de macroalgas nos últimos 50 anos ultrapassou a capacidade de fornecimento dos stocks naturais. Devido a esta necessidade, a investigação sobre ciclos de vida destas algas intensificou-se e levou ao desenvolvimento das indústrias de cultivo. Actualmente mais de 90 por cento da procura do mercado (McHugh, 2003) é suprimida por algas produzidas em aquacultura. As técnicas de cultivo de algumas espécies de macroalgas estão por isso standardizadas (Yarish & Pereira, 2008).

Actualmente, frequentemente sem termos conhecimento disso, todos usamos produtos de algas marinhas na nossa vida diária de uma maneira ou de outra. Várias espécies de algas castanhas e vermelhas são utilizadas para produzir três hidrocolóides: agar (algas vermelhas), alginatos (algas castanhas) e carragenanas (algas vermelhas). Um hidrocolóide é uma substância não-cristalina com moléculas muito largas e que se dissolvem em água dando origem a uma solução espessa (viscosa). Os alginatos, agar e carragenanas são carbo-hidratos solúveis em água que são utilizados para espessar as soluções aquosas, para formar gelatinas de vários graus de firmeza, para formar filmes solúveis em água e para estabilizar alguns produtos, tais como gelados.

Os produtos cosméticos, tais como os cremes e as loções, algumas vezes mostram nos seus rótulos que os seus conteúdos incluem extractos marinhos, extractos de alga ou similares. Normalmente isso significa que um dos hidrocolóides

extraídos da alga foi adicionado. Os alginatos ou carragenanas podem melhorar as propriedades de retenção da hidratação da pele pelo produto (McHugh, 2003).

As algas também ganharam um novo ímpeto como sistemas experimentais para pesquisa biológica e estão agora a ser promovidos em sistemas de policultura como uma parte integrante da IMTA – do inglês “integrated multi-trophic aquaculture” (Pereira *et al.* 2008).

1.2. Revisão mundial do estado das pescas e aquacultura

As capturas por pesca e a aquacultura abasteceram o mundo com cerca de 110 milhões de toneladas de peixe em 2006, sendo que cerca de 50% desse valor provém da aquacultura. Metade de toda a produção em aquacultura provém do peixe, um quarto das algas e o restante quarto de crustáceos (camarões, caranguejos, etc.) e moluscos (ostras, amêijoas, etc.) (<http://www.fao.org/fishery/topic/13531/en>).

Após o forte aumento do número de stocks esgotados e sobre-explorados observado durante os anos 70 e 80, a proporção destes tem permanecido inalterada, durante os últimos 10-15 anos. É estimado que em 2005, cerca de um quarto dos stocks monitorizados pela FAO estavam subexplorados ou moderadamente explorados (3% e 20%, respectivamente), enquanto metade dos stocks (52%) estavam totalmente explorados e por isso originando capturas que estavam no limite (ou próximo) do máximo sustentável.

Os restantes stocks encontravam-se sobre-explorados, esgotados ou a recuperar do esgotamento (17%, 7% e 1%, respectivamente). Todos estes estavam portanto a produzir menos que o seu potencial máximo, devido à excessiva pressão piscatória exercida no passado. Não apresentam por isso possibilidade, no curto ou médio prazo, para futuras expansões e com um risco aumentado de futuros declínios e necessidade de recuperação (SOFIA, 2006).

De acordo com estatísticas da FAO (SOFIA, 2006), a contribuição da aquacultura para o fornecimento global de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos continua a crescer, aumentando de 3,9% da produção total, em peso, em 1970, para 27,1% em 2000, 32,4% em 2004 e 50% em 2006. De facto, a aquacultura é o sector de produção de alimentos de origem animal com maior

crescimento, 8,9%/ano comparativamente a 1,2%/ano nas capturas pela pesca e 2,8%/ano na produção animal terrestre.

Quanto aos restantes organismos aquáticos, a produção de algas pela aquacultura, a nível mundial foi de 15,1 milhões de toneladas (7,2 biliões de dólares americanos) em 2006. A aquacultura de algas tem vindo a aumentar regularmente, com uma taxa de crescimento média anual de 8% desde 1970. Em 2006, contribuiu em cerca de 93% do fornecimento total mundial de algas (<http://www.fao.org/fishery/topic/13531/en>).

É de salientar que, apesar da aquacultura e as pescas serem actividades que competem entre si, estas podem ser também complementares e praticadas em simultâneo. A aquacultura pode, inclusivamente, servir de suporte às pescas ou mesmo contribuir para o repovoamento dos mares. Deste modo, restaura-se a riqueza pesqueira de uma determinada zona de pesca e/ou alivia-se a pressão exercida sobre algumas espécies através da oferta de alternativas ao consumidor (Henriques, 1998).

Como é o caso em muitos sistemas de produção alimentar, a aquacultura tem, ou pode ter, impactos negativos. Os efeitos mais comuns no ecossistema de muitas práticas utilizadas em aquacultura podem incluir:

- a) Aumento do esforço piscatório, uma vez que as farinhas e os óleos de peixe são os maiores constituintes dos alimentos fornecidos às espécies carnívoras/omnívoras;
- b) Mudanças nas comunidades bentónicas;
- c) Eutrofização de lagos ou zonas costeiras;
- d) Competição por recursos naturais, (por exemplo, água).

Existe por isso um entendimento crescente de que o desenvolvimento sustentável da aquacultura requer um ambiente adequado, com enquadramentos institucionais, legais e de gestão apropriados e guiados por uma política global (SOFIA, 2006).

1.3. Medidas existentes para o tratamento de efluentes de aquaculturas

Estima-se que a aquacultura europeia liberta entre 3 a 8 milhões de toneladas de fósforo (P) e 30 a 60 milhões de toneladas de azoto (N) por ano (European

Environmental Agency, 1999). Esta libertação de nutrientes é em primeiro lugar causada pela produção intensiva ou semi-intensiva de peixe, onde apenas 30% da alimentação fornecida é retida pelas espécies cultivadas e mais de 70% é libertada no meio ambiente (Neori e Shpigel, 1999; Troell *et al.*, 2003; Neori *et al.*, 2004).

Com a implementação da Directiva Quadro da Água, adoptada pelos países da União Europeia desde 2000 (Jornal Oficial, 327) é esperada uma redução nos limites permitidos para a concentração de nutrientes presentes nos efluentes de aquacultura. Esta directiva deverá estar totalmente implementada pelos países membros até 2015. Encontrar uma solução adequada para o excesso de nutrientes presentes nos efluentes provenientes de aquacultura tornar-se-á, por isso, um factor decisivo na expansão do sector de forma sustentável, quer a nível ecológico quer a nível económico (Matos *et al.*, 2006).

Existem várias opções para reduzir a carga de nutrientes em aquacultura, incluindo a melhoria da utilização alimentar pelos animais e o tratamento dos efluentes com filtros biológicos ou químicos. Actualmente, os nutrientes dissolvidos na água podem ser removidos eficazmente dos efluentes das aquaculturas através de filtros biológicos e químicos.

Os filtros químicos utilizados são principalmente de dois tipos – os filtros de carbono activo e os filtros de troca de iões. Os filtros de carbono removem os nutrientes dissolvidos através de uma substância activa de carbono que facilita a adsorção das moléculas inorgânicas. Quanto aos filtros de troca de iões, estes são baseados em material ionizado que fica inactivo rapidamente em águas ricas em iões (Troell *et al.*, 2003).

Os filtros biológicos são muitas vezes baseados na oxidação bacteriana da amónia (NH_4^+) para a forma menos tóxica do azoto, o nitrato (NO_3^-), por nitrificação. Contudo, este método por si só não remove os nutrientes. No caso do azoto este é essencialmente convertido de uma forma para outra. Sob condições anaeróbias e com a presença de matéria orgânica própria, outras bactérias podem transformar os desperdícios de nitratos em N_2 gasoso que pode então ser removido do sistema. Estes sistemas são no entanto complexos e dispendiosos. Quanto à remoção de fósforo, pode ser possível utilizar a precipitação química de uma forma similar à utilizada nas instalações de tratamento de esgotos (Troell *et al.*, 2003).

Algumas espécies de microalgas também são utilizadas como filtros biológicos em sistemas de tanques no exterior ou em fotobiorreactores tubulares no interior. As microalgas têm a vantagem de poderem ser cultivadas no mesmo tanque que os peixes se depois forem filtradas por uma cultura integrada de crustáceos (Troell *et al.*, 2003). Contudo, as populações de microalgas são difíceis de controlar (“blooms”) em tanques no exterior e limitam as trocas de água, uma vez que muitas trocas de água podem simplesmente provocar a sua saída dos sistemas de tanques (Troell *et al.*, 2003). Para além disso são responsáveis por muitas contaminações e, se o objectivo final for a recuperação da biomassa produzida, tornam-se sistemas complexos e dispendiosos.

Conclui-se portanto que as técnicas de biofiltração até aqui referidas apenas transformam parcialmente os nutrientes em outras formas, não reduzindo verdadeiramente a sua carga ambiental.

O uso das algas (principalmente as macroalgas) como biofiltros tem sido proposto como um método ambientalmente aceitável e menos dispendioso para processar os desperdícios provenientes da aquacultura animal. Este conceito torna-se especialmente útil em sistemas de produção de espécies de níveis tróficos mais elevados, em produção intensiva e recorrendo a alimento exógeno, uma vez que as algas podem remover até 90% das descargas de nutrientes (Matos *et al.*, 2006).

Os novos sistemas de aquacultura integrada utilizam espécies de diferentes níveis tróficos de forma a reduzir os desperdícios enquanto a produtividade total aumenta (em peso e em valor). Assim, quando integrados com a aquacultura de peixes ou camarão, os organismos extractivos transformam desperdícios em recursos produtivos (Troell *et al.* 2003). Deste modo, os nutrientes desperdiçados na aquacultura animal intensiva são considerados um recurso e não um encargo. É deste modo que surge o conceito de aquacultura integrada multitrófica (IMTA).

O conceito da aquacultura integrada multitrófica constitui um elemento essencial na Gestão da Zona Costeira e aspira à redução, de uma maneira económica e socialmente benéfica, dos impactos ambientais adversos da aquacultura no ambiente costeiro (Chow *et al.*, 2001; Neori *et al.*, 2004). No entanto, há que ter em conta que a aquacultura integrada é um sistema dinâmico, que muda de acordo com variáveis como a localização, época, espécies e meio ambiente. É necessário conhecer os mecanismos inerentes a este sistema e adaptá-los consoante cada

situação. Por outras palavras, não existe uma receita única que se possa aplicar em todos os sistemas.

1.4. Eficiência das algas como biofiltradores

Os métodos em que são utilizadas algas para tratar dos efluentes dos sistemas de aquacultura foram iniciados em meados dos anos 70 (Haines, 1975; Langton *et al.*, 1977). A rápida expansão dos sistemas intensivos de aquacultura e a crescente preocupação com os efeitos negativos no ambiente, provocados por tal prática, renovaram e aumentaram a investigação no desenvolvimento de técnicas de integração das algas, a partir do final dos anos 90 (Neori e Shpigel, 1999; Chopin *et al.*, 1999a,b).

Vários estudos já demonstraram que é possível economicamente cultivar algas de elevado valor comercial, utilizando os efluentes de aquaculturas intensivas e semi-intensivas, melhorando a qualidade da água e permitindo a sua recirculação ou a descarga no mar (Neori e Shpigel, 1999, Matos *et al.*, 2006).

Num sistema integrado de aquacultura multitrófica a escolha das espécies de alga a utilizar depende de alguns critérios:

- a) Elevada taxa de crescimento e concentração de azoto nos tecidos;
- b) Eficiência na remoção de nutrientes e capacidade de resistir à exposição prolongada a concentrações elevadas desses compostos;
- c) Facilidade de cultivo;
- d) Controlo do ciclo de vida, preferencialmente com capacidade de propagação vegetativa;
- e) Resistência a epífitos e a organismos causadores de doenças;
- f) Valor comercial;
- g) Correspondência entre as características fisiológicas e o ambiente onde serão cultivadas.

Além disso, devido ao dano ecológico que pode resultar da introdução de espécies não nativas, as algas utilizadas devem ser espécies locais. Além destes critérios, a escolha da alga irá ser influenciada pela aplicação pretendida. Se o que é prioritário é o valor da biomassa produzida então as decisões posteriores serão baseadas na qualidade do tecido e no valor acrescentado dos compostos secundários.

Por outro lado, se o principal objectivo é a biorremediação, então a assimilação dos nutrientes, a armazenagem de nutrientes no tecido e o crescimento, são os elementos principais em que é baseada a escolha das algas a utilizar.

As algas utilizam a energia solar e os nutrientes disponíveis (particularmente Carbono, N e P) para fotossintetizarem biomassa nova enquanto assimilam os nutrientes inorgânicos dissolvidos na água. Estudos realizados em culturas confirmaram que os nutrientes excretados pelo peixe, camarão e bivalves encontram-se disponíveis para o crescimento das algas (Troell *et al.*, 2003). Tais conclusões não são surpreendentes, pois o azoto excretado por estes animais – NH_3 - é frequentemente a fonte de azoto preferencial para as algas (Troell *et al.*, 2003; Pereira *et al.* 2008). Por outro lado, a libertação do fósforo dissolvido provoca o aumento da concentração de fosfato (PO_4^{3-}) na água, sendo esta a forma do fósforo mais disponível para o crescimento das algas (Chopin *et al.*, 1999; Troell *et al.*, 2003).




Um aspecto importante para sistemas de produção animal que utilizam a recirculação de água é manter as concentrações de nutrientes abaixo de determinados limites. Algumas formas de N, tais como o nitrito (NO_2^-) e a amónia (NH_4^+) são tóxicas e, em determinadas concentrações, podem ser letais para os peixes. Este parâmetro é afectado pela carga de nutrientes (concentração e taxas de renovação), consumo algal e área da cultura algal. Apesar de muitas espécies de algas terem provado a sua capacidade em remover eficazmente o N e P a elevadas concentrações, ainda existem muitas preocupações no que diz respeito à sua eficiência numa escala comercial. A extrapolação de alguns dados experimentais indica que será necessária uma grande área de cultivo algal para a remoção de uma proporção significativa de nutrientes desperdiçados numa unidade de cultivo comercial (Troell *et al.*, 2003).

Em muitos casos, a produção em aquacultura intensiva ocorre durante todo o ano e a sua interacção com o ambiente varia sazonalmente. Da mesma forma, a taxa de consumo de nutrientes pelo biofiltro algal (dependente de luz solar) e a sua produção por área variam sazonalmente, sendo usualmente superiores no verão. Assim, é importante conhecer as tendências sazonais na performance do biofiltro algal ao longo de ciclos anuais. Até ao presente, menos de 40% dos estudos realizados abordaram um ciclo de produção anual (Troell *et al.*, 2003).

O sistema ideal incluirá espécies de algas que incorporem o valor económico e a biorremediação (Neori *et al.*, 2004).

1.5. Caracterização das espécies em estudo

No decurso deste trabalho foram estudadas diversas espécies de macroalgas marinhas. O quadro seguinte apresenta a classificação taxonómica e resume os aspectos mais relevantes da morfologia das espécies testadas.

Macroalgas marinhas vermelhas	Morfologia
 <p>^a <i>Chondracanthus teedei</i> (Mertens ex Roth) Kützing</p>	<p>Alga de cor vermelha escura, de consistência cartilaginosa e com um talo até 10 cm de comprimento. Vive fixa por um disco de onde partem um ou dois eixos aplanados.</p> <p>A ramificação é irregular, de forma alterna ou oposta, mas sempre num só plano. Habita no litoral inferior de costas semi-expostas e protegidas. Tolerância a presença de areia (González <i>et al.</i>, 1998).</p>
 <p>^a <i>Lomentaria articulata</i> (Hudson) Lyngbye</p>	<p>De cor vermelha, consistência mucilaginosa, até 20 cm de comprimento. Apresenta um disco, que se fixa ao substrato, de onde partem vários eixos cilíndricos divididos regularmente em segmentos ovóides e alongados. Os eixos ramificam-se em dicotomia irregular. Habita no litoral médio e baixo e em poças de maré (González <i>et al.</i>, 1998).</p>
 <p>^b <i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham</p>	<p>Alga vermelha, de aspecto cilíndrico e consistência cartilaginosa. Vive fixa por um pequeno disco perene de onde partem um ou mais eixos estreitando-se nos ápices com uma ramificação irregular e profusa. Vive no litoral inferior e poças de maré do litoral médio (www.algaebase.org).</p>

 <p>^a <i>Gymnogongrus crenulatus</i> (Turner) J. Agardh</p>	<p>De cor vermelha escura com as extremidades mais pálidas, numa cor rosada. Tem consistência cartilaginosa e pode ter até 10 cm de comprimento. Vive fixa ao substrato por um disco de 1 cm de diâmetro de onde saem vários estipes cilíndricos que se dividem várias vezes dicotomicamente num só plano. Nas partes terminais às vezes são visíveis estruturas reprodutoras como manchas circulares vermelhas rodeadas de um círculo mais claro. Habita em rochedos protegidos e húmidos nas costas semi-expostas (González <i>et al.</i>, 1998).</p>
 <p>^a <i>Scinaia furcellata</i> (Turner) J. Agardh</p>	<p>Alga vermelha de consistência membranosa. Fixa por um disco de onde parte um eixo que se divide muitas vezes dicotomicamente e em vários planos. Tanto os eixos como os ramos são cilíndricos, de 2-3 mm de diâmetro. Vive nas poças de maré e nas rochas das costas protegidas ou semi-expostas (González <i>et al.</i>, 1998).</p>
 <p>^c <i>Palmaria palmata</i> (Kuntze)</p>	<p>Talo de cor vermelha, laminar, até 50 cm de comprimento, de consistência membranosa. Fixa por um disco de onde saem um ou vários estipes curtos e estreitos que terminam numa lâmina alongada; ramificação dicotômica. Nas margens apresenta proliferações marginais de contorno lanceolado a oval. Habita no litoral inferior e infralitoral de costas expostas e semi-expostas e pode ocorrer como epífita da alga <i>Laminaria hyperborea</i> (González <i>et al.</i>, 1998).</p>

QUADRO 1. Características morfológicas distintivas entre as diferentes espécies.

Fonte: (a) González *et al.*, 1998; (b) www.algaebase.org; (c) Vieira *et al.*, 2008.

1.5.1. *Stypocaulon scoparium* (Linnaeus (Kützinger), 1843)

1.5.1.1. Sistemática

Reino	Chromista
Filo	Ochrophyta
Classe	Phaeophyceae
Ordem	Sphacelariales
Família	Stypocaulaceae
Género	<i>Stypocaulon</i>
Espécie	<i>Stypocaulon scoparium</i> (Linnaeus (Kützinger), 1843)

(Fonte: <http://www.algaebase.org/>).



(a)



(b)

FIGURA 1. *Stypocaulon scoparium*: (a) Fotografia tirada no decorrer deste trabalho, no CIIMAR; (b) – porção de *S. scoparium* em estado reprodutivo observado no microscópio óptico (ampliação x10).

1.5.1.2. Características morfológicas

Alga de cor castanha, de consistência áspera, que pode medir até 10 cm de comprimento. Fixa ao substrato por rizóides, forma tufos com filamentos ramificados em todos os sentidos. É uma alga perene com aspecto mais robusto no Inverno (González *et al.*, 1998).

1.5.1.3. Distribuição geográfica

Habita no litoral médio e inferior e em poças de maré de costas semi-expostas e protegidas. Esta espécie encontra-se por todo o Atlântico Norte, Mediterrâneo, Marrocos e Ilhas de Cabo Verde (González *et al.*, 1998).

1.5.1.4. Potenciais aplicações

Segundo McHugh (2003) o mercado para a extracção de alginatos em algas castanhas em 2001 foi de 33% para a alimentação e farmacêutica e 67% para a indústria. Actualmente, *Stypocaulon scoparium* é utilizada em cosmética contribuindo para a reestruturação da pele (<http://www.incosmetics.com/>; <http://www.gelyma.com/>).

1.5.2. *Chondracanthus acicularis* (Kaup, 1858)

1.5.2.1. Sistemática

Reino	Plantae
Filo	Rhodophyta
Classe	Florideophyceae
Ordem	Gigartinales
Família	Gigartinaceae
Género	Chondracanthus
Espécie	<i>Chondracanthus acicularis</i> (acicularis (Roth) Fredericq in Hommersand, Guiry, Fredericq & Leister, 1993: 117)

Fonte: (<http://www.algaebase.org/>).



FIGURA 2. *Chondracanthus acicularis* (Kaup, 1858). (Fotografia tirada no decorrer do trabalho no CIIMAR).

1.5.2.2. Características morfológicas

Alga filiforme, de cor vermelha escura, descolorada no Verão, de consistência cartilaginosa. Fixa por uma base discóide e talo constituído por eixos cilíndricos até 9 cm de comprimento e 2 mm de largura, fronde irregular com ramos curvos e pontiagudos que frequentemente crescem emaranhados de modo que no seu conjunto a alga possui um aspecto rasteiro formando um denso tapete no litoral inferior de costas semi expostas e protegidas. A reprodução sexual é mal conhecida; a propagação vegetativa é frequente (González *et al.*, 1998).

1.5.2.3. Distribuição geográfica

Espécie provavelmente perene, infralitoral, tolera a presença de areia. A sua presença foi documentada nas Ilhas Britânicas, Estados Unidos da América (da Carolina do Norte ao Uruguai), Mediterrâneo e no Atlântico Norte (especialmente em França, Espanha e Portugal) (Guiry, 1984).

1.5.2.4. Potenciais aplicações

Segundo McHugh (2003) o mercado para extracção de carragenanas em algas vermelhas em 2001 foi de 73% para a alimentação, 6% para pasta de dentes e 21% para outras aplicações. Salieta-se que, não foi encontrado nenhum produto no mercado que utilize extractos de carragenanas de *Chondracanthus acicularis*.

2. OBJECTIVOS

Em Portugal, foram já realizados alguns estudos com o objectivo de avaliar se projectos como os de aquacultura integrada são viáveis. Os objectivos são sempre minimizar o impacto ambiental da aquacultura (principalmente, a libertação excessiva de nutrientes) ao canalizar os nutrientes para biomassa de algas com valor comercial e reduzir os custos da aquacultura intensiva.

Deste modo, o Laboratório de Biodiversidade Costeira (LBC) do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) encontra-se a desenvolver o estudo do cultivo de macroalgas em laboratório e em sistemas de aquacultura integrada multitrófica à escala piloto. Estes trabalhos conduzem ao aumento da diversidade das espécies de algas disponíveis para utilizar em sistemas integrados na região Norte de Portugal. Neste âmbito, foi desenvolvido o presente trabalho que teve como objectivos:

- a) Determinação da taxa de crescimento, em média, de diferentes espécies de algas marinhas a diferentes fotoperíodos, densidades de fluxo de fotões, densidades de cultivo e temperaturas.
- b) Avaliação da assimilação de nutrientes por *Stypocaulon scoparium* para determinar se é uma espécie com interesse para ser aplicada em sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Chondracanthus acicularis*

A espécie *C. acicularis* foi colhida numa praia rochosa situada no norte de Portugal (Mindelo) (41°19'N, 8°44'W) em Janeiro de 2008 em função da hora da baixa-mar, de acordo com as tabelas disponibilizadas *on-line* pelo Instituto Hidrográfico (www.hidrografico.pt).

No laboratório, procedeu-se à limpeza das algas com água do mar filtrada até 1µm. As algas foram depois colocadas em matrizes com meio Von Stoch's Enrichment (VSE) adicionando cada um dos componentes da receita, segundo Ott (1965) a água do mar filtrada até 1 micron e tratada com UV. Salieta-se que esta metodologia foi idêntica para todas as experiências, com algumas adaptações, devidamente descritas no texto. Os matrizes com as algas foram mantidos em duas câmaras de ambiente controlado à temperatura de 10 e 18°C de modo a aclimatarem durante uma semana antes do início das experiências.

3.1.1. Determinação da taxa de crescimento de *Chondracanthus acicularis* a diferentes fotoperíodos

Este ensaio teve como objectivo determinar a taxa de crescimento, em média, da espécie *Chondracanthus acicularis* ao ser submetida a diferentes fotoperíodos. Foram testados um fotoperíodo neutro (12h dia:12h noite) e um fotoperíodo curto (8h dia:16h noite).

Foram utilizados quatro matrizes (n=4) para cada tratamento. Em todos os matrizes foram colocados 10 ápices de *C. acicularis*, com aproximadamente 1-1.5 cm de comprimento com água salgada e meio VSE. Previamente, procedeu-se à sua limpeza passando-os por água do mar filtrada, betadine a 10% durante (30 segundos) e novamente por água do mar filtrada. Os matrizes tinham capacidade de 1L, arejamento de fundo suave e foram postos em câmaras de ambiente controlado à temperatura 18°C e 50 µmol fotões m⁻² s⁻¹ e em cada um dos dois fotoperíodos testados.

O procedimento para determinação do peso e taxa de crescimento foi idêntico para maior parte das experiências realizadas e consistiu na realização de pesagens uma vez por semana com renovações do meio VSE (as exceções a este procedimento estão devidamente assinaladas no texto). Durante as pesagens foram registados os pesos frescos (pf) das algas, sendo o excesso de água retirado com toalhas de papel absorvente. Os pesos frescos foram depois utilizados para calcular a taxa de crescimento das algas, em percentagem de peso fresco por dia (% pf dia⁻¹) nas diferentes condições, segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de crescimento} = [\text{LN (pf2)} - \text{LN (pf1)}] / t * 100$$

em que pf2 representa a biomassa final e pf1 representa a biomassa inicial em um determinado período de tempo (t).

3.1.2. Determinação da taxa de crescimento de *C. acicularis* a diferentes temperaturas e na presença *versus* ausência de arejamento

Este ensaio teve como objectivo determinar a taxa de crescimento, em média, da espécie *Chondracanthus acicularis* ao ser submetida a diferentes temperaturas (10 e 18°C) e diferentes arejamentos (presença e ausência).

Foram utilizados três matrizes (n=3) para cada tratamento. Em todos os matrizes foram colocados 10 ápices de *C. acicularis*, com aproximadamente 1-1,5 cm de comprimento, em meio VSE. Os matrizes tinham capacidade de 1L e foram postos em duas câmaras de ambiente controlado às temperaturas de 10°C e 18°C, ambas com um fotoperíodo neutro (12D:12N) e 40 µmol fotões m⁻² s⁻¹. Em cada câmara existiam três matrizes com arejamento e três matrizes sem arejamento.

Durante a duração destas experiências a balança utilizada nas pesagens foi uma balança de precisão Mettler Toledo AB 204.

3.1.2.1. Análise estatística

O software estatístico utilizado neste trabalho (SPSS 16.0 for Windows®) associa ao valor da estatística do teste, um nível de significância. Este valor representado por "sig." indica o nível de significância para não rejeitar a hipótese nula.

Durante a presente investigação, o nível de confiança utilizado é de 95%, o que significa que se o valor de “sig.” for inferior a 0,05, a hipótese nula em causa será rejeitada.

Para verificar se a taxa de crescimento da espécie *C. acicularis* é igual quando submetida a diferentes temperaturas (10 e 18°C) e quando submetida a diferentes arejamentos (presença ou ausência) ao longo dos dias, definiram-se as hipóteses adequadas.

Realizou-se um teste paramétrico (*teste-t*), para duas condições independentes para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *C. acicularis* para as duas temperaturas ao longo dos dias.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie *C. acicularis* para as duas temperaturas ao longo dos dias.

Realizou-se um teste paramétrico (*teste-t*), para duas condições independentes para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *C. acicularis* para os dois arejamentos ao longo dos dias.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie *C. acicularis* para os dois arejamentos ao longo dos dias.

Após ambos os factores terem sido testados individualmente através do *teste-t*, recorreu-se à análise da variância a mais de um factor. Sendo que neste estudo o propósito será o de analisar simultaneamente os dois factores fixos – temperatura e arejamento – com o objectivo de identificar um eventual efeito conjunto que estes produzem na taxa de crescimento, em média, da espécie *C. acicularis*.

Esta técnica, habitualmente designada por *Anova*, é um modelo que assume como pressupostos a independência dentro das subamostras e que estas provenham de populações normais de variâncias iguais (Pestana, 2003).

Deste modo, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *C. acicularis* para a interacção das diferentes temperaturas (10 e 18°C) com a presença/ausência de arejamento.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie *C. acicularis* para a interacção das diferentes temperaturas (10 e 18°C) com a presença/ausência de arejamento.

3.2. Experiência com diferentes espécies de macroalgas marinhas

As espécies, *Chondracanthus acicularis*, *Scinaia furcellata*, *Lomentaria articulata*, *Gracilaria gracilis*, *Stypocaulon scoparium*, *Chondracanthus teedei*, *Gymnogongrus crenulatus* e *Palmaria palmata* foram colhidas numa praia rochosa situada no norte de Portugal (Mindelo, Vila do Conde) (41°19'N, 8°44'W) em Fevereiro de 2008 em função da hora da baixa-mar, de acordo com as tabelas disponibilizadas *on-line* pelo Instituto Hidrográfico ([www. hidrografico.pt](http://www.hidrografico.pt)).

No laboratório, procedeu-se à limpeza das algas com água do mar filtrada e betadine a 10% durante 30 segundos. *Palmaria palmata* apenas foi limpa com água do mar filtrada, pois considerou-se que esta era muito frágil para ser submetida ao tratamento com betadine. As algas foram colocadas em matrizes de 1L numa câmara de ambiente controlado à temperatura de 15°C em meio VSE, fotoperíodo neutro (12D:12N) e aproximadamente 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante uma semana, de modo a aclimatarem antes do início da experiência.

Este ensaio teve como objectivo determinar a taxa de crescimento, em média, de 8 espécies diferentes ao serem submetidas a um fotoperíodo neutro (12D:12N) e a uma temperatura de 15°C em meio VSE.

Aquando o início da experiência foi utilizado um matraz (n=1), com capacidade de 1L, com meio VSE para cada uma das espécies, numa câmara de ambiente controlado à temperatura de 15°C, fotoperíodo neutro (12D:12N) e aproximadamente 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3. *Stypocaulon scoparium*

As experiências com esta espécie foram realizadas nas condições descritas no quadro 2. Os parâmetros ambientais aí apresentados foram mantidos constantes durante as várias experiências, excepto naquelas em que o parâmetro em questão estava a ser testado. Nesses casos, as condições variáveis estão devidamente apresentadas na secção de texto correspondente.

Condições	Condições em que as experiências decorreram
Fotoperíodo	Neutro (12D:12N)
Temperatura	15°C
Arejamento	Arejamento de fundo suave
Intensidade luminosa	150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Tipo de meio	VSE
N.º de replicados	N=3
Capacidade dos matrizes	1 L

QUADRO 2. Diferentes condições testadas nas experiências realizadas com a alga *S. scoparium*.

A biomassa de *S. scoparium* utilizada para esta experiência era proveniente da experiência anterior, de modo que apenas foi necessário aclimatar a alga durante uma semana em três câmaras de ambiente controlado às temperaturas de 10, 15 e 20°C, fotoperíodo neutro e diferentes intensidades luminosas (50 e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.3.1. Determinação da taxa de crescimento da *Stypocaulon scoparium* a diferentes intensidades luminosas e na presença versus ausência do meio VSE

Este ensaio teve como objectivo avaliar a taxa de crescimento da espécie *Stypocaulon scoparium* à temperatura de 15°C com diferentes intensidades luminosas (50 e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na presença/ausência do meio VSE com uma densidade de cultivo de 0,5 g pf L⁻¹.

Para cada intensidade luminosa usou-se ainda um matraz de controlo apenas com água do mar, isto é, no qual não se adicionaram os nutrientes de enriquecimento do meio VSE e que cuja renovação era só com água do mar.

3.3.1.1. Análise estatística

Para verificar se a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* é igual para as duas densidades de fluxo de fotões na presença ou não do meio VSE ao longo dos dias, realizou-se o teste estatístico *teste-t* (paramétrico) para duas condições independentes. Com base nestas premissas, definiram-se as seguintes hipóteses nulas:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para a presença ou ausência do meio para a intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo dos dias.

VS

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para a presença ou ausência do meio para a intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo dos dias.

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para a presença ou ausência do meio para a intensidade luminosa de 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo dos dias.

VS

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para a presença ou ausência do meio para a intensidade luminosa de 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo dos dias.

Após ambos os factores terem sido testados individualmente através do *teste-t*, recorreu-se à análise da variância a mais de um factor. Sendo que neste estudo o propósito será o de analisar simultaneamente os dois factores fixos – intensidade luminosa e ausência/presença de meio – com o objectivo de identificar um eventual efeito conjunto que estas produzem na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium*.

Deste modo, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para a interação das diferentes intensidades luminosas (50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com a presença/ausência de meio.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* para a interação das diferentes intensidades luminosas (50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com a presença/ausência de meio.

3.3.2. Determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes temperaturas e intensidades luminosas

Este ensaio teve como objectivo avaliar a taxa de crescimento, em média, da espécie *Stypocaulon scoparium* em três câmaras de ambiente controlado às temperaturas de 10, 15 e 20°C e com diferentes intensidades luminosas (50 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à densidade de cultivo de 0,5 g pf L⁻¹.

3.3.2.1. Análise estatística

Para verificar se a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* é igual quando submetida a diferentes temperaturas (10, 15 e 20°C) e quando submetida a diferentes intensidades luminosas (50 ou 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ao longo dos dias, um conjunto de hipóteses foram formuladas e posteriormente testadas.

Realizou-se um teste paramétrico (*teste-t*), para duas condições independentes para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as duas intensidades luminosas ao longo dos dias.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as duas intensidades luminosas ao longo dos dias.

Realizou-se uma ANOVA - análise de variância com um factor - para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium para as três temperaturas ao longo dos dias.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium para as três temperaturas ao longo dos dias.

Após o teste individual de ambos os factores, recorreu-se à análise da variância a mais de um factor. Neste método o propósito será o de analisar simultaneamente os dois factores fixos – temperatura e intensidades luminosas – com o objectivo de identificar um eventual efeito conjunto que estas produzam na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium*. Deste modo, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium para a interacção das diferentes temperaturas (10, 15 e 20°C) com as diferentes intensidades luminosas.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie, em média, da espécie S. scoparium para a interacção das diferentes temperaturas (10, 15 e 20°C) com as diferentes intensidades luminosas.

3.3.3. Determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes salinidades

Indivíduos da espécie *S. scoparium* foram recolhidos numa praia rochosa situada no norte de Portugal (Aguda) (38° 51' 18" N; 9° 27' 12.37" W) em Julho de 2008 em função da hora da baixa-mar, de acordo com as tabelas disponibilizadas *online* pelo Instituto Hidrográfico (www.hidrografico.pt). As algas foram colocadas em sacos de plástico e imediatamente transportadas para o laboratório em malas térmicas.

Uma vez no laboratório procedeu-se à limpeza das algas com água do mar e foram colocadas em matrizes de 2L em câmaras de ambiente controlado à temperatura de 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de modo a aclimatarem antes do início da experiência.

Este ensaio teve como objectivo avaliar a taxa de crescimento, em média, da espécie *Stypocaulon scoparium*, quando cultivada a diferentes salinidades: 0, 10, 20, 36 e 46 ppm.

Aquando o início da experiência, cada um dos matrizes a 0 ppm foi preenchido com 1L de água destilada enquanto para as salinidades a 10 e 20 ppm todas as semanas diluía-se a água salgada em água destilada. Para a salinidade de 36 ppm utilizou-se a água salgada disponível no laboratório e para a salinidade de 46 ppm acrescentou-se cloreto de sódio (NaCl) em quantidade suficiente para atingir o valor pretendido. Em todos os matrizes foram colocados 0,3 g pf L⁻¹ de alga *S. scoparium* juntamente com as soluções de enriquecimento para obter meio VSE.

No decorrer da experiência realizaram-se pesagens duas vezes por semana, para registo do peso fresco, com renovações do meio VSE e mantendo a respectiva salinidade para cada condição.

Durante o ensaio, nos dias das pesagens, mediu-se a salinidade e o pH, com o auxílio do equipamento WTW Multi 340i.

3.3.3.1. Análise estatística

Recorreu-se à análise de variância com o objectivo de avaliar o efeito das diferentes salinidades na taxa de crescimento ao longo dos dias. Com base nestas premissas, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças para a taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium entre as diferentes salinidades (0, 10, 20, 36 e 46 ppm).

vs

H₁: Existem diferenças para a taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium entre as diferentes salinidades (0, 10, 20, 36 e 46 ppm).

De seguida e para verificar entre quais os pares de salinidades que ocorrem diferenças estatisticamente significativas procedeu-se ao teste de *Tukey* (os detalhes do cálculo do teste de *Tukey* são descritos por Zar (1999)).

3.3.4. Determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes densidades de cultivo e intensidades luminosas

As algas (provenientes da experiência anterior – 3.3.3) foram colocadas em matrizes de 2 L em câmaras de ambiente controlado à temperatura de 15°C, fotoperíodo neutro (12D:12N) e intensidades luminosas de 50 e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de modo a aclimatarem às novas condições antes do início da experiência.

Este ensaio teve como objectivo avaliar a taxa de crescimento, em média, da espécie *Stypocaulon scoparium*, quando cultivada a diferentes densidades: 0,1; 0,3; 0,6; 1,5 e 3 g/L e diferentes intensidades luminosas (50 e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A cada 3-4 dias pesaram-se as algas e reduziu-se a biomassa para a densidade de cultura definida inicialmente.

3.3.4.1. Análise estatística

Para verificar se a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* é igual quando submetida a diferentes densidades de cultivo (0,1; 0,3; 0,6; 1,5 e 3 g/L) e quando submetida a diferentes intensidades luminosas (50 ou 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ao longo dos dias, um conjunto de hipóteses foram formuladas e posteriormente testadas.

Realizou-se um teste paramétrico (*teste-t*), para duas condições independentes para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as duas intensidades luminosas ao longo dos dias.

vs

H₁: Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as duas intensidades luminosas ao longo dos dias.

Realizou-se uma ANOVA - análise de variância com um factor - para testar a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as diferentes densidades de cultivo ao longo dos dias.

vs

H₁: *Existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium para as diferentes densidades de cultivo ao longo dos dias.*

Após o teste individual a ambos os factores, recorreu-se à análise da variância a mais de um factor. Neste método o propósito será o de analisar simultaneamente os dois factores fixos – intensidade luminosa e densidade de cultivo – com o objectivo de identificar um eventual efeito conjunto que estas produzam na taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium*. Deste modo, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: *Não existem diferenças na taxa de crescimento, em média, da espécie S. scoparium para a interacção das diferentes densidades de cultivo (0,1; 0,3; 0,6; 1,5 e 3 g/L) com as diferentes intensidades luminosas.*

vs

H₁: *Existem diferenças na taxa de crescimento da espécie, em média, da espécie S. scoparium para a interacção das diferentes densidades de cultivo (0,1; 0,3; 0,6; 1,5 e 3 g/L) com as diferentes intensidades luminosas.*

De seguida e para verificar entre quais os pares de densidades que ocorrem diferenças estatisticamente significativas procedeu-se ao teste de *Tukey*.

3.3.5. Avaliação da remoção de nutrientes (N e P) da água por *S. scoparium*

Este ensaio teve como objectivo avaliar a remoção de nutrientes pela espécie *Stypocaulon scoparium*. As algas (provenientes da experiência anterior – 3.3.3) foram aclimatadas durante uma semana numa câmara em ambiente controlado à temperatura de 15°C, fotoperíodo neutro (12D:12N) e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sendo que estavam divididas em três matrizes de 1L, dois deles com meio VSE e um deles com todas as soluções de VSE menos a fonte de azoto (N), com o intuito de privar as algas de azoto (N) (algas “starved”). Nas restantes condições a fonte de N foi a normalmente usada em meio VSE - Nitrato de Sódio (NaNO_3).

Durante todas as experiências de remoção de nutrientes usou-se água do mar artificial. Além disso, todo o material de vidro utilizado foi limpo com ácido clorídrico (HCL) para prevenir possíveis contaminações.

As soluções stock de nutrientes prepararam-se da seguinte forma:

- 1) 5mM Na₂HPO₄.12H₂O – 1,709g/1000mL (guardar no frigorífico);
- 2) 5mM Na₂NO₃ – 0,2125g/500mL (preparar fresco cada dia de experiência);
- 3) 5mM NH₄Cl – 0,13375g/500mL (preparar fresco cada dia de experiência).

Após a semana de aclimação, as algas foram distribuídas por matrizes de 1L com diferentes fontes de N e 2 concentrações, tal como descrito no quadro 3. Foram testadas condições em que a amónia (NH₄⁺) e os nitratos (NO₃⁻) estavam simultaneamente presentes no meio e condições em que apenas uma das formas, NH₄⁺ ou NO₃⁻, estava disponível como fonte de N.

Tratamento	Forma de N	Concentração Alta (µmol)	Concentração Baixa (µmol)	Controlo (sem algas)
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺ Alta	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	150+150	---	150+150
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺ Baixa	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	---	30+5	30+5
NH ₄ ⁺ Alta	NH ₄ ⁺	150	---	150
NH ₄ ⁺ Baixa	NH ₄ ⁺	---	5	5
NO ₃ ⁻ Alta	NO ₃ ⁻	150	---	150
NO ₃ ⁻ Baixa	NO ₃ ⁻	---	30	30

QUADRO 3. Concentrações utilizadas (em µmol) para as 2 formas de N.

Em todas as condições, o fósforo na forma de PO₄³⁺ foi fornecido numa proporção N: P de 10:1. As concentrações baixas (30 µmol de NO₃⁻ e 5 µmol de NH₄⁺) utilizadas na experiência são idênticas às registadas no oceano.

No primeiro dia da experiência fizeram-se amostragens mais frequentes de água em algas privadas de N (“starved”) e em algas saturadas de N. Este procedimento foi efectuado para os tratamentos de altas concentrações de N existindo 3 matrizes (n=3) por condição com algas saturadas de N (NO₃⁻ alto, NH₄⁺ alto e NO₃⁻ + NH₄⁺ alto) e 3 matrizes por condição (n=3) com algas “starved” (NO₃⁻ alto e NH₄⁺ alto). Nestes tratamentos foram removidas amostras de água (10ml) em tempos definidos (0h-amostra inicial, 240min e 24h).

Para os tratamentos com algas saturadas de N também foram utilizados dois matrizes de controlo (sem biomassa) para cada tratamento. Em todos os matrizes, excepto os de controlo, a densidade de algas usada foi de $1,0 \text{ g pf L}^{-1}$. Os matrizes tinham capacidade de 1L e arejamento de fundo suave numa câmara de ambiente controlado à temperatura 15°C , em luz contínua durante as primeiras 24 horas e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após 24h terminou-se o ensaio com as algas “starved”.

A experiência continuou sem as algas “starved” para os tratamentos de altas e baixas concentrações de N (quadro 3) com fotoperíodo neutro (12D:12N). Para cada período de crescimento, aquando a mudança de meio procedeu-se à colheita de uma amostra de meio inicial de cada um dos tratamentos e a uma amostra de meio final de cada um dos matrizes. No final de cada período de crescimento (3-4 dias), pesaram-se as algas, reduziu-se a biomassa para a densidade de cultura definida inicialmente ($1,0 \text{ g pf L}^{-1}$) e renovou-se o meio de cultura em todas as condições.

As amostras iniciais e finais foram congeladas e posteriormente analisadas no autoanalisador (San⁺⁺ Continuous Flow Analyzer, da Skalar).



FIGURA 3. Autoanalisador (San⁺⁺ Continuous Flow Analyzer) utilizado na análise das amostras.

A balança utilizada para todas as pesagens com a espécie *S. scoparium* foi uma balança digital AND HF: 2000g; max=2100g, e d=0,01g).

3.3.5.1. Análise estatística

Para verificar se na experiência da cinética existem diferenças entre os diferentes tratamentos foram formuladas um conjunto de hipóteses e posteriormente testadas. Realizaram-se testes paramétricos (*teste-t*), para duas condições independentes para testar as seguintes hipóteses nulas:

H₀: Não existem diferenças na concentração de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- “starved” e o tratamento NH_4^+ “starved” para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

vs

H₁: Existem diferenças na concentração de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- “starved” e o tratamento NH_4^+ “starved” para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

H₀: Não existem diferenças na concentração de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e o tratamento NH_4^+ para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

vs

H₁: Existem diferenças na concentração de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e o tratamento NH_4^+ para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

H₀: Não existem diferenças na concentração de NO_3^- ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e o tratamento NO_3^- Controlo para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

vs

H₁: Existem diferenças na concentração de NO_3^- ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e no tratamento NO_3^- Controlo para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

H₀: Não existem diferenças na concentração de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NH_4^+ e o tratamento NH_4^+ Controlo para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

vs

H₁: Existem diferenças na concentração de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NH_4^+ e o tratamento NH_4^+ Controlo para o tempo 0, 240 minutos e 1440 minutos.

Posteriormente, recorreu-se ao teste paramétrico (*teste-t*), para duas condições independentes, com o objectivo de avaliar se existem diferenças entre o efeito das diferentes concentrações de nutrientes ao longo dos dias.

Com base nestas premissas, definiu-se as seguintes hipóteses nulas:

H₀: Não existem diferenças entre a concentração inicial de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) para o tratamento de NO_3^- inicial e o tratamento NH_4^+ inicial ao longo do tempo.

VS

H₁: Existem diferenças entre a concentração inicial de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) para o tratamento de NO_3^- inicial e para o tratamento NH_4^+ inicial ao longo do tempo.

H₀: Não existem diferenças entre a concentração final de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) para o tratamento de NO_3^- final e para o tratamento NH_4^+ final ao longo do tempo.

VS

H₁: Existem diferenças entre a concentração final de NO_3^- e de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) para o tratamento de NO_3^- final e para o tratamento NH_4^+ final ao longo do tempo.

H₀: Não existem diferenças na concentração de NO_3^- ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e o tratamento NO_3^- Controlo ao longo do tempo.

VS

H₁: Existem diferenças na concentração de NO_3^- ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NO_3^- e no tratamento NO_3^- Controlo ao longo do tempo.

H₀: Não existem diferenças na concentração de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NH_4^+ e o tratamento NH_4^+ Controlo ao longo do tempo.

VS

H₁: Existem diferenças na concentração de NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$) entre o tratamento de NH_4^+ e o tratamento NH_4^+ Controlo ao longo do tempo.

Posteriormente, recorreu-se à análise de variância com o objectivo de avaliar o efeito das diferentes concentrações de nutrientes na taxa de crescimento ao longo dos dias. Com base nestas premissas, definiu-se a seguinte hipótese nula:

H₀: Não existem diferenças entre a taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as diferentes concentrações de nutrientes.

vs

H₁: Existem diferenças entre a taxa de crescimento, em média, da espécie *S. scoparium* para as diferentes concentrações de nutrientes.

4. RESULTADOS

4.1. Taxa de crescimento médio da *Chondracanthus acicularis* a diferentes fotoperíodos

O gráfico 1 mostra que *Chondracanthus acicularis* não cresceu durante todo o período em que durou esta experiência para ambos os fotoperíodos. Além disso, os dados apresentaram uma grande variabilidade. Após alguns dias em cultura, observou-se a despigmentação do material. Esta despigmentação iniciou-se sempre na zona de excisão do ápice sendo o seu tempo de ocorrência variável de condição para condição e mesmo dentro de cada matraz da mesma condição. Posteriormente, todos os ápices ficaram totalmente verdes, degenerando.

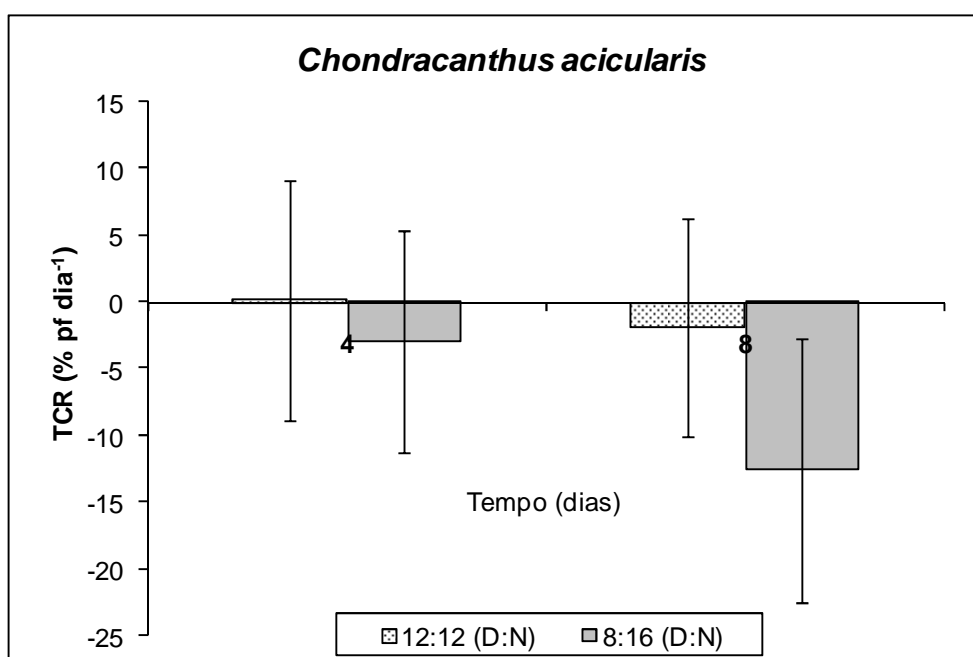


GRÁFICO 1. Evolução da taxa de crescimento (n=4), em média, da espécie *C. acicularis* ao ser submetida a um fotoperíodo neutro (12D:12N) ou a um fotoperíodo curto (8D:16N) para 18°C, meio VSE e 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2. Taxa de crescimento médio da *Chondracanthus acicularis* a diferentes temperaturas e na presença *versus* ausência de arejamento

Esta experiência foi pensada na sequência dos resultados da experiência anterior, para perceber se o arejamento tinha ou não influência na degeneração dos tecidos.

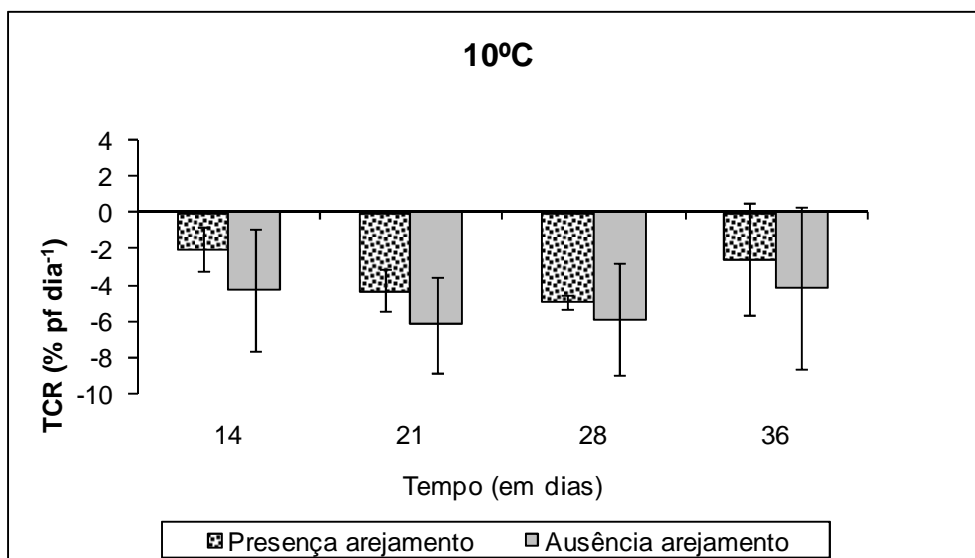


GRÁFICO 2. Evolução da taxa de crescimento (n=3), em média, *C. acicularis* a 10°C na presença ou ausência de arejamento para o meio VSE e 40 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

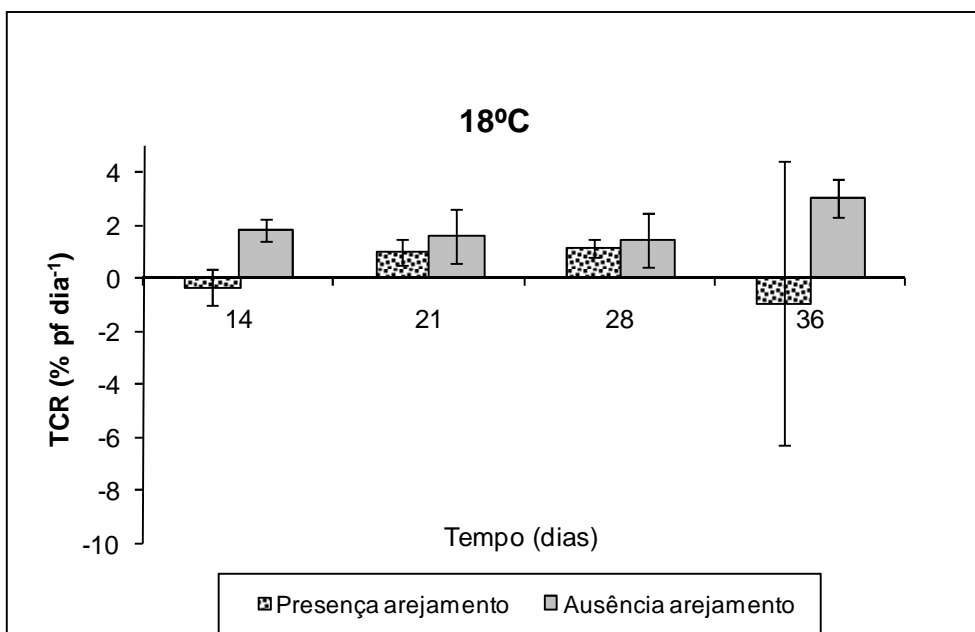


GRÁFICO 3. Evolução da taxa de crescimento (n=3), em média, *C. acicularis* a 18°C na presença ou ausência de arejamento para o meio VSE e 40 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Pela análise do gráfico 2 verifica-se que *C. acicularis* não cresceu durante toda a experiência à temperatura de 10°C. A sua taxa de crescimento médio foi negativa para as duas condições em estudo: presença e ausência de arejamento. Durante toda a experiência foi observada a despigmentação dos ápices em ambos os tratamentos acabando por conduzir a uma cor esverdeada e à degeneração destes.

Pela análise do gráfico 3 verifica-se que a espécie *C. acicularis* sujeita à temperatura de 18°C e na ausência de arejamento apresentou uma taxa de crescimento médio positiva durante toda a experiência. Por outro lado, na presença de arejamento a taxa de crescimento médio foi irregular. O crescimento médio ao longo dos 36 dias de duração da experiência foi de 2% pf dia⁻¹ para 18°C na ausência de arejamento contra 0,05 % pf dia⁻¹ para 18°C na presença de arejamento.

Nesta experiência também foram observados ápices despigmentados que acabaram por se tornar esverdeados. Contudo, esta experiência apresentou taxas de crescimento médio positivas e a despigmentação observada em alguns ápices demorou mais tempo a atingir toda a superfície destes.

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), entre as taxas de crescimento médio para a presença/ausência de arejamento.

Quanto às temperaturas, existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as taxas de crescimento médio para as diferentes temperaturas (10 e 18°C). A taxa de crescimento é significativamente superior aos 18°C.

Por fim, quanto à interação entre as diferentes temperaturas com a presença/ausência de arejamento não existem diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento médio (Anexo 8.1.).

4.3. Taxa de crescimento médio de diferentes espécies de macroalgas marinhas

Através do estudo comparativo das diferentes espécies abaixo mencionadas decidiu-se utilizar a espécie *Stypocaulon scoparium* para posteriores estudos

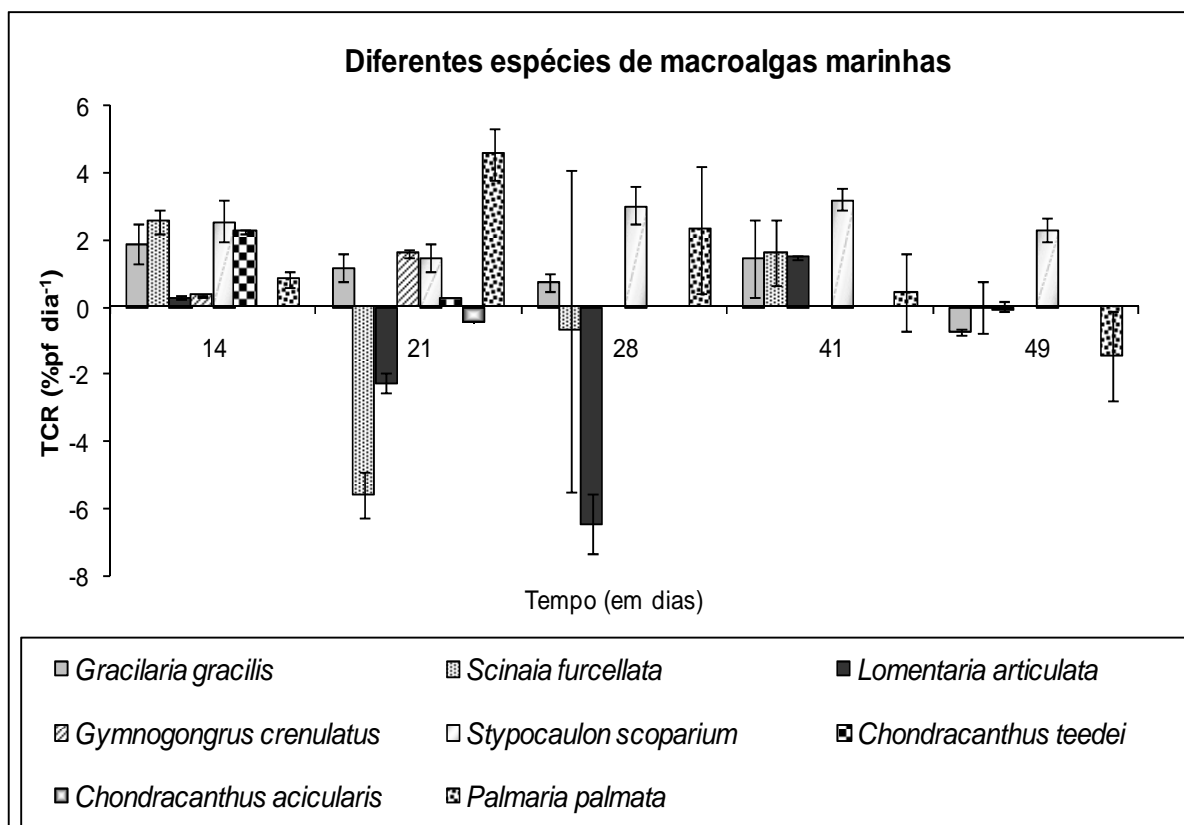


GRÁFICO 4. Evolução da taxa de crescimento, em média, de diferentes espécies de macroalgas marinhas em cultura laboratorial para 15°C, meio VSE, fotoperíodo neutro e 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Pela comparação do crescimento médio, ao longo de todo o estudo e para as condições testadas, *Stypocaulon scoparium* é a espécie que apresenta melhores resultados (Gráfico 4). Esta foi por isso a espécie escolhida para desenvolver os trabalhos seguintes, de forma a perceber se pode integrar sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

Stypocaulon scoparium apresentou uma taxa de crescimento positiva ao longo de toda a experiência, com período de crescimento de aproximadamente 3% dia⁻¹. Esta espécie destacou-se também pela ausência de algas epífitas, crescendo sem

nenhum tipo de problemas. Pelo contrário, todas as outras espécies testadas apresentaram problemas com algas epífitas.

Os indivíduos das espécies *G. crenulatus*, *C. teedei*, *C. acicularis* apresentavam desde o início da experiência um aspecto muito frágil e uma despigmentação nos ápices que acabou por se estender a toda a alga. Estas algas acabaram por ficar totalmente despigmentadas e morreram ao fim de aproximadamente 21 dias em cultura.

Gracilaria gracilis e a *Palmaria palmata* apresentaram taxas de crescimento médio positivas excepto na última semana de experiência. Por seu lado, *Scinaia furcellata* e *Lomentaria articulata* apresentaram taxas de crescimento irregulares, apresentando também alguma despigmentação e acabaram por morrer ao fim de aproximadamente 41 dias em cultura.

4.4. Taxa de crescimento médio da *Stypocaulon scoparium* a diferentes intensidades luminosas e na presença *versus* ausência do meio VSE

A primeira experiência realizada após a selecção de *Stypocaulon scoparium*, teve como objectivo verificar se o meio VSE promovia de forma significativa o crescimento desta espécie, em comparação com o meio sem enriquecimento de nutrientes. Esta verificação deve-se ao facto de o meio VSE ser um meio tipicamente utilizado em culturas de algas vermelhas.

Pela análise dos gráficos 5 e 6 verifica-se que a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* é superior com meio VSE. Por outro lado, na ausência de meio (matraz de controlo) a taxa de crescimento é inferior e irregular. Em meio VSE e para $50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a alga *Stypocaulon scoparium* teve períodos de crescimento superiores a $4\% \text{ pf dia}^{-1}$, enquanto nas culturas de controlo o crescimento nunca foi superior a $1\% \text{ pf dia}^{-1}$. Por outro lado, a $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *S. scoparium* teve períodos de crescimento superiores a $6\% \text{ pf dia}^{-1}$, enquanto nas culturas de controlo o crescimento nunca foi superior a $3\% \text{ pf dia}^{-1}$. O crescimento médio ao longo dos 42 dias de duração da experiência foi de $4\% \text{ pf dia}^{-1}$ a $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contra $3\% \text{ pf dia}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* na presença do meio VSE é superior a $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando comparada com a intensidade mais baixa.

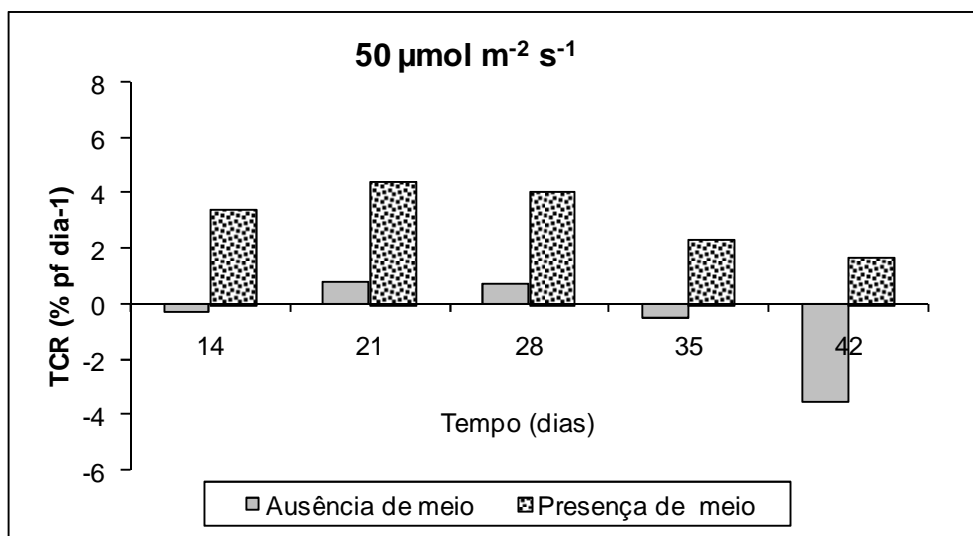


GRÁFICO 5. Evolução da taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* a 15°C e 50 μmol⁻² s⁻¹ na presença/ausência do meio VSE e fotoperíodo neutro.

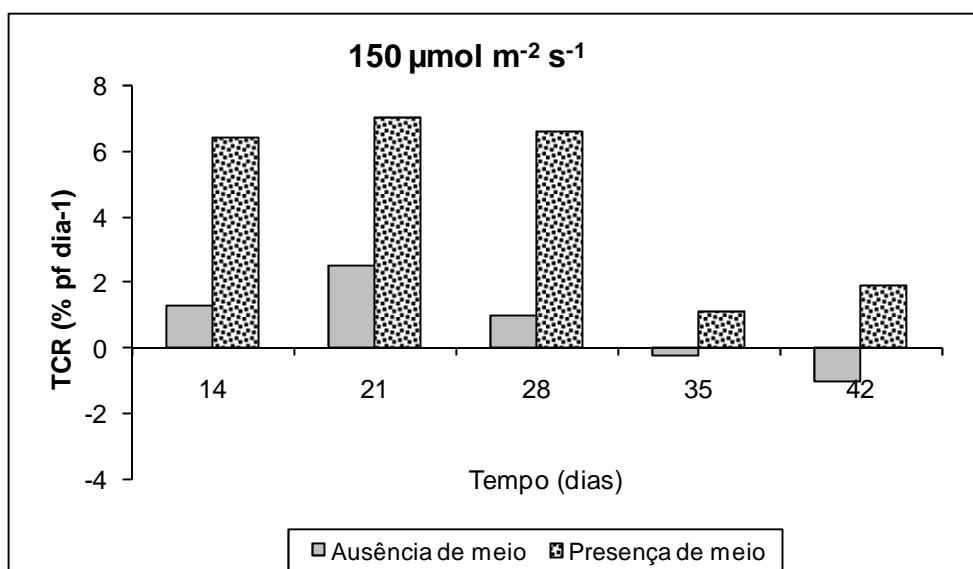


GRÁFICO 6. Evolução da taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* a 15°C e 150 μmol⁻² s⁻¹ na presença/ausência do meio VSE e fotoperíodo neutro.

Verifica-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na taxa de crescimento médio da espécie *S. scoparium* com ou sem meio VSE. Concluiu-se que para 15°C e para ambas as intensidades luminosas (50 μmol fotões m⁻² s⁻¹ e 150 μmol fotões m⁻² s⁻¹) a taxa de crescimento é significativamente superior para as algas com meio VSE (Anexo 8.2.).

4.5. Taxa de crescimento médio da *Stypocaulon scoparium* a diferentes temperaturas e intensidades luminosas

Através da análise dos gráficos 7, 8 e 9 verifica-se que, para todas as temperaturas testadas, a média das taxas de crescimento de *S. scoparium* ao longo do tempo é sempre superior na intensidade luminosa mais elevada.

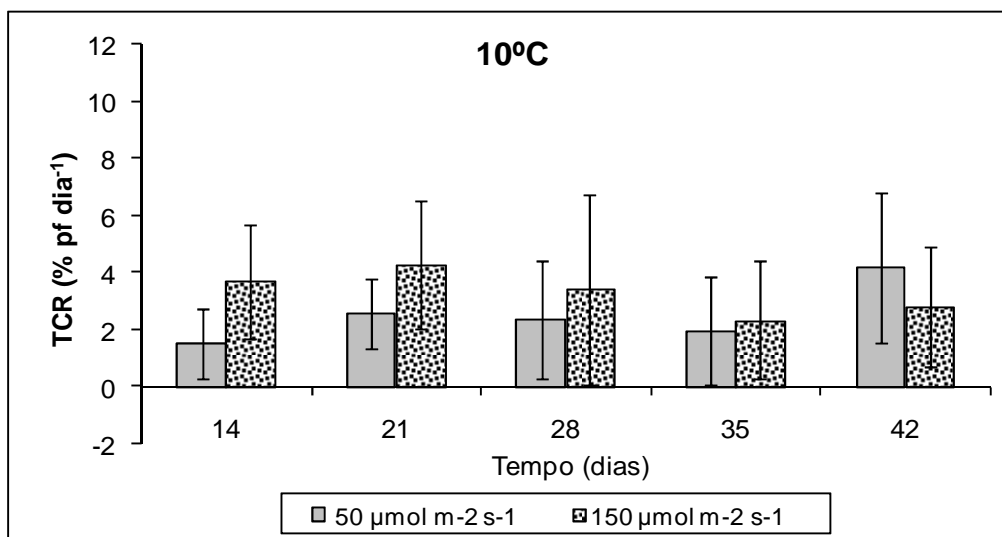


GRÁFICO 7. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie *S. scoparium* a 10° C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.

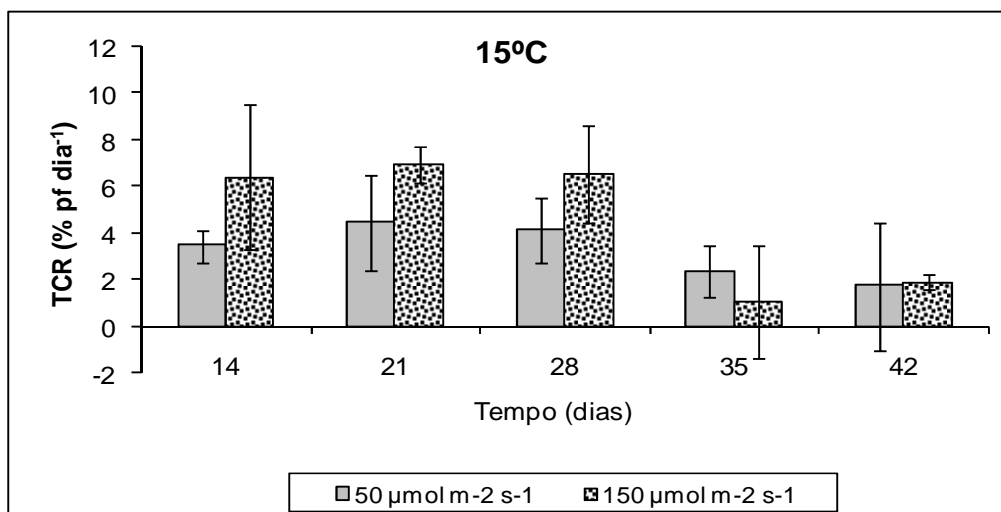


GRÁFICO 8. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie *S. scoparium* a 15°C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.

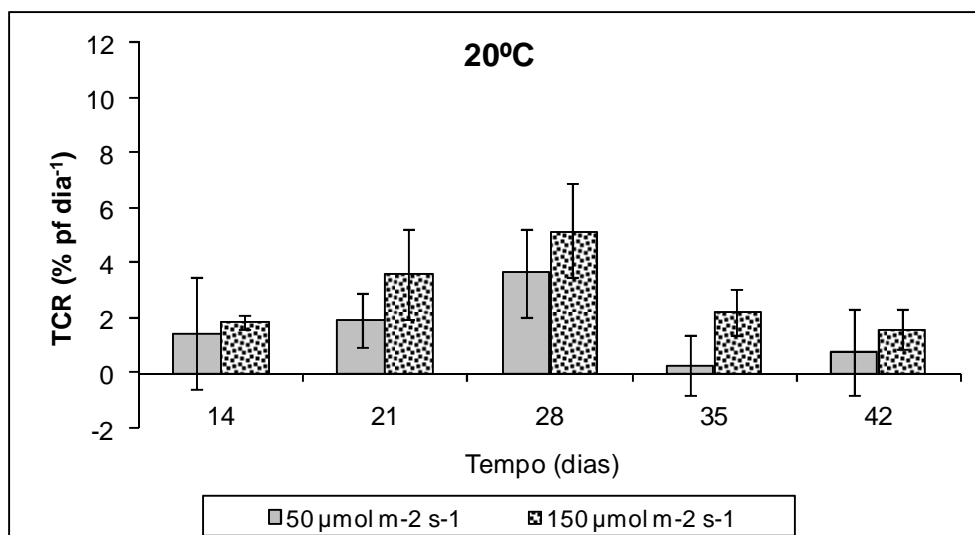


GRÁFICO 9. Evolução da taxa de crescimento (n=3) da espécie *S. scoparium* a 20°C, diferentes intensidades luminosas, meio VSE e fotoperíodo neutro.

O crescimento médio ao longo dos 42 dias de duração da experiência para 10°C foi de 2% pf dia⁻¹ a 50 µmol fotões m⁻² s⁻¹ e 2,7% pf dia⁻¹ a 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹. Para a temperatura de 15°C o crescimento médio foi superior em ambas as intensidades luminosas, 2,9% pf dia⁻¹ a 50 µmol fotões m⁻² s⁻¹ e 4,4% pf dia⁻¹ a 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹. Finalmente, a 20°C o crescimento médio ao longo de toda a experiência foi de 1,4% pf dia⁻¹ a 50 µmol fotões m⁻² s⁻¹ e 2,4% pf dia⁻¹ a 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹.

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as taxas de crescimento da espécie *Stypocaulon scoparium* para as diferentes temperaturas (10°, 15° e 20°C). Quanto às intensidades luminosas (50 e 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹), é possível concluir, que também não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as taxas de crescimento médias da espécie *S. scoparium*. No entanto, a taxa de crescimento a 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹ é superior à registada a 50 µmol fotões m⁻² s⁻¹. Por fim, quanto à interação entre as diferentes temperaturas com as diferentes intensidades luminosas não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as taxas de crescimento médio (Anexo 8.3.).

4.6. Taxa de crescimento médio da *Stypocaulon scoparium* a diferentes salinidades

Através da análise do gráfico 10 verifica-se que a taxa de crescimento médio de *S. scoparium* a salinidades entre 0 ppm e 10 ppm não apresenta uma tendência clara ao longo do tempo de duração da experiência. A 0ppm o crescimento médio é essencialmente negativo, com excepção de um período, mas com grande variabilidade entre réplicas. A 10 ppm a taxa de crescimento médio da *S. scoparium* varia muito, registando-se períodos de crescimento positivo e períodos de decréscimo da biomassa. Às salinidades de 20, 36 e 46 ppm a taxa de crescimento médio da alga é sempre positiva. O crescimento médio ao longo dos 17 dias de duração da experiência foi de 2,7% pf dia⁻¹ a 20 ppm, 2,5% pf dia⁻¹ a 36 ppm e 1,7% pf dia⁻¹ a 46 ppm.

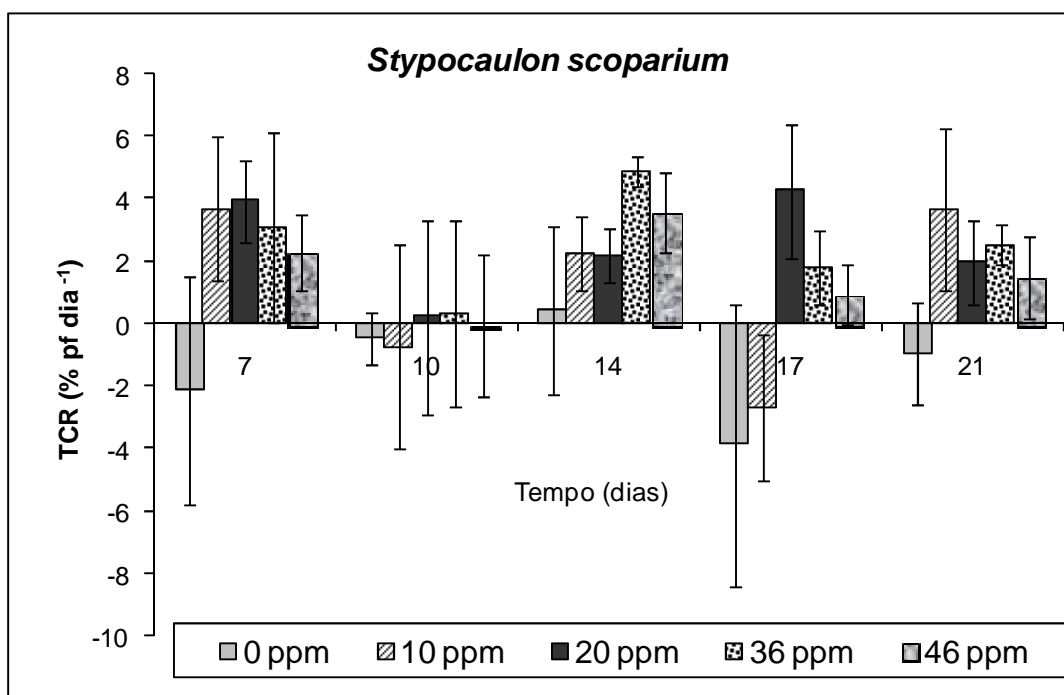


GRÁFICO 10. Evolução da taxa de crescimento ao longo do tempo, em média (n=3), de *S. scoparium* em diferentes salinidades, meio VSE, 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo neutro a 15°C.

Pela análise dos resultados provenientes da aplicação dos testes estatísticos, pode-se concluir que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), na taxa de crescimento média da espécie *S. scoparium* a diferentes salinidades. Sendo a taxa de crescimento significativamente superior a 20 e 36 ppm em comparação com as salinidades de 0 e 10 ppm (Anexo 8.4.).

4.7. Taxa de crescimento médio da *Stypocaulon scoparium* a diferentes densidades de cultivo e intensidades luminosas

Através do gráfico 11 e 12 verifica-se que o crescimento médio ao longo dos 11 dias de duração da experiência foi de 6,8% pf dia⁻¹ a 0,1 g pf L⁻¹, de 4,2% pf dia⁻¹ a 0,3 g pf L⁻¹, de 1,3% pf dia⁻¹ a 0,6 g pf L⁻¹, de 1,9% pf dia⁻¹ a 1,5 g pf L⁻¹ e 0,7% pf dia⁻¹ a 3 g pf L⁻¹ para uma intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quanto ao crescimento médio a 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificaram-se taxas de 5% pf dia⁻¹ a 0,1 g pf L⁻¹, de 4,3% pf dia⁻¹ a 0,3 g pf L⁻¹, de 1,8% pf dia⁻¹ a 0,6 g pf L⁻¹, de 2,4% pf dia⁻¹ a 1,5 g pf L⁻¹ e 1,4% pf dia⁻¹ a 3 g pf L⁻¹.

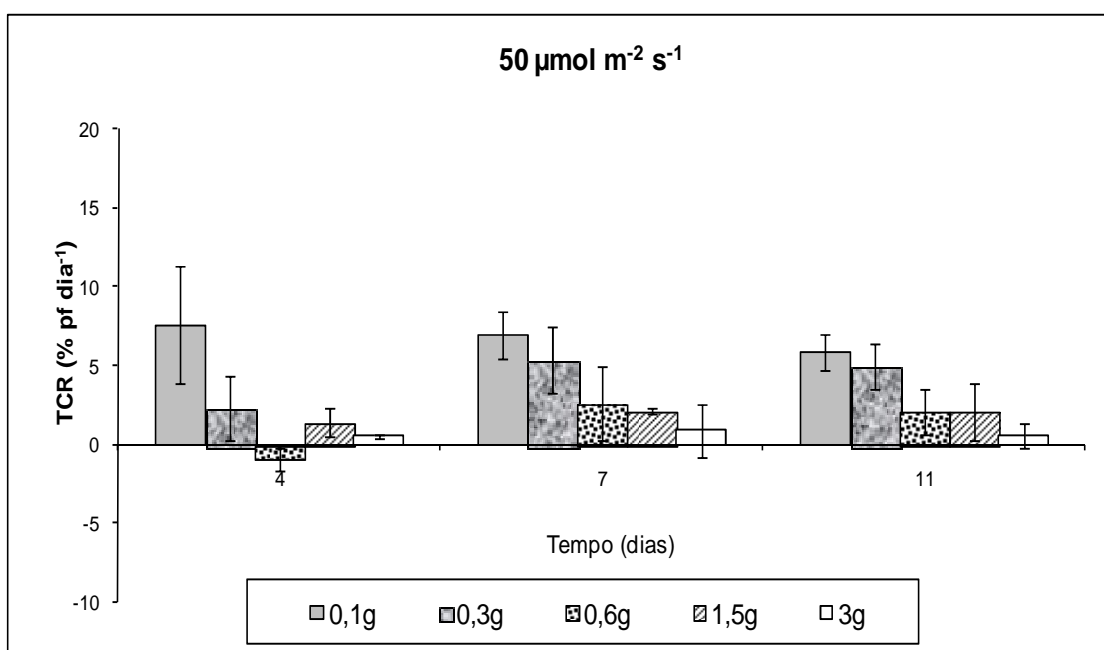


GRÁFICO 11. Evolução da taxa de crescimento ($n = 3$) da espécie *S. scoparium* com meio VSE, a 15°C e com fotoperíodo neutro ao ser submetida a diferentes densidades de cultivo (g pf L⁻¹) a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

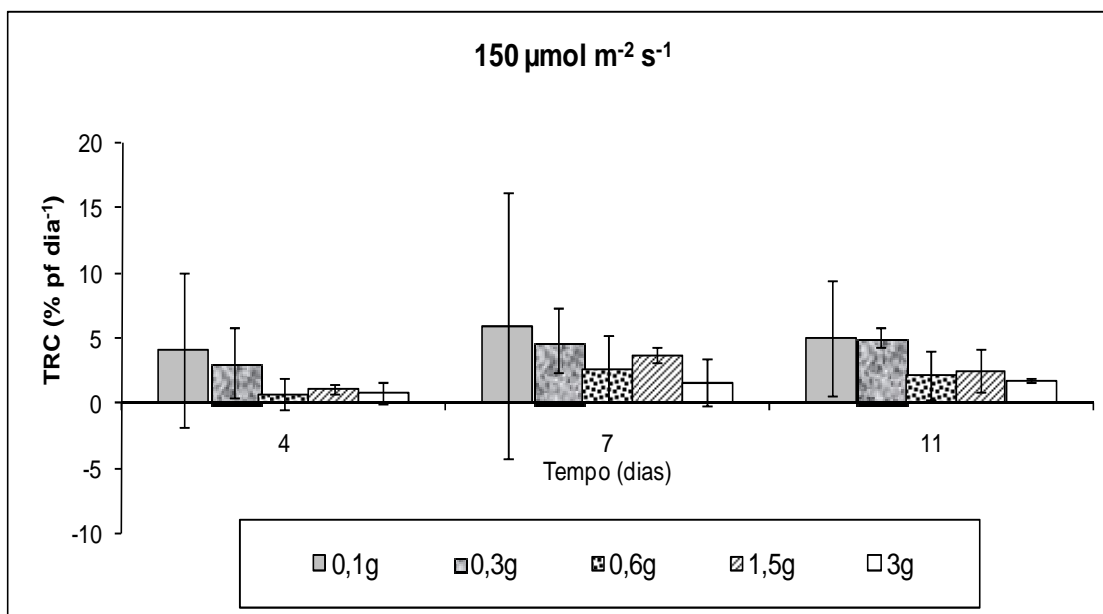


GRÁFICO 12. Evolução da taxa de crescimento ($n = 3$) da espécie *S. scoparium* com meio VSE, a 15°C e com fotoperíodo neutro ao ser submetida a diferentes densidades de cultivo (g pf L^{-1}) a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

É notório pela análise dos gráficos 11 e 12 que a taxa de crescimento médio de *S. scoparium* é maior à densidade de cultivo de $0,1 \text{ g pf L}^{-1}$, durante todo o período de duração da experiência. A esta densidade, registou-se como máximo de um período de crescimento uma taxa de $7,6\% \text{ pf dia}^{-1}$, a $50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Observa-se também um decréscimo da taxa de crescimento com o aumento da densidade de cultivo. Também para as condições de maior intensidade luminosa, $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se verifica um maior crescimento com uma densidade de $0,1 \text{ g pf L}^{-1}$, registando-se como máximo de um período de crescimento uma taxa de $5,9\% \text{ pf dia}^{-1}$. No entanto, para esta intensidade luminosa o decréscimo da taxa de crescimento com o aumento da densidade de cultivo não é tão notório. De facto, às densidades de $0,3$ e 3 g pf L^{-1} a taxa de crescimento médio aumenta ao longo de toda a experiência.

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), entre as taxas de crescimento médio para as diferentes intensidades luminosas. Quanto às densidades de cultivo, é possível concluir que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as taxas de crescimento médio para as diferentes densidades de cultivo. Existem diferenças entre a densidade de $0,1 \text{ g pf L}^{-1}$ e todas as densidades excepto para $0,3 \text{ g pf L}^{-1}$. Por fim, quanto à interação entre as diferentes densidades de cultivo com as diferentes intensidades luminosas não

existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as taxas de crescimento médio (Anexo 8.5.).

4.8. Cinética de remoção de nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-}) do meio de cultivo

4.8.1. Tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ versus tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ “starved”

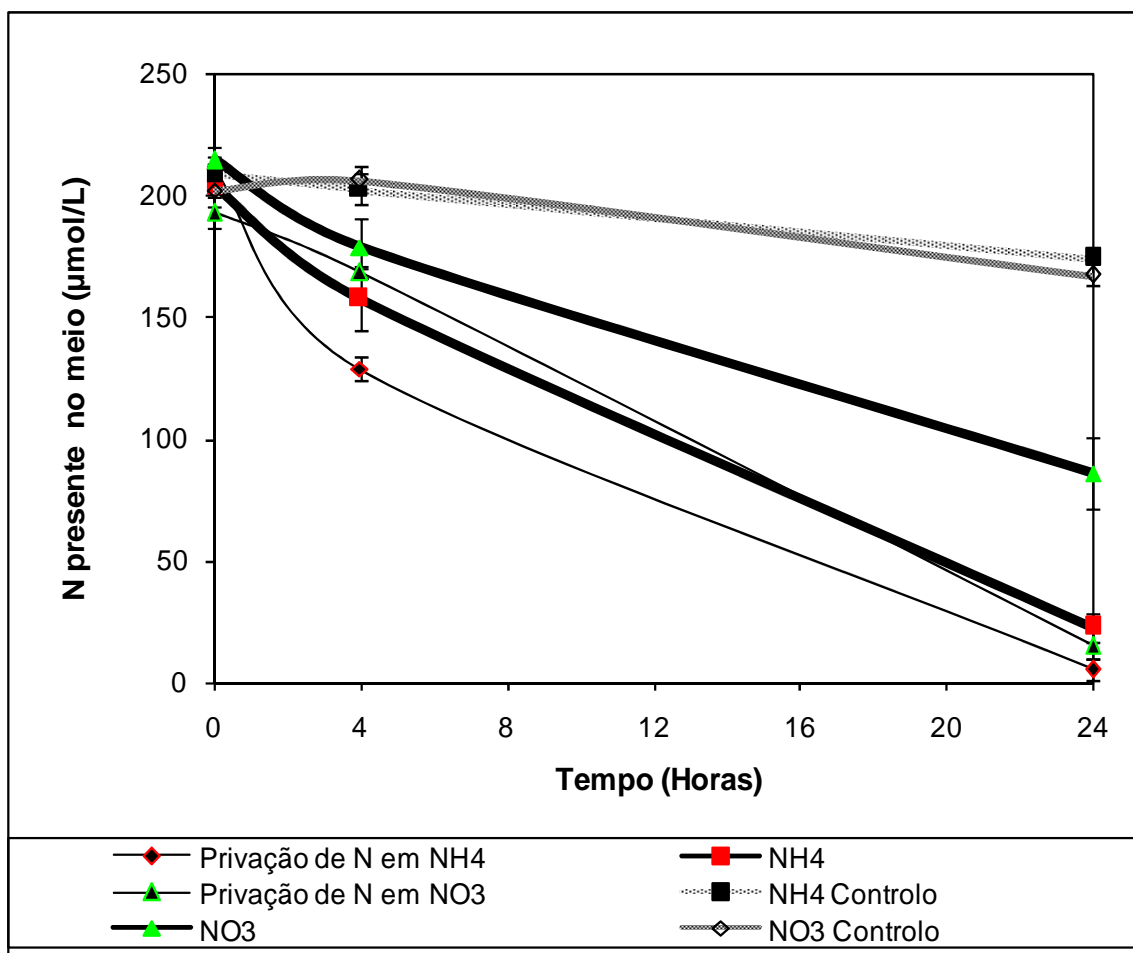


GRÁFICO 13. Evolução da quantidade média ($n=3$) de diferentes formas de N presentes no meio, durante 24 horas em luz contínua, a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C através de quatro tratamentos diferentes (tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ vs tratamento com NO_3^- e tratamento com NH_4^+ em que as algas foram sujeitas previamente à privação de N).

Pela análise do gráfico 13 verifica-se que as quantidades de NO_3^- e NH_4^+ presentes na água ao tempo 0, nos tratamentos para algas privadas de N, foram de

193 $\mu\text{mol/L}$ e 210 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Após as primeiras 4 horas verifica-se uma remoção de aproximadamente 24 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- e 82 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ . Após 24 horas foram removidos do meio 205 μmol de NH_4^+ e 178 μmol de NO_3^- . O valor removido corresponde a 97% de NH_4^+ e 92% de NO_3^- do total disponível inicialmente. As concentrações iniciais, sendo mais elevadas do que o inicialmente previsto, não são estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$), permitindo assim a sua comparação. Através do tratamento estatístico realizado verificou-se que às 4 horas registaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os dois tratamentos, sendo que a remoção de NH_4^+ é significativamente superior à remoção de NO_3^- . Contudo, às 24 horas de experiência voltaram a não se registar diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambos os tratamentos (Anexo 8.6.).

Quanto aos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ em que as algas não foram privadas de N (Gráfico 13) registou-se que as quantidades na água no tempo zero foram de 214 e 204 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Após as primeiras 4 horas verifica-se uma remoção de aproximadamente 36 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- e 47 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ . É importante verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre os matrizes com algas e os matrizes de controlo (sem algas) uma vez que nos permite concluir se a remoção de NO_3^- e NH_4^+ se deve ou não à presença das algas. A análise estatística confirmou que no tempo zero e às 4 horas de experiência não existiram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre a remoção de NO_3^- por parte das algas e por parte dos matrizes de controlo. Às 24 horas verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os matrizes de controlo e os matrizes com algas, isto é, a quantidade de NO_3^- removida foi significativamente superior nos matrizes com algas (128 μmol) do que nos matrizes sem algas (35 μmol) (Anexo 8.6.). Quanto à remoção de NH_4^+ verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para o tempo zero entre os matrizes com algas e os matrizes de controlo. Por outro lado, às 4 horas e às 24 horas de experiência existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os matrizes de controlo e os matrizes com algas, sendo a remoção de NH_4^+ nos matrizes de controlo significativamente inferior (Anexo 8.6.).

Pode concluir-se que nos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ em que as algas não tinham sido previamente privadas de N a preferência de *S. scoparium* por NH_4^+ é clara. Após 24 horas foram removidos da água 182 μmol de NH_4^+ e 128 μmol de NO_3^- . O valor removido corresponde a 89% de NH_4^+ e 60% de NO_3^- do total disponível inicialmente. Quanto à análise estatística, não existiram diferenças estatisticamente

significativas ($p > 0,05$) nas concentrações iniciais de ambas as formas de N. Às 4 horas de experiência continuou a não existir diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as duas concentrações. Contudo, às 24 horas de experiência já foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambas as formas de N, sendo significativamente superior a quantidade de NH_4^+ removida da água em comparação com a de NO_3^- (Anexo 8.6.).

Por fim, verifica-se ainda que ao fim das 24 horas as algas previamente privadas de N removeram uma maior quantidade de NH_4^+ e NO_3^- (205 μmol e 178 μmol) que as algas que não foram privadas de N (182 μmol e 128 μmol) e que a quantidade de NH_4^+ removida foi superior para ambas as situações.

4.8.2. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$

Pela análise do gráfico 14 verifica-se que as quantidades de NO_3^- e NH_4^+ presentes em simultâneo na água aos 0 minutos foram de 197 $\mu\text{mol/L}$ e 203 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Mais uma vez salienta-se que embora estas concentrações sejam mais elevadas do que as inicialmente previstas, não são significativamente diferentes e portanto permitem a comparação da remoção em simultâneo das duas formas de N. A remoção das duas formas de N não segue um padrão semelhante. Após 4 horas de experiência verifica-se um aumento da quantidade de NO_3^- no meio superior à concentração inicial e uma remoção de aproximadamente 28 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ . Finalmente, após 24 horas a preferência de *S. scoparium* por NH_4^+ é clara. No final deste tempo foram removidos do meio 176 μmol de NH_4^+ e apenas 43 μmol de NO_3^- . No caso do NH_4^+ o valor removido corresponde a 87% do total disponível inicialmente contra apenas 22% de NO_3^- .

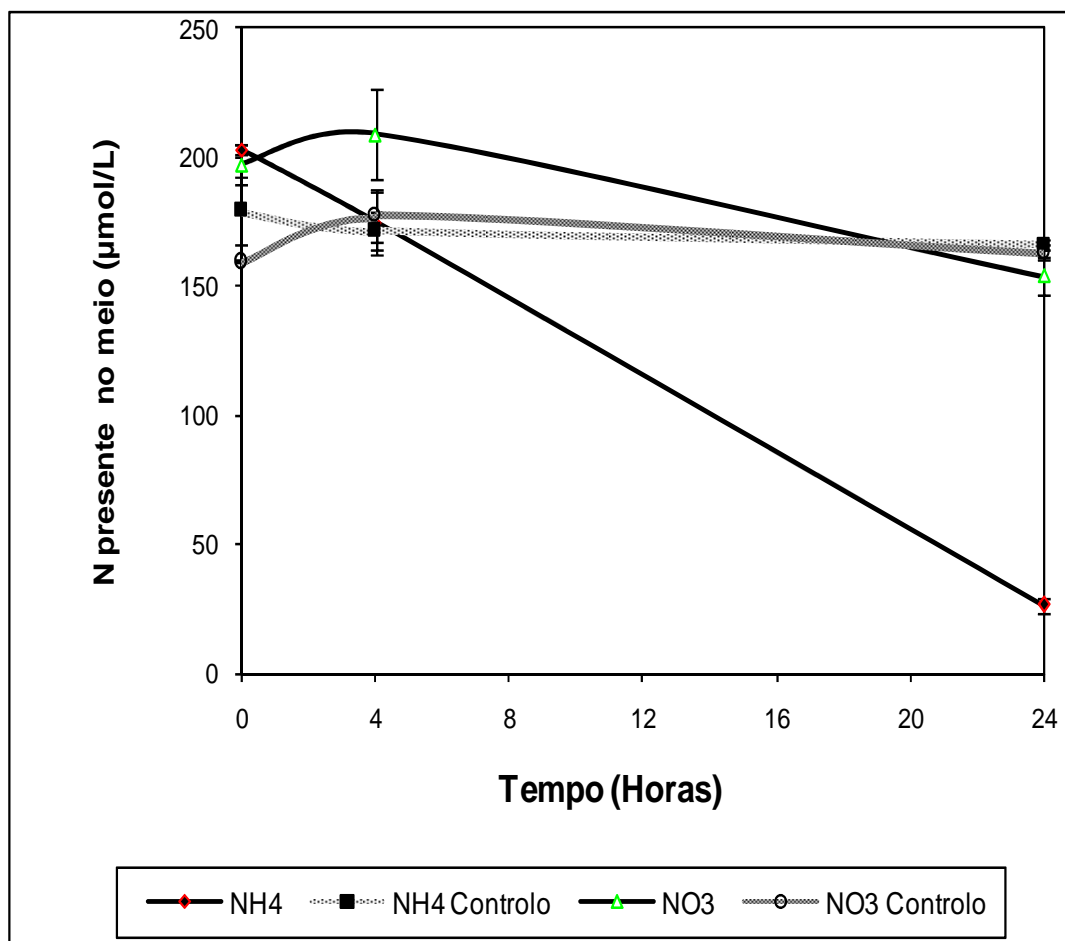


GRÁFICO 14. Evolução da quantidade média ($n=3$) de ambas as formas de N presentes em simultâneo no meio, durante 24 horas em luz contínua, a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C através do tratamento de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$.

Quanto à análise estatística, não existiram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nas quantidades iniciais de ambas as formas de N. Às 4 horas e às 24 horas de experiência já foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambas as formas de N, sendo significativamente superior a quantidade de NH_4^+ removida da água em comparação com a de NO_3^- .

4.8.3. Remoção de PO_4^{3-} por parte das algas sujeitas a diferentes tratamentos

No gráfico 15 verifica-se que a remoção de PO_4^{3-} da água por parte das algas não é influenciada pelo tratamento a que as algas estão sujeitas, uma vez que, as quantidades removidas são praticamente iguais entre os três tratamentos. Verifica-se

que ao fim de 24 horas a quantidade de PO_4^{3-} presente no meio é sensivelmente a mesma que no início da experiência, ou seja, a remoção ao final de 24 horas foi residual. Ao tempo zero a quantidade de PO_4^{3-} na água foi de 14 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento de NO_3^- e 17 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento de NH_4^+ para as algas privadas de N, de 18 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento de NO_3^- e 16 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento de NH_4^+ para as algas que não foram privadas de N e de 39 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. No fim das 24 horas a quantidade de PO_4^{3-} presente no meio nos tratamentos das algas privadas de N foi superior à inicial (tempo zero) para o tratamento com NO_3^- e de 1 $\mu\text{mol/L}$ para o tratamento com NH_4^+ . Quanto aos tratamentos com algas não privadas de N verificou-se uma remoção de 4 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- e 5 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ e de 6 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$.

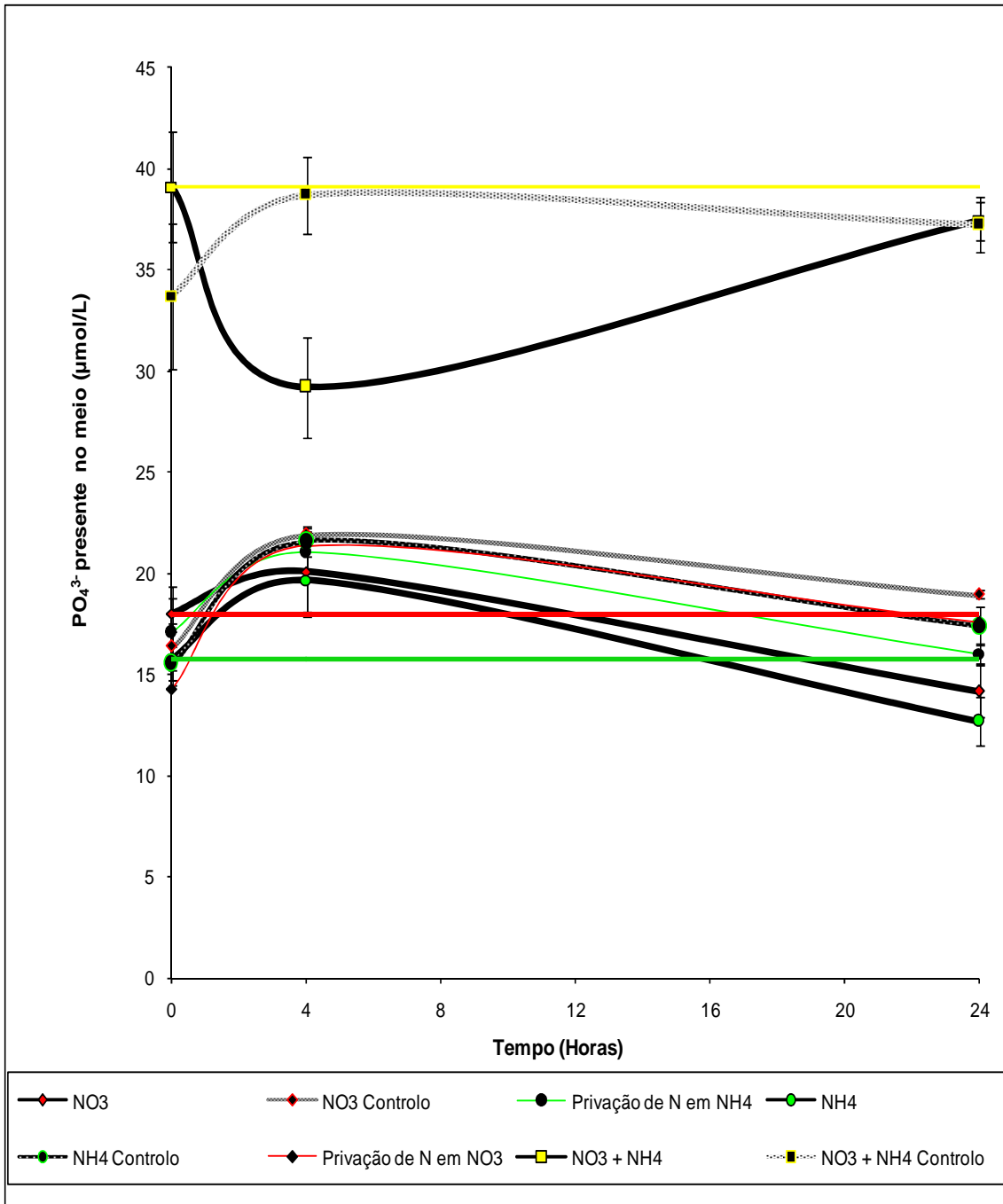


GRÁFICO 15. Evolução da quantidade média ($n=3$) de PO_4^{3-} presente no meio, durante 24 horas em luz contínua, a $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15°C para os tratamentos de disponibilidade de diferentes formas de N: $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, NH_4^+ e NO_3^- "starved" e NH_4^+ e NO_3^- . As linhas horizontais representam as concentrações iniciais de PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/L}$) nos diferentes tratamentos: Amarelo ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$), Vermelho (NO_3^-) e Verde (NH_4^+).

4.9. Remoção dos diferentes nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-}) do meio de cultivo a diferentes concentrações

4.9.1. Tratamento com NH_4^+ (150 μmol) e tratamento com NO_3^- (150 μmol)

Pela análise do gráfico 16 verifica-se que para o tratamento com NO_3^- e para o tratamento com NH_4^+ a concentrações altas, as percentagens de remoção da água são idênticas ao longo de toda a experiência. Ao final dos 14 dias, a média da percentagem de remoção de NH_4^+ da água é de 97% e a de NO_3^- é de 98%. Além disso, a percentagem de NH_4^+ e NO_3^- removida nos matrizes de controlo é residual: 5% e 2%, respectivamente.

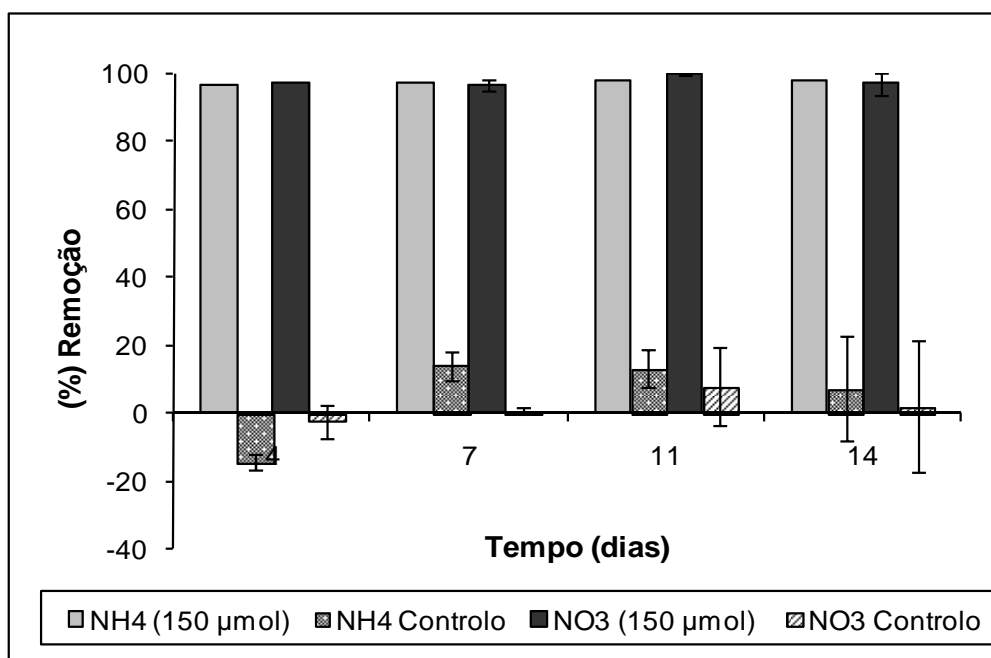


GRÁFICO 16. Evolução da percentagem de NO_3^- e NH_4^+ removidos da água em ambos os tratamentos para concentrações altas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em períodos de 3-4 dias.

Como as quantidades iniciais para cada um dos tratamentos além de serem superiores às previstas não eram iguais realizou-se uma análise estatística. Esta permitiu-nos concluir que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as quantidades iniciais para ambos os tratamentos. Portanto, pudemos analisar as quantidades finais removidas em cada um dos tratamentos e pela análise estatística efectuada concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente

significativas ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos, ou seja, não existem diferenças significativas entre a remoção final de NH_4^+ e a remoção final de NO_3^- (Anexo 8.7). Além disso, para o tratamento com NH_4^+ verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre a quantidade final removida da água e a removida dos matrizes de controlo. Para o tratamento com NO_3^- também se verificou a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre a quantidade final removida da água e a removida dos matrizes de controlo.

4.9.2. Tratamento com NH_4^+ (5 μmol) e Tratamento com NO_3^- (30 μmol)

O Gráfico 17 mostra que ao longo da duração da experiência a percentagem de remoção de NH_4^+ da água às concentrações inferiores é bastante mais baixa do que a percentagem de remoção de NO_3^- . Ao final de 14 dias de experiência, verifica-se que a média da percentagem de remoção de NH_4^+ é de 51% e a de NO_3^- é de 98%. Além disso, também mostra que a concentração de NH_4^+ removida nos matrizes de controlo não é residual (48%) tendo valores similares aos valores de NH_4^+ removidos. Por outro lado, a remoção de NO_3^- dos matrizes de controlo é bastante inferior (15%).

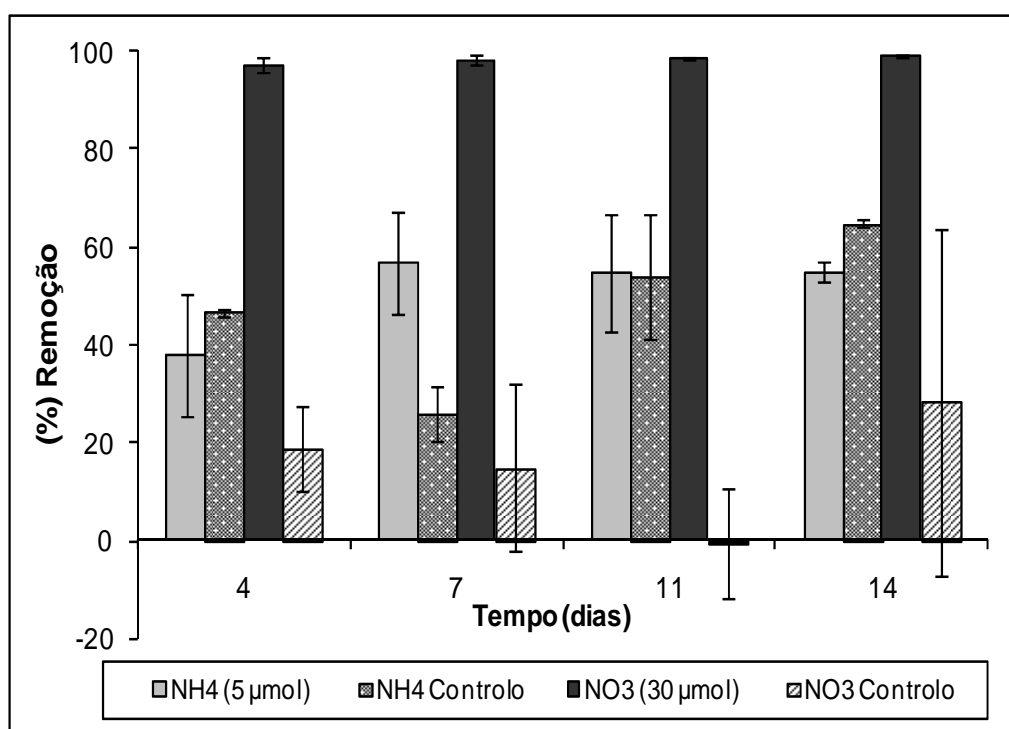


GRÁFICO 17. Evolução da percentagem de NO_3^- e NH_4^+ removidos da água em ambos os tratamentos para concentrações baixas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em períodos de 3-4 dias.

4.9.3. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (150 μmol + 150 μmol)

Pela análise do gráfico 18, verifica-se que ao final de 14 dias de experiência para o tratamento $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (150 μmol + 150 μmol) em que ambas as formas de N estão presentes em simultâneo na água as algas removem uma menor percentagem de NO_3^- (92%) do que de NH_4^+ (97%). A percentagem removida nos matrizes de controlo é de -1% e de 8%, respectivamente.

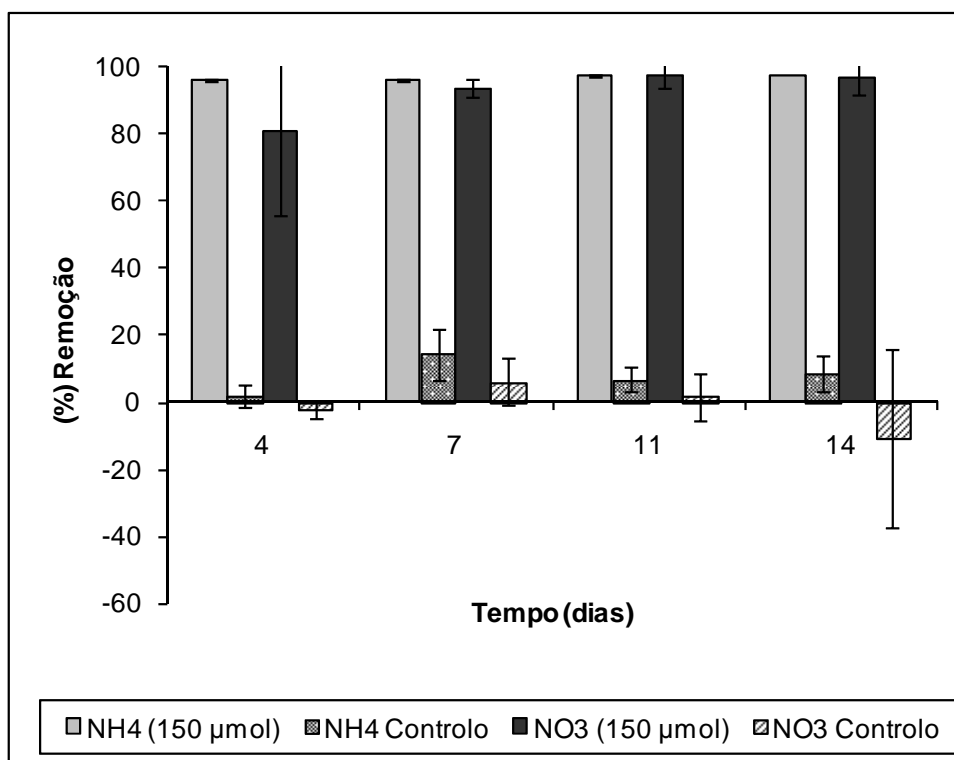


GRÁFICO 18. Evolução da percentagem de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ removidos em períodos de 3-4 dias, quando presentes em simultâneo no meio e em concentrações altas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 μmol fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ também se realizou uma análise estatística de forma a verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as quantidades iniciais de ambas as formas de N. Como não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) procedeu-se à análise estatística para verificar se existem diferenças significativas entre as quantidades finais removidas de NO_3^- e NH_4^+ . Concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as quantidades finais removidas de ambas as formas de N (Anexo 8.7.). Além disso, para o tratamento com NH_4^+ verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre a quantidade final removida da água e a removida dos matrizes de

controle. Para o tratamento com NO_3^- também se verificou a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre a quantidade final removida da água e a removida dos matrizes de controle.

4.9.4. Tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (30 μmol + 5 μmol)

No gráfico 19 verifica-se que ao final de 14 dias de experiência a média da percentagem de remoção a concentrações baixas de NO_3^- e de NH_4^+ é de 99% e de 56%, respectivamente. A percentagem removida nos matrizes de controle é de 13% e de 49%, respectivamente.

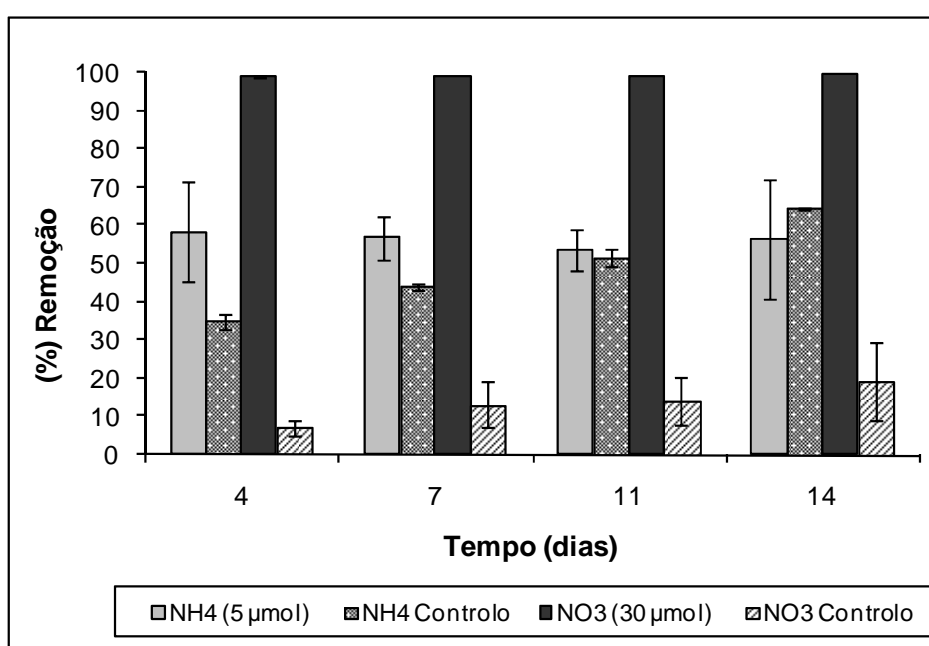


GRÁFICO 19. Evolução da percentagem de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ removidos em períodos de 3-4 dias, quando presentes em simultâneo no meio e em concentrações baixas a 15°C , fotoperíodo neutro e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.9.5. Tratamentos com NO_3^- , com NH_4^+ e com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ às concentrações altas para quantificar a remoção de PO_4^{3-} da água

No Gráfico 20 verifica-se ao longo dos 14 dias de experiência que dos três tratamentos o que remove uma quantidade superior de PO_4^{3-} é o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (75%), o segundo tratamento a remover mais PO_4^{3-} é o tratamento com NO_3^- (65%) e por fim o tratamento com NH_4^+ (56%) é o que remove quantidades inferiores de PO_4^{3-} .

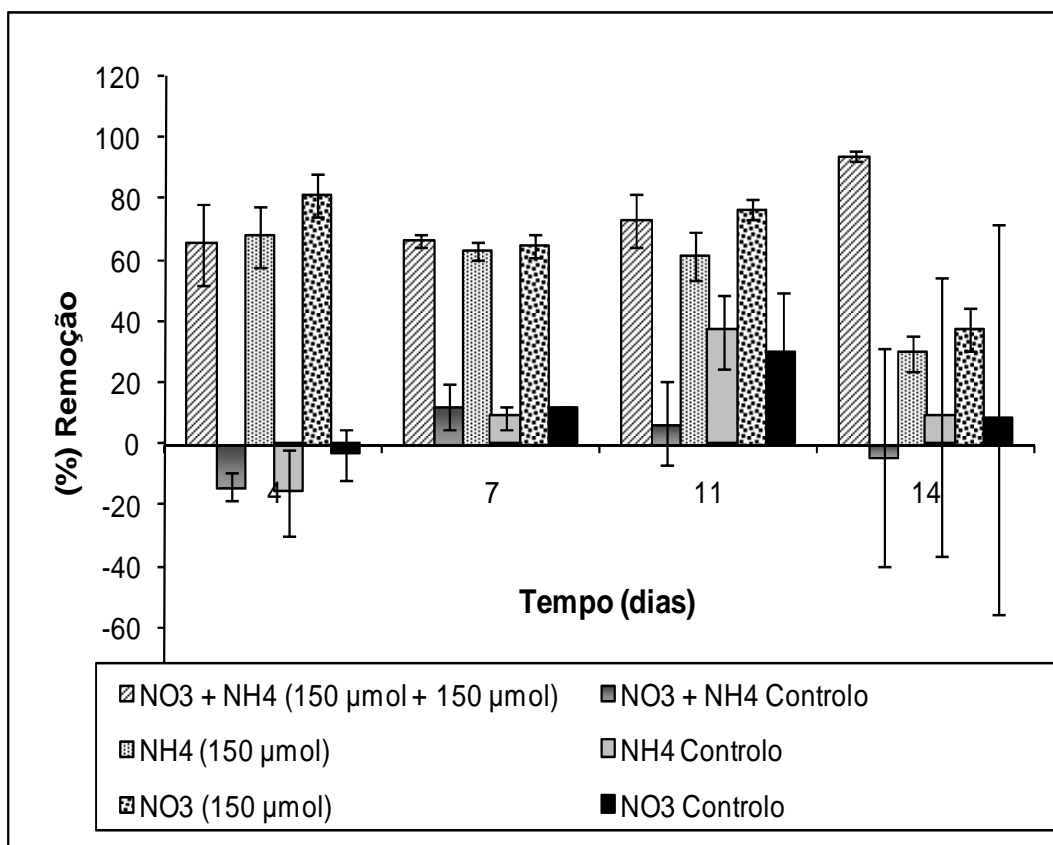


GRÁFICO 20. Evolução da percentagem de PO_4^{3-} removido da água para os três tratamentos para concentrações altas a 15°C , fotoperíodo neutro e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em períodos de 3-4 dias.

4.9.6. Tratamentos com NO_3^- , com NH_4^+ e com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ às concentrações baixas para quantificar a remoção de PO_4^{3-} da água

No Gráfico 21 verifica-se que dos três tratamentos o que remove uma quantidade superior de PO_4^{3-} é o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (98%). O segundo tratamento a remover mais PO_4^{3-} é o tratamento com NO_3^- (97%) e por fim o tratamento com NH_4^+ (86%) é o que remove quantidades inferiores de PO_4^{3-} . Logo, verifica-se uma tendência idêntica à observada para as concentrações superiores.

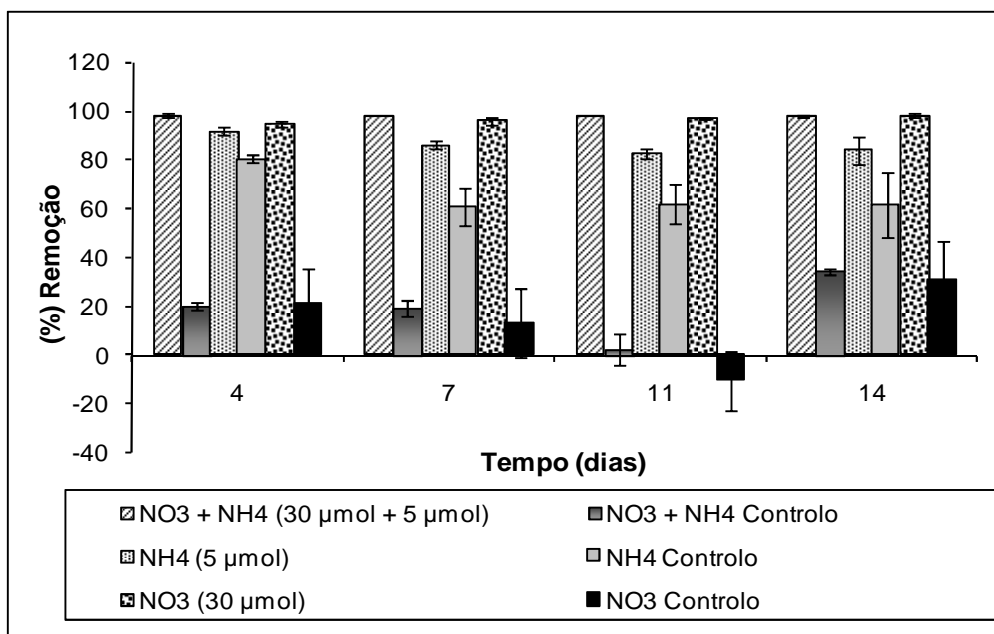


GRÁFICO 21. Evolução da percentagem de PO_4^{3-} removido da água para os três tratamentos para concentrações baixas a 15°C, fotoperíodo neutro e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em períodos de 3-4 dias.

O quadro 4 abaixo descrito sumariza os principais resultados obtidos na experiência de remoção dos diferentes nutrientes do meio, ao longo do tempo.

Tratamentos		(%) remoção		
		NH_4^+	NO_3^-	PO_4^{3-}
NH_4^+	Alta (178 μM)	97	-	56
	Baixa (12 μM)	51	-	86
NO_3^-	Alta (191 μM)	-	98	65
	Baixa (36 μM)	-	98	97
$NH_4^+ + NO_3^-$	Alta (175+178 μM)	97	92	75
	Baixa (16+40 μM)	56	99	98

O rácio N/P é sempre 10.

QUADRO 4. Percentagens médias de remoção dos nutrientes consoante o tratamento a que as algas foram submetidas.

Pela análise do quadro 4 verificam-se elevadas percentagens de remoção de N do meio à concentração mais elevada (150 μmol) para os três tratamentos estudados. Quanto às concentrações inferiores de N a percentagem removida da água nos tratamentos com NH_4^+ é bastante inferior à percentagem removida nos tratamentos com NO_3^- .

Além disso, quando se sujeitaram as algas à presença de ambas as formas de N na água ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) na concentração mais elevada estas removeram quantidades elevadas (acima dos 90%) de ambas as formas de N. Por outro lado, na presença de concentrações inferiores de ambas as formas de N a percentagem de NO_3^- removida foi muito superior à percentagem de NH_4^+ .

Quanto à percentagem de PO_4^{3-} removida do meio, os resultados obtidos apontam para uma maior percentagem removida no tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. Além disso, a percentagem de PO_4^{3-} removida do meio para os três tratamentos foi sempre superior na concentração inferior de PO_4^{3-} em detrimento da concentração superior.

4.9.7. Taxa de crescimento de *S. scoparium* com diferentes formas de N

Em relação ao crescimento de *Stypocaulon scoparium* nas diferentes condições de disponibilidade de N, pela análise do Gráfico 22 verifica-se que as taxas de crescimento são ligeiramente superiores para a concentração superior (150 μmol) nos três tratamentos. O crescimento médio ao longo dos 14 dias de duração da experiência para as concentrações altas foi de 4,2% pf dia⁻¹ para o tratamento com NO_3^- , 3,8% pf dia⁻¹ para o tratamento com NH_4^+ e de 2,6% pf dia⁻¹ para o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. Quanto às concentrações baixas, foi de 3,4% pf dia⁻¹ para o tratamento com NO_3^- e de 3,5% pf dia⁻¹ para o tratamento com NH_4^+ e 3,7% pf dia⁻¹ para o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. Além disso, em média a taxa de crescimento mais elevada é a do tratamento com NO_3^- (4,2% pf dia⁻¹) na concentração mais alta.

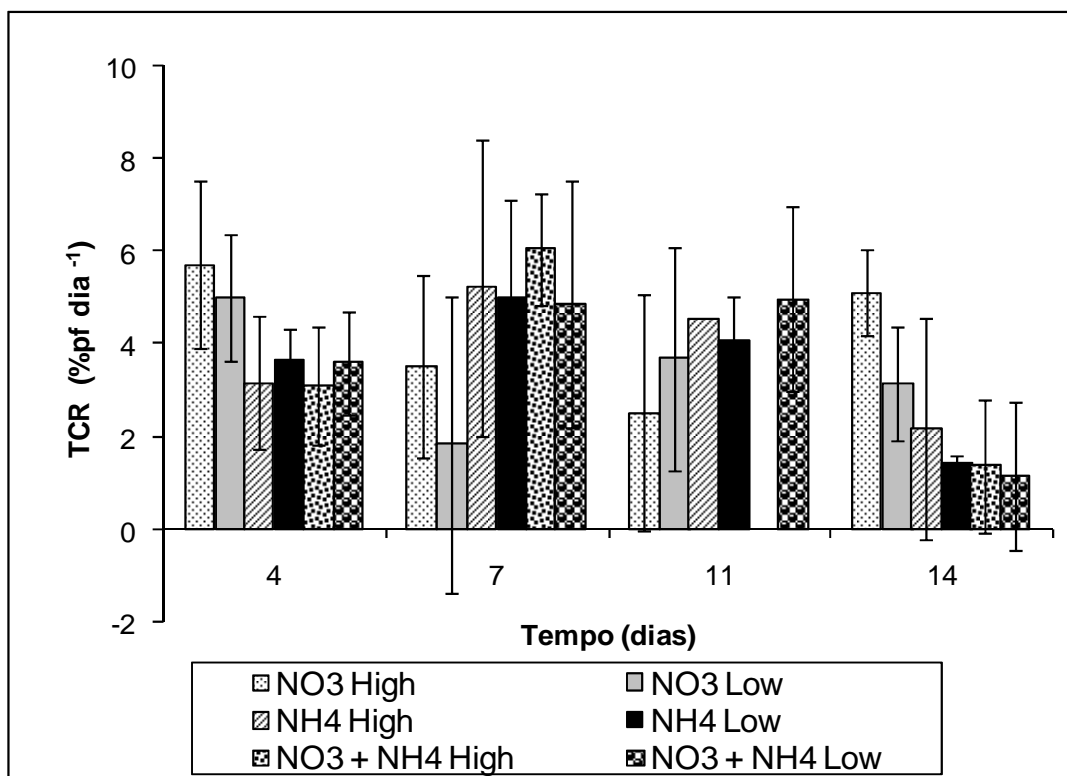


GRÁFICO 22 – Evolução da taxa de crescimento ($n=3$) da *S. scoparium* com diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Pela análise estatística verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para a taxa de crescimento entre os diferentes tratamentos (Anexo 8.8.).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A primeira experiência realizada teve como objectivo testar a taxa de crescimento ao longo do tempo da espécie *Chondracanthus acicularis* à temperatura de 18°C quando submetida a diferentes fotoperíodos (fotoperíodo neutro *versus* fotoperíodo curto).

Chondracanthus acicularis não cresceu ao longo de toda a experiência, observando-se a despigmentação dos ápices. Posteriormente, todos os ápices ficaram totalmente verdes, degenerando.

Os resultados de crescimento obtidos neste ensaio não são concordantes com os resultados obtidos por Guiry (1984). Nesse trabalho a alongação apical média da *Gigartina (Chondracanthus) acicularis* a 18°C e com um fotoperíodo curto (8D:16N) foi de 13 mm no final da experiência.

Quanto à segunda experiência, a *C. acicularis* apresentou uma taxa de crescimento negativa aos 10°C para a presença e para a ausência de arejamento e uma taxa de crescimento positiva aos 18°C, superior na ausência de arejamento (2% pf dia⁻¹).

Estes resultados podem indicar que o arejamento é um factor importante para a taxa de crescimento desta espécie. Como são algas que habitam o intertidal o problema não reside no movimento da água por si só. Contudo, há que ter em consideração que se trata de uma alga que é fixa por uma base discóide e que possui um aspecto rasteiro. Portanto, a utilização de ápices livres de qualquer fixação em contínuo movimento na água (presença de arejamento) pode ter contribuído para as taxas de crescimento irregulares e negativas que se verificaram.

Após a análise estatística confirmaram-se diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento da espécie ao longo do tempo entre as duas temperaturas mas não quando submetida à presença/ausência de arejamento. Quanto à interacção de ambos os factores também não existem diferenças estatisticamente significativas.

Salienta-se que em ambas as experiências acima descritas deparámo-nos com uma despigmentação que rapidamente se espalhou e cobriu toda a superfície do talo acabando por provocar a completa degradação das algas e conseqüentemente o fim das experiências. Estes resultados vêm corroborar os de Guiry (1984), que descreve que todas as plantas de *C. acicularis* morreram após seis semanas de experiência. Segundo Guiry (1984) houve um elevado grau de necrose inicialmente manifestado por uma despigmentação que rapidamente se espalhou por toda a superfície do talo acabando este por ficar totalmente branco, este fenómeno contribuiu para que as taxas de crescimento tenham sido variáveis.

Weinberger *et al.* (1997) realizou um estudo com a alga vermelha *Gracilaria conferta* que pode explicar o elevado grau de necrose de ambas as experiências realizadas. Segundo Weinberger *et al.* (1997) os antibióticos e os desinfetantes normalmente utilizados podem ter três efeitos diferentes nas algas:

- a) Podem danificar directamente a alga;
- b) Podem proteger a alga através da eliminação ou inactivação de bactérias potencialmente prejudiciais;
- c) Os agentes bactericidas podem danificar indirectamente a alga pela eliminação das bactérias protectoras.

Weinberger *et al.* (1997) testou diferentes antibióticos e desinfetantes e chegou à conclusão que o peróxido de hidrogénio e o hipoclorito de sódio danificaram directamente a *G. conferta*, causando a sua despigmentação e a morte da alga. Além disso, concluiu que altas concentrações de Rifampicina, Eritromicina e Iodopovidona (Betadine) aumentavam o branqueamento dos ápices.

Uma vez que utilizámos Betadine pode-se especular se foi a utilização desta que provocou a necrose de *C. acicularis* em ambas as experiências. No entanto, há que salientar que Guiry (1984) não utilizou este desinfetante na realização da sua experiência.

Outra experiência, realizada por Correa *et al.* (1999), testou a resposta de cicatrização e regeneração da espécie *Gigartina skottsbergii*. Os resultados são muito interessantes uma vez que podem ser considerados como uma alternativa viável aos problemas detectados nas nossas experiências. Correa *et al.* (1999) procedeu à excisão de fragmentos das frondes da *G. skottsbergii* e concluiu que a resposta à

cicatrização dos fragmentos das frondes da alga é significativamente influenciada pela temperatura, luz e meio. Na experiência realizada por este autor, ficou claro que, para os cortes do talo, uma combinação adequada de intensidade luminosa, temperatura e tipo de meio de cultura ($5 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 15°C , água do mar sem adição de qualquer meio nutritivo) podem melhorar as taxas de cicatrização até valores de 100%. Os fragmentos que não cicatrizaram durante o período (20-27 dias) de duração da experiência começaram a ficar esbranquiçados acabando por degenerar. Considerando os resultados de Correa *et al.* (1999), outra das explicações para a necrose dos fragmentos de *C. acicularis* observada no presente trabalho pode ser uma combinação inadequada de intensidade luminosa ($40 - 50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura (10 e 18°C) e tipo de meio (meio VSE).

Tendo em conta os resultados descritos, antes de pôr de parte completamente *C. acicularis* como espécie para sistemas de aquacultura integrada multitrófica, aconselha-se a realização de novas experiências sem a utilização de desinfectantes, tais como a Betadine e uma diferente combinação da intensidade luminosa, temperatura e tipo de meio.

Contudo, salienta-se que a utilização de água do mar apenas pode ser uma alternativa viável como método de obtenção de culturas estáveis. Podemos concluir que se quisermos utilizar a reprodução vegetativa para obtenção de biomassa suficiente para trabalhos de remoção de nutrientes dos efluentes da aquacultura tal não é possível devido à dificuldade de cicatrização das frondes.

A terceira experiência teve como objectivo encontrar uma espécie, entre várias que se encontram na nossa costa, que se destacasse em termos de crescimento com vista à sua utilização em sistemas de aquacultura integrada. Através do estudo comparativo de diferentes espécies concluiu-se que para as condições de cultivo testadas:

- a) As espécies *Gymnogongrus crenulatus*, *Chondracanthus teedei* e *Chondracanthus acicularis* foram as que obtiveram piores resultados, morrendo sem que se tenham estabelecido culturas estáveis;
- b) A espécie *Gracilaria gracilis* e a espécie *Palmaria palmata* apresentaram taxas de crescimento médio positivas excepto na última semana;

-
- c) A espécie *Scinaia furcellata* e a espécie *Lomentaria articulata* apresentaram taxas de crescimento variáveis, apresentando também alguma despigmentação e acabaram por morrer;
 - d) A espécie *Stypocaulon scoparium* apresentou uma taxa de crescimento positiva durante toda a experiência.

Existem diversos estudos com as espécies de algas vermelhas *Gracilaria gracilis* (ex. Choi *et al.* 2006) e *Palmaria palmata* (ex. Pang & Lünning, 2004) em que ambas as espécies apresentam taxas de crescimento positivas. Os resultados negativos verificados durante a última semana da experiência podem dever-se a contaminações, uma vez que todas as algas vermelhas apresentaram algas epífitas incluindo estas duas espécies.

Ambas as espécies do género *Chondracanthus* e a espécie *G. crenulatus* apresentaram os mesmos problemas existentes nas primeiras duas experiências realizadas, ou seja, despigmentação dos ápices até ficarem totalmente verdes e morrerem.

Quanto a *S. furcellata* e a *L. articulata* são espécies pouco estudadas, não tendo sido encontrado nenhum artigo de crescimento com estas espécies. Portanto, podemos apenas supor que a sua taxa de crescimento variável e negativa pode dever-se quer a contaminações e algas epífitas quer a condições de crescimento desadequadas. Mais trabalhos com diferentes metodologias para estabelecimento das culturas e diferentes condições de crescimento (ex, temperaturas, fotoperíodos, intensidades luminosas, nutrientes) serão necessários para estas espécies.

Deste modo, verificou-se que de todas as espécies testadas, *S. scoparium* é a que apresenta uma taxa de crescimento média superior. Além disso, manteve-se livre de epífitas durante toda a experiência. Foi por isso esta a espécie escolhida para posteriores estudos, de forma a confirmar se trata-se ou não duma espécie adequada para aplicar em sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

A escolha desta espécie prende-se não só com o facto de ter apresentado bons resultados na experiência anterior como também de ter um valor acrescido. *Stypocaulon scoparium* é utilizada em cosmética. Empresas de cosmética internacionais utilizam complexos algais nos seus produtos cosméticos e algumas

delas utilizam extractos da alga *S. scoparium* que afirmam ter propriedades de reestruturação da pele (www.incosmetics.com; www.gelyma.com).

Como só temos conhecimento do estudo de Novaczek *et al.* (1989) com esta espécie, foi necessário realizar uma série de experiências prévias para saber quais as condições ótimas de crescimento quanto a parâmetros como temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa e salinidade para *S. scoparium*.

Começou-se por avaliar a taxa de crescimento ao longo do tempo de *S. scoparium* com ou sem meio VSE e a diferentes intensidades luminosas. A alga *S. scoparium* apresenta uma taxa de crescimento superior com meio VSE. Estes resultados são importantes uma vez que demonstram que o meio utilizado (VSE), comumente utilizado para algas vermelhas, é adequado para esta espécie e pode continuar a ser utilizado para as experiências seguintes previstas. Além disso, esta experiência também demonstra o potencial desta espécie para integrar os sistemas de aquacultura integrada multitrófica, uma vez que a sua biomassa aumenta assimilando os nutrientes que se encontram na água. Quanto às diferentes intensidades luminosas testadas, verificou-se maior crescimento médio a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Na experiência seguinte pretendeu-se verificar a taxa de crescimento ao longo do tempo sujeitando a espécie a diferentes combinações de temperaturas (10, 15 e 20°C) e intensidades luminosas ($50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as três temperaturas (10, 15 e 20°C) para a taxa de crescimento médio ao longo do tempo para a espécie *S. scoparium*. Para as diferentes intensidades luminosas também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Quanto à interacção de ambos os factores também não existem diferenças estatisticamente significativas.

Apesar de estatisticamente não significativo, verificou-se que a taxa de crescimento médio da espécie foi consistentemente superior a 15°C e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ do que nas outras condições.

Os resultados de Novaczek *et al.* (1989) corroboram os resultados obtidos nesta experiência. Segundo este autor, *S. scoparium* apresenta uma amplitude de crescimento óptimo às temperaturas de 10 a 27 ou 30°C.

Segundo dados da piscicultura A. Coelho & Castro (Rio Alto, Póvoa do Varzim), empresa que colabora connosco em experiências de aquacultura integrada multitrófica, a temperatura da água do mar nunca ultrapassa os 22°C no Verão e os 11°C no Inverno. Atendendo a este facto, é importante que qualquer espécie de alga a utilizar com biofiltro neste sistema suporte esta amplitude térmica. *Stypocaulon scoparium* provou que tolera uma variada gama de temperaturas, o que a torna numa espécie com potencial para ser utilizada durante todo o ano em sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

Em relação ao crescimento de *S. scoparium* a diferentes salinidades, a taxa de crescimento é superior à salinidade de 20 ppm. Salienta-se que a taxa de crescimento aos 0 ppm foi predominantemente negativa. A 36 e 46 ppm a alga apresenta uma taxa de crescimento positiva e 10 ppm a taxa de crescimento é muito variável e não apresenta uma tendência clara. Podemos assim concluir que se trata de uma espécie que tolera uma variada gama de salinidades entre 20 e 46 ppm.

Após a realização das experiências acima descritas, que são da maior relevância, uma vez que existiam poucos dados acerca desta espécie e para maior parte dos parâmetros testados não existiam nenhuns dados, pudemos iniciar as experiências mais importantes para determinarmos se trata-se de uma espécie com possibilidades de integração em sistemas de aquacultura integrada.

Deste modo, realizou-se uma experiência com o intuito de determinar qual a melhor combinação de densidade de cultivo (0,1; 0,3; 0,6; 1,5 e 3g peso fresco L⁻¹) e intensidade luminosa (50 ou 150 µmol fotões m⁻² s⁻¹) para o crescimento de *S. scoparium*.

Em termos estatísticos não existem diferenças significativas para a taxa de crescimento entre as duas intensidades luminosas. Existem no entanto diferenças significativas entre densidades de cultivo. Quanto à interacção de ambos os factores também não existem diferenças estatisticamente significativas.

A análise do gráfico mostra uma maior taxa de crescimento à densidade de cultivo de 0,1g pf L⁻¹ para ambas as intensidades luminosas, confirmada pela análise estatística. A densidade de cultivo (0,1g pf L⁻¹) apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação a todas as outras densidades de cultivo excepto para a densidade de cultivo de 0,3 g pf L⁻¹. Embora a taxa de crescimento seja superior à

densidade de 0,1 g pf L⁻¹ esta diferença não é significativamente diferente quando comparada com 0.3 g pf L⁻¹.

Aos 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ é visível que à medida que se aumenta a densidade de cultivo a taxa de crescimento médio diminui. Contudo, aos 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tal não é inteiramente verdadeiro uma vez que às 0,3 e 3g pf L⁻¹ a taxa de crescimento médio aumenta ao longo de toda a experiência. Salienta-se que embora a alga cresça mais rápido a baixas densidades há que ter em atenção que em teoria retiram-se mais nutrientes da água a densidades mais altas. O ideal numa aquacultura não é tanto a taxa de crescimento mas sim a produtividade e a remoção de nutrientes da água na maior densidade possível desde que a produtividade não decresça. Além disso, com a utilização de densidades de cultivo mais elevadas a probabilidade de ocorrência de epífitas decresce.

Pereira *et al.* (2006) realizou uma experiência para testar as condições óptimas de crescimento dos gametófitos da espécie *Porphyra dioica* em que testava três intensidades luminosas (50, 150 e 250 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e diferentes densidades de cultivo (0,1; 0,3; 0,6 e 1,5g pf L⁻¹). Concluiu que a taxa de crescimento diminuía significativamente com o aumento da densidade de cultivo. Além disso, concluiu que os gametófitos da *P. dioica* cresceram mais rapidamente a baixas densidades de cultivo e com intensidades luminosas superiores.

Finalmente, em relação à capacidade de remoção de nutrientes da água pela alga *S. scoparium*, realizou-se em primeiro lugar um estudo de assimilação de nutrientes. Nesta experiência foram utilizadas algas privadas de ambas as fontes N (NO_3^- e NH_4^+) com o intuito de as comparar com as algas mantidas em VSE e repletas de N.

No presente trabalho, para o tratamento com NH_4^+ e para o tratamento com NO_3^- nas algas previamente privadas de N, a concentração ao tempo zero na água foi de 210 $\mu\text{mol/L}$ e de 193 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Após 24 horas foram removidos do meio 205 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ e 178 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- (gráfico 13). Salienta-se que o valor removido corresponde a 97% de NH_4^+ e 92% de NO_3^- do total disponível inicialmente.

Como os valores iniciais (tempo 0) não são iguais para as duas formas de N estudadas, realizou-se um teste estatístico que confirmou que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre as duas formas de N ao tempo zero. Deste modo,

pôde-se avaliar se as diferenças na remoção das duas formas de N da água em tempos específicos (4 e 24 horas) eram significativas ou não.

Para as quatro horas de experiência concluiu-se que existiam diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com NO_3^- e o tratamento com NH_4^+ tendo sido removidas em média, 24 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- e 82 de NH_4^+ $\mu\text{mol/L}$. Contudo, às 24 horas não existiram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados corroboram os resultados acima descritos, ou seja, às 24 horas as quantidades removidas de N para ambos os tratamentos corresponderam a mais de 90% do total disponível inicialmente.

Quanto aos tratamentos relativos às algas que não foram privadas de N verificou-se que a concentração de NH_4^+ aos 0 minutos foi de 204 $\mu\text{mol/L}$ e a concentração de NO_3^- foi de 214 $\mu\text{mol/L}$. Após 24 horas foram removidos do meio 182 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ e 128 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- , o que corresponde a 89% e 60% do valor total disponível inicialmente (gráfico 13).

A análise estatística efectuada ao tempo zero comprovou que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações iniciais de ambos os tratamentos. Às 4 horas de experiência também não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as duas concentrações. Contudo, às 24 horas de experiência já foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ambas as concentrações de N, sendo significativamente superior a concentração de NH_4^+ removida da água em comparação com a concentração de NO_3^- .

Salienta-se ainda que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na remoção de NH_4^+ e de NO_3^- entre os matrazes com algas e os matrazes de controlo no tempo zero. Contudo, ao final de 24 horas a remoção de NH_4^+ e de NO_3^- nos matrazes de controlo foi significativamente inferior (gráfico 13). Estes resultados indicam que os matrazes de controlo cumpriram a sua função, isto é, permitiram-nos concluir que a quantidade de NH_4^+ e de NO_3^- removida do meio deve-se à sua assimilação por parte das algas.

Ao compararmos os quatro tratamentos (tratamentos previamente privados de N e tratamentos que não foram privados de N) verificou-se que foram removidas maiores quantidades de NH_4^+ e de NO_3^- do meio com algas previamente privadas de N (Gráfico 13). Além disso, nos tratamentos em que as algas foram previamente

privadas de N em termos estatísticos não existiram diferenças significativas nas quantidades removidas. Por outro lado, a quantidade de NH_4^+ removida é significativamente superior à de NO_3^- quando comparamos os tratamentos em que as algas não foram privadas de N.

No tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ presentes simultaneamente na água (Gráfico 14) no tempo zero a concentração foi de 197 $\mu\text{mol/L}$ e 200 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Ao longo do tempo as quantidades removidas variaram e às 24 horas foram removidos 176 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ e 43 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- , 87% e 22% do total disponível inicialmente. A análise estatística efectuada ao tempo zero comprovou que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações iniciais de ambas as formas de N presentes simultaneamente no meio. Às 4 horas e às 24 horas de experiência já foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ambas as concentrações de N, sendo significativamente superior a concentração de NH_4^+ removida do meio em comparação com a concentração de NO_3^- . Logo, podemos concluir que, na presença de NH_4^+ e NO_3^- , *S. scoparium* remove preferencialmente o NH_4^+ .

A remoção de fósforo é idêntica para todos os tratamentos ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$; NO_3^- e NH_4^+ “starved” e NO_3^- e NH_4^+). Às 24 horas a concentração presente na água é similar à concentração no tempo zero (Gráfico 15).

Por fim, ainda em relação à remoção de nutrientes por *S. scoparium*, realizou-se uma experiência com o intuito de verificar a sua eficiência na remoção de nutrientes ao longo de duas semanas.

Para uma concentração alta de NH_4^+ (150 μmol) a média de remoção de NH_4^+ da água ao longo das 2 semanas foi de 97% com uma média da taxa de crescimento de 3,8% pf dia⁻¹. Por outro lado, com uma concentração de NH_4^+ inferior (5 μmol) a média de remoção baixou drasticamente para 51% contudo a taxa de crescimento foi similar (3,5% pf dia⁻¹). Uma explicação pode residir no facto da amónia entrar nos tecidos das algas por difusão passiva. Em teoria, se a concentração na água é menor a velocidade de entrada de amónia na alga vai ser mais baixa.

Quanto aos matrizes de controlo estes serviram o seu propósito uma vez que a percentagem de NH_4^+ (150 μmol) removida da água foi residual, resultado comprovado pela análise estatística ($p < 0,05$). Contudo, em concentrações baixas a

percentagem removida foi bastante alta (48%) tendo em consideração a percentagem de remoção nos matrazes com algas (51%). Embora não tenhamos uma explicação concreta para estes resultados podemos especular que possam ter sido provocados por contaminações com microalgas, que no entanto nunca foram visíveis durante a duração da experiência, ou a erros na preparação dos meios de VSE ou na análise dos nutrientes.

Carmona *et al.* (2006) realizou um estudo de remoção de azoto e fósforo com diferentes espécies de *Porphyra* por um período de cultivo de 28 dias e com a mesma concentração (150 μmol) utilizada no nosso estudo. Carmona *et al.* (2006) concluiu que as espécies, *P. amplíssima*, *P. umbilicalis* e *P. haitanensis*, apresentaram uma percentagem de remoção de NH_4^+ de 99%, ligeiramente superior à da nossa espécie e que a espécie *P. purpurea*, *P. katadai* e *P. yezoensis* apresentaram uma percentagem entre os 91-96%, ligeiramente inferiores à nossa.

Tendo em consideração que o género *Porphyra* é dos mais estudados com vista à sua integração em sistemas de aquacultura integrada multitrófica as nossas percentagens de remoção de NH_4^+ podem ser consideradas muito boas.

Salienta-se a importância de posteriores estudos com o intuito de avaliar se a percentagem de remoção apresentada pela *S. scoparium* se reflecte na incorporação de N nos seus tecidos. São necessárias experiências que incluam a análise dos tecidos da alga para ver a percentagem de N que a alga realmente incorpora nos seus tecidos, uma vez que uma remoção na ordem dos 90% não corresponde necessariamente a uma assimilação igual por parte da alga. Uma hipótese é a ocorrência da libertação de N orgânico dissolvido para o meio durante o crescimento, tal como foi referido pela primeira vez por Tyler *et al.* (1994) ao estudar a espécie *Ulva lactuca*.

Refere-se ainda que as taxas médias de crescimento, embora inferiores às espécies *Porphyra* (cerca de 25% segundo Pereira *et al.* 2008) são boas, similares às de algumas espécies de *Gracilaria*, outra alga muito estudada e indicada como boa candidata a sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

Para uma concentração superior de NO_3^- (150 μmol) na água, a média de remoção de NO_3^- ao longo das 2 semanas foi de 98% com uma média das taxas de crescimento de 4,2% pf dia^{-1} . Com uma concentração de NO_3^- inferior (30 μmol) na

água a média de remoção também foi de 98% ao longo das duas semanas e a média das taxas de crescimento foi de 3,4% pf dia⁻¹. Quanto aos matrizes de controlo estes serviram o seu propósito uma vez que a percentagem de NO₃⁻ removido da água em concentrações altas ou baixas é residual.

Segundo Pedersen *et al.* (2004) a taxa de assimilação dos nitratos aumenta com o aumento da concentração no meio. Mas na nossa experiência isso não aconteceu, a taxa de remoção foi superior a 98% nas duas condições.

O mesmo estudo referido acima (Carmona *et al.* 2006) concluiu que as espécies *P. amplíssima* e *P. haitanensis* apresentaram uma percentagem de remoção de NO₃⁻ de 99%, ligeiramente superior à da nossa espécie e que as espécies *P. purpurea*, *P. katadai* e *P. yezoensis* apresentaram uma percentagem entre os 69-92%, inferior à nossa.

Apesar de as concentrações iniciais de ambos os tratamentos referidos acima (tratamento com NO₃⁻ e tratamento com NH₄⁺ para concentrações altas – 150 µmol) não serem iguais, a análise estatística no tempo 0 revelou que não eram significativamente diferentes. Deste modo, analisou-se as concentrações finais a cada 3-4 dias de experiência e verificámos a não existência de diferenças estatisticamente significativas entre a remoção de NO₃⁻ e de NH₄⁺.

É interessante notar que o *S. scoparium* cresce igualmente bem utilizando o NO₃⁻ ou o NH₄⁺, cerca de 3% pf dia⁻¹, como fonte de N quando apenas uma destas formas está disponível nas concentrações altas. No estudo de Pereira *et al.* (2008) com a alga *P. dioica* tal também foi verificado embora a taxa de crescimento dessa alga seja superior, cerca de 25%.

Segundo Carmona *et al.* (2006), nem todas as macroalgas podem crescer igualmente bem com NO₃⁻ ou NH₄⁺. Estudos realizados com a *P. yezoensis* demonstraram crescimentos superiores e taxas de assimilação superiores quando o NH₄⁺ era a fonte de N em comparação com o NO₃⁻. Os mesmos resultados foram obtidos por DeBoer *et al.* (1978) que demonstrou, em condições laboratoriais, que a *Gracilaria foliifera* cresce melhor com NH₄⁺ do que com NO₃⁻. Por outro lado, segundo Carmona *et al.* (2006) a fonte de N não afectou significativamente a taxa de crescimento específica da espécie *P. leucostica*, embora tenha apresentado uma maior taxa de crescimento específico com NO₃⁻ a concentrações altas.

Pela análise do Gráfico 18 e do Quadro 4, verifica-se que no tratamento em que a água tinha exactamente as mesmas concentrações altas de NO_3^- (150 μmol) e NH_4^+ (150 μmol) a percentagem de NH_4^+ removida (97%) foi superior à percentagem de NO_3^- (92%) removida. Este resultado indica que quando ambas as formas de N estão disponíveis para a alga *S. scoparium* esta prefere o NH_4^+ , removendo maiores percentagens desta forma de N da água. É de notar, no entanto, que apesar dessa aparente preferência, ambas as formas de N são removidas em mais de 90% da sua concentração inicial.

A combinação destes resultados de remoção após 3-4 dias com os da experiência de 24 horas, permite chegar a outras conclusões. De facto, é possível concluir que, nestas condições, *S. scoparium* remove preferencialmente NH_4^+ durante as primeiras 24 horas. No final deste período, tendo já removido a quase totalidade de NH_4^+ mas apenas 60% de NO_3^- , as algas prosseguem a remoção de NO_3^- . O resultado é, no final de cada período de 3-4 dias, uma remoção quase total das duas formas de N. Estes resultados são concordantes com os de DeBoer (1981) que afirma que o azoto na forma de amónia é assimilado mais rapidamente que os nitratos em muitas algas. Além disso, Bracken (2006) verifica nas suas experiências maiores taxas de assimilação de NH_4^+ do que NO_3^- para a espécie *Fucus gardneri*.

Os resultados obtidos são muito interessantes uma vez que provam que esta espécie tem capacidade para remover ambas as fontes de N (NO_3^- e NH_4^+) do meio de cultivo. No entanto, como se pode observar no Gráfico 19 para concentrações baixas de NO_3^- (30 μmol) e NH_4^+ (5 μmol) a alga remove uma maior percentagem de NO_3^- do que de NH_4^+ .

Quanto à remoção de PO_4^{3-} podemos concluir que para os três tratamentos as algas removeram uma maior percentagem de fósforo a baixas concentrações. Em ambas as concentrações (superior e inferior) verificou-se que o tratamento com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ removeu maiores concentrações de PO_4^{3-} , seguido pelo tratamento com NO_3^- e por fim o tratamento com NH_4^+ .

Pereira *et al.* (2008) concluiu que a percentagem de PO_4^{3-} removida diminuía com o aumento da concentração de PO_4^{3-} para a espécie *P. dioica*. No nosso estudo aconteceu exactamente o mesmo como se pode comprovar pelo Quadro 4.

Carmona *et al.* (2006) concluiu que a remoção de fósforo foi mais alta quando o NH_4^+ era a fonte de N nas três espécies estudadas (*P. purpurea*, *P. umbilicalis* e *P. yezoensis*). No nosso estudo, aconteceu exactamente o inverso pois a remoção de fósforo foi superior para ambas as concentrações no tratamento com NO_3^- (Quadro 4).

Segundo Neori *et al.* (1996) a baixa remoção de fósforo relativamente ao N é explicada pelo baixo rácio N/P no meio para a espécie *Ulva lactuca*. Para as espécies de *Porphyra* referidas acima no estudo de Carmona *et al.* (2006) foi concluído o mesmo. Ambos os resultados são concordantes com os obtidos neste estudo para a espécie *S. scoparium*.

Como a remoção de fósforo não é total podemos especular se a alga só remove da água o que necessita naquele momento para o seu crescimento não armazenando fósforo nos seus tecidos.

Quanto às taxas de crescimento (Gráfico 22) entre os diferentes tratamentos concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas, ou seja, as algas apresentam boas taxas de crescimento com qualquer um destes tratamentos. De qualquer forma, a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* foi superior ($4,2\% \text{ pf dia}^{-1}$) com o tratamento de NO_3^- na concentração alta ($150 \mu\text{mol}$).

Em relação ao crescimento *versus* remoção de nutrientes, parece que a remoção de mais nutrientes não se traduz em maior crescimento. Isto pode indicar que na verdade as algas estão a remover mais do que o necessário para crescimento máximo naquelas condições e que, portanto, estarão a aumentar a quantidade de N nos seus tecidos, armazenando-o.

Portanto, pela análise de todos os resultados acima descritos pode-se concluir que a espécie estudada tem potencial para ser cultivada em sistemas de aquacultura integrada multitrófica.

6. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

De forma a assegurar a sustentabilidade da indústria da aquacultura, a longo prazo, é necessário reduzir os impactos ambientais negativos resultantes dessa actividade. Para além do aspecto ecológico, há que ter em atenção o aspecto económico. O azoto e o fósforo, em abundância nos efluentes, podem ser utilizados para a produção de produtos com valor acrescentado ao invés de serem desperdiçados. A aquacultura integrada multitrófica pode ajudar a resolver este problema, uma vez que as algas podem remover até 90% das descargas de nutrientes das aquaculturas intensivas.

Em função dos resultados obtidos neste trabalho podem retirar-se as seguintes conclusões:

Ambas as experiências realizadas para a espécie *Chondracanthus acicularis* levam a crer que se trata de uma espécie que muito provavelmente não será uma boa candidata para integrar sistemas de aquacultura integrada multitrófica. Apresentou taxas de crescimento maioritariamente negativas e variáveis bem como um problema de despigmentação e consequente necrose permitindo concluir tratar-se de uma alga difícil para cultivo, pelo menos com reprodução vegetativa.

Contudo, se realizarem-se mais experiências, tendo em conta os resultados obtidos pelos autores citados durante o trabalho, estas deverão ter em conta os resultados negativos observados. Futuras experiências deverão primeiro determinar as condições apropriadas para a obtenção de culturas estáveis em laboratório. Outra possibilidade é a obtenção de culturas por isolamento de esporos e não por propagação vegetativa.

As experiências realizadas com *S. scoparium* revelaram algum potencial. É uma espécie que apresenta taxas de crescimento positivas na presença de meio VSE o que nos permitiu continuar a utilizá-lo nas restantes experiências onde se comprovou o crescimento da *S. scoparium* a uma variada gama de temperaturas e salinidades.

No que diz respeito à experiência de densidade de cultivo, *S. scoparium* apresentou uma maior taxa de crescimento à densidade de 0,1g/L para ambas as intensidades luminosas estudadas ($50 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $150 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$.)

Além disso, concluiu-se que com o aumento da densidade de cultivo a taxa de crescimento diminuiu.

Na experiência com duração de 24 horas foi removida da água uma maior quantidade de NH_4^+ do que de NO_3^- . Por outro lado, na experiência realizada durante duas semanas a *S. scoparium* demonstrou ter capacidade para remover NO_3^- e NH_4^+ do meio de cultivo em percentagens idênticas a concentrações altas. Trata-se de uma característica muito importante, uma vez que, normalmente os sistemas de aquacultura intensiva têm biofiltros bacterianos que transformam o NH_4^+ em NO_3^- .

Em conclusão, *S. scoparium* parece ser uma boa candidata para integrar os sistemas de aquacultura integrada multitrófica, uma vez que atinge duas premissas inerentes a este sistema:

- a) Retirar os nutrientes da água;
- b) Obter biomassa de valor acrescido.

Salienta-se ainda a importância de realizar mais estudos para confirmar os resultados obtidos, especialmente estudos a nível piloto nas condições das aquaculturas comerciais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AlgaeBase

<http://www.algaebase.org/>

Bracken, M. E. S., Stachowicz, J. J. (2006). **Seaweed diversity enhances nitrogen uptake via complementary use of nitrate and ammonium.** *Ecology*, **87(9)**: 2397-2403.

Carmona, R., Kraemer, P. G., Yarish, C. (2006). **Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish-algal aquaculture system.** *Aquaculture*, **252**: 54-65.

Choi, G. H., Kim, S.Y., Kim, H. J. Lee, J. S., Park, J. E., Ryu, J., Nam, W. K., (2006). **Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. Chorda*, with the potential for mariculture in Korea.** *Journal of Applied Phycology*, **18**: 269-277.

Chopin, T., Sharp, G., Belyea, E., Semple, R., Jones, D., (1999a). **Open-water aquaculture of the red alga *Chondrus crispus* in Prince Edward Island, Canada.** *Hydrobiologia*, **398**: 417-425.

Chopin, T., Yarish, C., wilkes, R., Belyea, E., Lu, S., Mathieson, A., (1999b). **Developing *Porphyra*/salmon integrated aquaculture for bioremediation and diversification of the aquaculture industry.** *Journal of Applied Phycology*, **11**: 463-472.

Chow, F., Macciavello, J., Santa Cruz, S., Fonck, O., (2001). **Utilization of *Gracilaria Chilensis* (Rhodophyta: Gracilariaceae) as biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, Oyster, and sea urchins.** *Journal of World Aquaculture Society*, **32**: 214-220.

CODIF Recherche & Nature

<http://www.in-cosmetics.com/>

Correa, A. J., Beltrán, J., Buschmann, H. A., Westermeier, R. (1999). **Healing and regeneration responses in *Gigartina Skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales): optimisation of vegetative propagation for cultivation.** *Journal of Applied Phycology*, **11**: 315-327.

DeBoer, J. A., D'elia C. F. (1978). **Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake.** *Journal of Phycology*, **14**: 266-272.

DeBoer, J. A. (1981). Nutrients. *In The Biology of seaweeds* (eds. C. S. Lobban e M. J. Wynne) Blackwell Scientific Publication, Oxford, 163-209.

European Environment Agency (1999). *Coastal and Marine Zones. In Environment in the European Union at the turn of the century.* Environmental assesement report No 2, European Environment Agency, 357-376.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2007). **The state of world fisheries and aquaculture 2006.** Rome.

González, C., Álvarez G. O., Rodríguez, M. L. (1998). *Algas mariñas de Galicia – Biología, gastronomía, industria.*1998. Madrid. Edicións Xerais de Galicia, S. A.

Gelyma - Principes actifs marins de qualité pour la cosmétique
<http://www.gelyma.com/>

Graham, L., Wilcox, L. (2000). *Algae.* USA. Prentice Hall, Inc.

Guiry, D. M.(1984). **Photoperiodic and temperature responses in the growth and tetrasporogenesis of *Gigartina acicularis* (Rhodophyta) from Ireland.** *Helgoländer Meeresunters*, **38**: 335-347.

Haines, K. C., (1975). **Growth of the carrageenan-producing tropical seaweed *Hypnea musciformis* in surface water, 870 m deep water, effluent from a clam mariculture system, and deep water enriched with artificial fertilizers or domestic sewage.** *In* Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, H. A., Kautsky, N., Yarish, C. (Edts). **Integrated mariculture: asking the right questions.** *Aquaculture*, **226**: 69-90.

Henriques, M. (1998). *Manual de Aquacultura*. ICBAS. Lisboa.

Instituto Hidrográfico

<http://www.institutohidrografico.pt/>

Jornal Oficial das Comunidades Europeias L 327/1 DIRECTIVA 2000/60/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Outubro de 2000.

Langton, R. W., Haines, K. C., Lyon, R. E., (1977). **Ammonia-nitrogen production by the bivalve mollusc *Tapes japonica* and its recovery by the red seaweed *Hypnea musciformis* in a tropical mariculture system.** *Helgoland Marine Research*, **30**: 217-229.

Lee, R. E. (1999). *Phycology*. United Kingdom. Cambridge University Press.

Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., Sousa-Pinto, I. (2006). **Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal.** *Aquaculture*, **252**: 31-42.

McHugh, J. D. (2003). *A guide to the seaweed industry* – FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 441. School of Chemistry, University of New South Wales and Australian Defence Force Academy Canberra. ROME.

Naldi, M., Wheeler, P. A., (2002). **¹⁵N Measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): Comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and ¹⁵N accumulation in algal tissue.** *Journal of Phycology*, **38**: 135-144.

Neori, A., Krom, M. D., Ellner, S. P., Boyd, C. E., Popper, D., Rabinovitch, R., Davidson, P. J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D., Gordin, H. (1996). **Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units.** *Aquaculture*, **14**: 183-189.

Neori, A., Shpigel, M., (1999). **Using algae to treat effluents and feed invertebrates in sustainable integrated mariculture.** *World Aquaculture*, **30**: 46-49.

Neori, A., Shpigel, M., Ben-Ezra, D., (2000). **Sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone.** *Aquaculture*, **186**: 279-291.

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, H. A., Kraemer, P. G., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C. (2004). **Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern aquaculture.** *Aquaculture*, **231**: 361-391.

Norusis, M., (2004). *SPSS 13.0 Guide to Data Analysis*. Upper Saddle-River, N.J.: Prentice Hall, Inc.

Norusis, M., (2004). *SPSS 13.0 Statistical Procedures Companion*. Upper Saddle-River, N.J.: Prentice Hall, Inc.

Novaczek, I., Breeman, M. A., Van den Hoek, C., (1989). **Thermal tolerance of *Stypocaulon scoparium* (Phaeophyta, Sphacelariales) from eastern and western shores of the North Atlantic Ocean.** *Helgoländer Meeresunter*, **43**: 183-193.

Ott, F. D., (1965). **Synthetic media and techniques for the xenic cultivation of marine algae and flagellate.** *Journal of Science*, **16**: 205-218.

Pang, S., Lünning, K. (2006). **Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: Effects of intermittent light on growth rate, yield and growth kinetics.** *Journal of Applied Phycology*, **16**: 93-99.

Pereira, R., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. (2006). **The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta).** *Aquaculture*, **252**: 66-78.

Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. (2008). **Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions.** *European Journal of Phycology*, **43(1)**: 107-118.

Pestana, H. M., Gageiro, N. J. (2003). *Análise de dados para Ciências Sociais – A complementaridade do SPSS*. 3ª Edição. Lisboa. Edições Sílabo.

Støttrup, J. G., McEvoy, A. L. (2003). *Live feeds in Marine Aquaculture*. USA. Blackwell Science Ltd.

Subasinghe, R., Currie, D. (2005-2009). *Fisheries Topics: Resources. Main cultured species*. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department (on-line)*. Rome.
<http://www.fao.org/fishery/topic/13531/en>

Troell, M., Halling, C., Nilsson, A., Buschmann, A. H., Kautsky, N., Kautsky, L., (1997). **Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output.** *Aquaculture*, **156**: 45-61.

Troell, M., Rönnbäck, P., Halling, C., Kautsky, N., Buschmann, A., (1999a). **Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture.** *Journal of Applied Phycology*, **11**: 89-97.

Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, H. A., Kautsky, N., Yarish, C. (2003). **Integrated mariculture: asking the right questions.** *Aquaculture*, **226**: 69-90.

Tyler, A. C., McGlathery, K. J., Anderson, I. C. (1994). **Macroalgae mediation of dissolved organic nitrogen fluxes in a temperate coastal lagoon.** *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **53**: 155-168.

Van Den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1995). *Algae - An introduction to phycology*. United Kingdom, Cambridge University Press.

Vieira, R., Pereira, R., Arenas, F., Araújo, R., Sousa-Pinto, I. (2008). *Guia de Campo – Espécies intertidais características da costa norte de Portugal. Praias Rochosas*. Mobidic - Programa Escolar de Monitorização da Biodiversidade Intertidal e Divulgação Científica.

Weinberger, F., Hoppe, H. G., Friedlander, M., (1997). **Bacterial induction and inhibition of a fast necrotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta).** *Journal of Applied Phycology*, **9**: 277-285.

Yarish, C., Pereira. R. (2008). *Mass Production of Marine Macroalgae*. In Sven Erik Jørgensen and Brian D. Fath (Editor-in-Chief), *Ecological Engineering*. Vol. 3 of *Encyclopedia of Ecology*, 5 vols. pp. 2236-2247. Oxford. Elsevier.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

8. ANEXOS

8.1. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da *C. acicularis* a diferentes temperaturas e na presença/ausência de arejamento

O Quadro 6 apresenta os testes de homogeneidade de variâncias (*Levene*) e o teste-*t* de comparação das taxas de crescimento médio, para as duas amostras. O teste de *Levene* é o que nos permite testar a hipótese nula de que duas populações têm a mesma variância. Neste caso específico, conclui-se que como $\text{sig}=0,038 < 0,05$, então rejeita-se a hipótese nula de variâncias iguais.

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (<i>p-value</i>)	T	Df	Significância (p) bilateral	
Variâncias supostas Iguais	5,727	0,038	0,016	10	0,987	-
Variâncias supostas diferentes			0,016	6,922	0,987	$p > 0,05$
p > 0,05 = Não existem diferenças na taxa de crescimento médio para os dois tipos de arejamento (presente e ausente).						

QUADRO 5. Teste-*t* para duas condições independentes.

Quanto à significância bilateral (diferença em qualquer uma das direções) observada (0,987) e, assumindo a não igualdade das variâncias, pode-se concluir que esta é superior a 0,05, o que permite não rejeitar a hipótese nula, ou seja, não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento médio, para os dois tipos de arejamento (presença e ausência).

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (<i>p-value</i>)	T	df	Significância (p) bilateral	
Variâncias supostas Iguais	0,439	0,522	-4,557	10	0,001	$p < 0,05$
p < 0,05 = Existem diferenças na taxa de crescimento médio para os dois tipos de temperatura (10 ou 18°C).						

QUADRO 6. Teste-*t* para duas condições independentes.

Variável dependente: Taxa de crescimento			
Fonte	F	Significância (<i>p-value</i>)	Resultado
Modelo Corrigido	10,28	0,004	
Intercepção	8,328	0,020	
Arejamento	0,001	0,975	p > 0,05
Temperatura	26,22	0,001	p < 0,05
Arejamento*temperatura	4,625	0,064	p > 0,05
a R ² =0,794 (R ² ajustado = 0,717)			

QUADRO 7. ANOVA com dois factores fixos.

Pela análise do Quadro 6 verifica-se que como sig=0,975>0,05, então não existem diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento médio no que diz respeito à presença/ausência de arejamento. Quanto à temperatura, como sig=0,001<0,05, então existem diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento médio para as diferentes temperaturas (10 e 18°C). Por fim, como sig=0,064>0,05, então não existem diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento médio, para a interacção temperatura com presença/ausência de arejamento.

8.2. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes intensidades luminosas na presença/ausência do meio VSE

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (<i>p-value</i>)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0,119	0,741	-0,889	6	0,408	p>0,05
p> 0,05 = Não existem diferenças na taxa de crescimento médio para 50 e 150 µmol fotões m ⁻² s ⁻¹ .						

QUADRO 8. Teste-t para duas condições independentes.

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (<i>p-value</i>)	t	df	Significância (p) (2-tailed)	
Variâncias supostas Iguais	0,251	0,634	-3,952	6	0,008	p< 0,05
p< 0,05 = Existem diferenças na taxa de crescimento médio da alga quando sujeita à ausência/presença de meio de cultivo.						

QUADRO 9. Teste-t para duas condições independentes.

Variável dependente: taxa de crescimento			
Fonte	F	Significância (p)	Resultado
Modelo Corrigido	6,949	0,046	
Intercepção	19,694	0,011	
Intensidade Luminosa	2,103	0,221	p > 0,05
Meio de cultivo	17,952	0,013	p < 0,05
Intensidade Luminosa*meio de cultivo	0,002	0,966	p > 0,05
a R ² =0,839 (R ² ajustado= 0,718)			

QUADRO 10. ANOVA com dois factores fixos.

8.3. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes temperaturas e com diferentes intensidades luminosas.

ANOVA					
Taxa de Crescimento					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrada	F	Significância
Entre grupos	8,099	2	4,050	2,210	0,144
Dentro grupos	27,482	15	1,832		
Total	35,582	17			

QUADRO 11. ANOVA com um factor.

Pela análise dos dados, a significância é de 0,144, ou seja, superior a 0,05. Logo a hipótese nula não é rejeitada, isto é, não existem diferenças estatisticamente significativas entre a taxa de crescimento da espécie *S. scoparium* atendendo às diferentes temperaturas (10°C, 15°C e 20°C) a que a espécie é submetida.

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0,001	0,971	-1,776	16	0,095	p > 0,05
p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento médio, para os dois tipos de intensidade luminosa (50 ou 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$).						

QUADRO 12. Teste-t para duas condições independentes.

Variável dependente: taxa de crescimento			
Fonte	F	Significância (p)	Resultado
Modelo Corrigido	1,602	0,233	
Intercepção	93,832	0,000	
Intensidade Luminosa	2,277	0,145	p> 0,05
Temperatura	3,294	0,095	p> 0,05
Intensidade Luminosa* temperatura	0,080	0,924	p> 0,05
a R ² =0,400 (R ² ajustado= 0,150)			

QUADRO 13. ANOVA com dois factores fixos.

8.4. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes salinidades

ANOVA - Taxa de crescimento					
	Soma dos Quadrados	df	Média Quadrada	F	Significância
Entre Grupos	34,044	4	8,511	26,629	,000
Dentro Grupos	3,196	10	,320		
Total	37,241	14			

QUADRO 14. ANOVA com um factor.

Como sig=0,000<0,05 rejeita-se H₀, ou seja, existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento, em média, das algas a diferentes salinidades. Com o intuito de identificar os pares de valores de salinidades onde ocorrem as diferenças estatisticamente significativas, procedemos ao teste de Tukey.

Múltiplas comparações; Variável dependente: Taxa de crescimento; Tukey HSD							Resultado Interpretação
(I) salinidade	(J) salinidade	Diferença Média (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
0	10	-2,1159(*)	,4616	,007	-3,635	-,5967	Existem diferenças entre a salinidade de 0ppm e todas as outras salinidades.
	20	-3,9631(*)	,4616	,000	-5,482	-2,444	
	36	-4,0717(*)	,4616	,000	-5,590	-2,552	
	46	-3,1942(*)	,4616	,000	-4,713	-1,675	
10	0	2,1159(*)	,4616	,007	,596	3,635	Existem diferenças entre
	20	-1,8472(*)	,4616	,017	-3,366	-,328	

	36	-1,9558(*)	,4616	,012	-3,475	-,436	10 ppm e as salinidades de 0, 20 e 36ppm. Não existem entre 10 ppm e 46 ppm.
	46	-1,0783	,4616	,211	-2,597	,440	
20	0	3,9631(*)	,4616	,000	2,444	5,482	Existem diferenças entre 20 ppm e as salinidades de 0 e 10 ppm. Entre 20 ppm e as salinidades de 36 e 46 ppm não existem diferenças.
	10	1,8472(*)	,4616	,017	,328	3,366	
	36	-,1085	,4616	,999	-1,627	1,410	
	46	,7689	,4616	,493	-,750	2,288	
36	0	4,0717(*)	,4616	,000	2,552	5,590	Existem diferenças entre 36 ppm e as salinidades de 0 e 10 ppm. Não existem entre 36 ppm e as salinidades de 20 e 46 ppm.
	10	1,9558(*)	,4616	,012	,436	3,475	
	20	,1085	,4616	,999	-1,410	1,627	
	46	,8775	,4616	,375	-,641	2,396	
46	0	3,1942(*)	,4616	,000	1,675	4,713	Existem diferenças entre 46 ppm e 0 ppm. Não existem entre 46 ppm e as salinidades de 10, 20, 36 ppm.
	10	1,0783	,4616	,211	-,440	2,597	
	20	-,7689	,4616	,493	-2,288	,750	
	36	-,8775	,4616	,375	-2,396	,641	
* The mean difference is significant at the .05 level.							

QUADRO 15. Teste Post Hoc de *Tukey*.

8.5. Tratamento estatístico para a determinação da taxa de crescimento da *S. scoparium* a diferentes densidades de cultivo e com diferentes intensidades luminosas.

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (<i>p-value</i>)	t	df	Significância (<i>p-value</i>) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	3,073	0,091	0,035	28	0,973	p>0,05
p > 0,05 = Não existem diferenças na taxa de crescimento médio para as diferentes intensidades luminosas.						

QUADRO 16. *Teste-t* para duas condições independentes.

ANOVA - Taxa de Crescimento					
	Soma dos quadrados	df	Média quadrada	F	Significância (p-value)
Entre grupos	100,786	4	25,197	20,565	0,000
dentro de grupos	30,630	25	1,225		
Total	131,416	29			

QUADRO 17. ANOVA com um factor.

Como $\text{sig}=0,000 < 0,05$ rejeita-se H_0 , ou seja, existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento, em média, das algas a diferentes densidades de cultivo.

Variável dependente: taxa de crescimento			
Fonte	F	Significância (p)	Resultado
Modelo Corrigido	9,845	0,000	
Intercepção	219,613	0,000	
Fluxo de fotões	0,005	0,946	$p > 0,05$
Densidades de cultivo	20,822	0,000	$p < 0,05$
Fluxo de fotões * densidades	1,327	0,294	$p > 0,05$
a $R^2=0,816$ (R^2 ajustado= 0,733)			

QUADRO 18. ANOVA com dois factores fixos.

Comparações Múltiplas; Variável dependente: Taxa de crescimento; Tukey HSD							
(I) id_densidade	(J) id_densidade	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado Interpretação
					Lower Bound	Upper Bound	
0,1	0,3	1,6588(*)	,63511	,106	-0,2417	3,5593	Existem diferenças entre a densidade de 0,1 e todas as densidades excepto para 0,3.
	0,6	4,3779(*)	,63511	,000	2,4774	6,2784	
	1,5	3,7703(*)	,63511	,000	1,8698	5,6707	
	3	4,8780(*)	,63511	,000	2,9775	6,7785	
0,3	0,1	-1,6588	,63511	0,106	-3,5593	0,2417	Existem diferenças entre a densidade de 0,3 e todas as densidades, excepto para 0,1.
	0,6	2,7191 (*)	,63511	0,003	0,8186	4,6195	
	1,5	2,1114 (*)	,63511	0,025	0,2110	4,0119	
	3	3,2192 (*)	,63511	0,001	1,3187	5,1197	
0,6	0,1	-4,3779 (*)	,63511	0,000	-6,2784	-2,4774	Existem diferenças entre a densidade de 0,6 e as de 0,1 e 0,3. Não existem entre 0,6 e as densidades de 1,5 e 3.
	0,3	-2,7191 (*)	,63511	0,003	-4,6195	-0,8186	
	1,5	-0,6076	,63511	0,871	-2,5081	1,2929	
	3	0,5001	,63511	0,931	-1,4004	2,4006	
1,5	0,1	-3,7703(*)	,63511	,000	-5,6707	-1,8698	Existe diferenças entre a

	0,3	-2,1114(*)	,63511	,025	-4,0119	-0,2110	densidade de 1,5 e as de 0,1 e 0,3. Não existem entre 1,5 e as densidades de 0,6 e 3.
	0,6	0,6076	,63511	,871	-1,2929	2,5081	
	3	1,1077	,63511	,431	-0,7927	3,0082	
3	0,1	-4,8780(*)	,63511	,000	-6,7785	-2,9775	Existe diferenças entre a densidade de 3 e as de 0,1 e 0,3. Não existem entre 3 e as densidades de 0,6 e 1,5.
	0,3	-3,2192	,63511	,001	-5,1197	-1,3187	
	0,6	-,5001	,63511	,931	-2,4006	1,4004	
	1,5	-1,1077	,63511	,431	-3,0082	0,7927	
* The mean difference is significant at the .05 level.							

QUADRO 19. Teste Post Hoc de Tukey.

8.6. Tratamento estatístico para a avaliação da remoção de diferentes nutrientes da água pela espécie *S. Scoparium*

NH ₄ *NO ₃	Tempo (em minutos)	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
		F	Sig. (p-value)	T	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0	4,017	0,116	-1,961	4	0,121	p > 0,05
	240	0,049	0,836	-1,917	4	0,128	p > 0,05
	1440	3,638	0,129	-8,262	4	0,001	p < 0,05
p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas.							
p < 0,05 = Existem diferenças estatisticamente significativas.							

QUADRO 20. Teste-t para duas condições independentes.

NH ₄ starved* NO ₃ starved	Tempo (em minutos)	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
		F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0	0,324	0,599	2,666	4	0,056	p > 0,05
	240	0,647	0,466	-6,352	4	0,003	p < 0,05
	1440	8,673	0,042	-3,059	4	-	-
Variâncias supostas diferentes	0						
	240						
	1440			-2,358	2,00	0,092	p > 0,05
p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas.							
p < 0,05 = Existem diferenças estatisticamente significativas.							

QUADRO 21. Teste-t para duas condições independentes.

NO ₃ * NO ₃ Controle	Tempo (em minutos)	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
		F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0	0,013	0,915	6,270	3	0,087	p > 0,05
	240	0,064	0,817	-2,330	3	0,102	p > 0,05
	1440	5,279	0,105	-25,562	3	0,000	p < 0,05

p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas.
p < 0,05 = Existem diferenças estatisticamente significativas.

QUADRO 22. Teste-t para duas condições independentes.

NH ₄ * NH ₄ Controle	Tempo (em minutos)	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
		F	Sig. (p-value)	T	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0	1,120	0,368	-0,237	3	0,828	p > 0,05
	240	1,690	0,284	-4,122	3	0,026	p < 0,05
	1440	4,974	0,112	-16,177	3	0,001	p > 0,05

p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas.
p < 0,05 = Existem diferenças estatisticamente significativas.

QUADRO 23. Teste-t para duas amostras independentes.

8.7. Tratamento estatístico para avaliação da remoção de diferentes nutrientes da água pela espécie *S. Scoparium* ao longo do tempo

NO ₃ inicial*NH ₄ inicial	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	1,722	0,203	1,535	22	0,139	p > 0,05

p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento médio, para as duas concentrações iniciais de nutrientes.

QUADRO 24. Teste-t para duas condições independentes.

NO ₃ final*NH ₄ final	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	17,308	0,000	-0,218	16	0,829	-
Variâncias supostas diferentes			-0,218	11,562	0,831	p > 0,05

p > 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento médio, para as duas concentrações finais de nutrientes.

QUADRO 25. Teste-t para duas condições independentes.

NO ₃ Final*NO ₃ Controlo	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p-value) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	0,520	0,480	-14,642	18	0,000	p < 0,05

p < 0,05 = Existem diferenças na taxa de crescimento médio para as diferentes intensidades de fluxo de fotões.

QUADRO 26. Teste-t para duas condições independentes.

NH ₄ final*NH ₄ controlo	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste-t para igualdade das médias			Resultado
	F	Sig. (p-value)	t	df	Significância (p) (bilateral)	
Variâncias supostas Iguais	19,525	0,000	-29,154	18	0,000	-
Variâncias supostas diferentes			-23,562	7,080	0,000	p < 0,05

p < 0,05 = Não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento médio, para as duas concentrações finais de nutrientes.

QUADRO 27. Teste-t para duas condições independentes.

8.8. Tratamento estatístico para avaliar o efeito das diferentes concentrações de nutrientes na taxa de crescimento de *S. Scoparium*

ANOVA - Taxa de Crescimento					
	Soma dos quadrados	df	Média quadrada	F	Significância (<i>p-value</i>)
Entre grupos	5,507	5	1,101	0,367	0,865
Dentro de grupos	54,028	18	3,002		
Total	59,535	23			

QUADRO 28. ANOVA com um factor.

Como $\text{sig}=0,865 > 0,05$ não se rejeita H_0 , ou seja, não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento, em média, das algas a diferentes concentrações de nutrientes.