

Optimização da produção de *Pavlova lutheri* com diferentes meios nutritivos e cultura de larvas de amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) com microalgas de composição controlada

Pedro Nuno Alexandre Nascimento da Fonseca

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos

Pedro Nuno Alexandre Nascimento da Fonseca

Optimização da produção de *Pavlova lutheri* com diferentes meios nutritivos e cultura de larvas de amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) com microalgas de composição controlada

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

Orientador – Ana Maria Otero Casal
Professora Titular do Dep. De Microbiología y Parasitología
Universidad de Santiago de Compostela

Co-orientador – António Manuel dos Santos Afonso
Professor Associado
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prefácio

Os trabalhos descritos neste documento foram realizados entre os meses de Janeiro e Junho de 2010 na Universidade de Santiago de Compostela e no “Instituto Galego de Formación en Acuicultura” (IGaFA). Durante esse período foram realizados dois trabalhos: um sobre a melhoria da produção de microalgas marinhas e outro sobre a produção de larvas de moluscos bivalves.

Agradecimentos

Chegado o fim de mais um patamar académico, apenas posso expressar a minha satisfação e alegria por tudo o que aprendi e vivi, pelo que gostava de agradecer:

À minha orientadora, Ana Otero, que se mostrou disponível para me orientar desde o primeiro momento, tornando possível a minha ida para a Galiza. Por me ter dado a possibilidade de trabalhar no mundo das microalgas e por me ter ensinado a fazer ciência com gosto e dedicação.

Ao meu co-orientador, António Afonso, por me ter aberto a primeira porta para a Galiza. Por me ter dado o apoio necessário para a minha partida e por me ter ajudado na recta final.

Ao Pedro Seixas por ter sido fundamental nesta grande aventura. Pela companhia nas horas de trabalho, pela ajuda incondicional, apoio, motivação e exemplo. Nunca esquecendo a amizade que se criou.

Ao director do I.Ga.F.A. Miguel Lastres, e professoras do mesmo, Maica e Helena, por terem possibilitado o meu trabalho no Instituto, com as melhores condições possíveis. Agradeço também a sua disponibilidade para me acompanharem sempre que necessitei, e por tudo o que me ensinaram sobre a produção de larvas de moluscos.

Aos meus pais por me terem proporcionado sempre a melhor educação e por me terem acompanhado e apoiado sempre ao longo da minha vida.

À Marta por toda a ajuda e apoio nesta etapa da minha vida.

A todos aqueles que directa ou indirectamente fizeram parte dos bons momentos vividos na Galiza.

Resumo

Actualmente, a produção de microalgas em empresas de aquacultura pode representar de 15 a 85% do total dos custos de produção dependendo do método e da escala de cultura. A produção de microalgas em sistemas descontínuos, ou *batch*, continua a ser a metodologia mais corrente, apesar das inúmeras desvantagens que apresenta, tais como: baixas produtividades, falta de controlo da composição bioquímica da biomassa, elevada contaminação microbiológica, mão-de-obra elevada, etc. Das microalgas usadas em aquacultura, *Pavlova lutheri* é usada extensivamente na produção de moluscos bivalves devido ao seu elevado teor em PUFA's, especialmente EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3), essenciais para o desenvolvimento de animais marinhos. A produção de microalgas em sistemas contínuos ou semi-contínuos apresenta-se como uma forte alternativa à produção em *batch*, devido às maiores produtividades, possibilidade de modulação da composição bioquímica da biomassa e, estabilidade da densidade celular que se repercute igualmente na qualidade nutricional. A disponibilidade de fotobiorreactores altamente eficientes, desenvolvidos para outras aplicações biotecnológicas, que podem ser adaptados para a produção de um maior leque de microalgas para aquacultura, requerem uma melhor formulação dos meios disponíveis para a produção das espécies marinhas utilizadas neste campo, que permitam realizar na sua totalidade a potencialidade destes sistemas altamente eficientes.

No presente trabalho testaram-se quatro meios nutritivos diferentes para a produção de *Pavlova lutheri* variando a complexidade da composição em oligonutrientes e vitaminas: ALGAL (meio comercial e referência no laboratório da USC, sendo este o grupo controlo), ABONO, ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM. As culturas foram feitas em tubos com 80 mL de volume, em regime semi-contínuo (taxa de renovação diária de 25% do volume total), com uma concentração final de NO_3^{-2} de 8 mM e fotoperíodo de 12h:12h (luz/escuridão). Analisou-se o crescimento e produtividade desta espécie e a composição bioquímica da biomassa recolhida durante a fase de estabilização celular.

A suplementação do meio ALGAL com os micronutrientes e vitaminas do meio OHM (para microalgas de água doce) permitiu duplicar a densidade celular de *Pavlova lutheri* em regime descontínuo ($74,4 \times 10^6$ células mL^{-1}) e manter densidades de estabilização de $34,4 \times 10^6$ células mL^{-1} em regime semi-contínuo. As densidades celulares atingidas nos outros meios foram mais baixas em ambos os regimes, descontínuo e semi-contínuo: $34,6 \times 10^6$ e $21,4 \times 10^6$ células mL^{-1} , respectivamente, no meio ALGAL; $29,4 \times 10^6$ e $21,9 \times 10^6$ células mL^{-1} no grupo ABONO+OLIGO; e $13,4 \times 10^6$ e $3,3 \times 10^6$ no grupo ABONO. Em relação ao perfil de ácidos gordos da biomassa dos diferentes grupos, o grupo

ALGAL+OHM apresentou o maior teor (51,7%), que os grupos ALGAL e ABONO+OLIGO (44,1 e 46,2 %, respectivamente).

No presente trabalho focou-se também a cultura de larvas de moluscos bivalves para aquacultura. A espécie *Ruditapes philippinarum* é um molusco bivalve com elevado valor comercial e das mais produzidas a nível mundial. Desde a década de 90 houve um aumento exponencial na sua produção, que atingiu em 2006 os 3 milhões de toneladas.

Testou-se, em triplicado, o efeito de duas dietas à base de microalgas com composição bioquímica controlada, sobre o crescimento e sobrevivência de larvas de *Ruditapes philippinarum*. A dieta CONTROL estava composta por uma mistura de *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros* sp., e a dieta RHODO pela mesma mistura microalgal, substituindo-se 25% do peso seco da dieta pela criptófita *Rhodomonas lens*. Esta espécie, até ao momento, não foi utilizada para o cultivo de moluscos, mas trabalhos prévios demonstraram o seu enorme potencial para o cultivo de outras espécies como *Artemia* sp. e de rotíferos, havendo também trabalhos anteriores que referem o potencial das criptófitas como suplemento de dietas para moluscos. As larvas foram produzidas em tanques cónicos de fibra de vidro com 220 L de capacidade em sistema fechado, com uma densidade inicial de 8 larvas mL⁻¹. A cada 48-72h mudouse a água, filtraram-se as larvas, efectuaram-se medições (30 indivíduos por tanque) e foi repostado alimento. Nos dias 2, 10 e 22 após a fecundação foram feitas amostragens para análises da composição bioquímica das larvas.

A substituição de 25% da dieta “standard” com a microalga *Rhodomonas lens* para a amêijoia japonesa com a microalga *Rhodomonas lens* originou maior crescimento e sobrevivência das larvas, tendo as larvas pedivelígeras atingido 219 ± 16 µm no grupo RHODO e 204 ± 14 µm no grupo CONTROL (P <0,05) antes da fixação, com 1,5% e 0,4% de sobrevivência, respectivamente. O teor de PUFA das larvas do grupo RHODO (32,6%) foi também superior ao grupo CONTROL (26,2%).

Os resultados obtidos demonstram o potencial de *R. lens* para o cultivo de larvas de amêijoia japonesa, pelo que seria interessante testar outras percentagens de substituição de dietas “standard” com esta microalga e avaliar o potencial para a cultura de outros moluscos.

Abstract

Nowadays, the production of microalgae in aquaculture processes may reach from 15 to 85% of the total production costs, depending on the methodologies used and the scale of the culture. Microalgae batch production is still the main methodology employed, despite its many disadvantages such as: low productivity, lack of control regarding biomass biochemical composition, high microbiological contamination and intensive labour needs, among others. Among most microalgae commonly used in aquaculture, *Pavlova lutheri* is the most extensively used in bivalve molluscs due to its high PUFAs content, mostly EPA and DHA, which are essential to marine animals. Microalgae production in continuous and semi-continuous systems is actually a proper alternative to batch production, because higher yields can be reached, it allows the modulation of biomass's biochemical composition and cell density stability, which also affects the nutritional quality. The availability of high efficient photobiorreactors developed for other biotechnological applications, which can be adapted for the production of microalgae for aquaculture, requires a better formulation of the culture mediums available for the production of marine species used in this field, sufficient in its entirety potential of these highly efficient systems.

In this study we tested four different nutrient media for the production of *Pavlova lutheri*, with variations in the complexity of composition in vitamins and oligonutrients: ALGAL, ABONO, ABONO+OLIGO, ALGAL+OHM. Cultures were grown in tubes with 80 mL of volume, in semi-continuous (daily renewal rate of 25%), with a final concentration of 8 mM NO₃ and photoperiod of 12h: 12h (light / dark). The growth, productivity and biochemical composition of microalgae biomass collected during the stabilization phase cell were analyzed.

Results have shown that the ALGAL medium supplemented with micronutrients and vitamins of the OHM medium (designed for freshwater microalgae) originated twice cell density of *Pavlova lutheri* under discontinuous system (74.4×10^6 cells mL⁻¹) in comparison with other groups, and a density of 34.4×10^6 cells mL⁻¹ in the steady state. The cell density achieved in remaining groups was lower in both batch and semi-continuous systems: 34.6×10^6 and 21.4×10^6 cells mL⁻¹ (ALGAL) and 29.4×10^6 and 21.9×10^6 cells mL⁻¹ (ABONO+OLIGO), 13.4×10^6 and 3.3×10^6 (ABONO). Regarding the fatty acid profile of *P. lutheri*, the level of PUFAs was higher in the group ALGAL+OHM (51.7%) than in groups ALGAL and ABONO+OLIGO (44.1 and 46.2% respectively).

The present study also focused on the culture of bivalve molluscs larvae for aquaculture. Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) is a bivalve mollusc with a high

commercial value and one of the most produced species worldwide, having reached 3 million tonnes in 2006.

In this work an evaluation of the effect of two different microalgae diets in the growth and survival of *Ruditapes philippinarum* larvae was done. The standard diet consisted of a mixture of *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros* sp., whereas in RHODO diet 25% of the diet (expresses in dry weight) was substitute by the cryptophyta *Rhodomonas lens*. So far, this species was not used for molluscs production, although previous studies have demonstrated its enormous nutritional potential for the growing of other species such as *Artemia* sp. Larvae D of Manila clam were grown in closed system tanks (200 L), with an initial density of 8 larvae mL⁻¹. The water was changed each 48-72h and the larvae were filtered and measured (30 individuals per tank). Samples were collected for biochemical analysis after 2, 10 and 22 days of fecundation.

The replacement of 25% of the standard diet by *R. lens* resulted in a higher growth of Manila clam larvae, reaching larvae pediveliger 219 ± 16 µm in comparison to 204 ± 14 µm of the control (P <0,05). Differences in survival were also observed between the RHODO and the control group, with 1.5% and 0.4%, respectively. The content of PUFAs in the RHODO group (32.6%) was also higher than the control group (26.2%).

The results show the potential of *R. lens* in the production of clams' larvae. It would be interesting to test different percentages of replacement of the "standard" diets with this microalga.

Resumen

La producción de microalgas en las empresas de acuicultura puede representar 15-85% de los costes totales de producción en función del método y la escala de cultivo. La producción de microalgas en los sistemas discontinuos, o *batch*, sigue siendo el método más común, a pesar de las muchas desventajas que presenta, tales como la baja productividad, la falta de control de la composición bioquímica de la biomasa, la elevada contaminación microbiana, elevada mano de obra, etc. Entre las especies de microalgas comúnmente en acuicultura, *Pavlova lutheri* es ampliamente utilizada en la producción de moluscos, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente EPA y DHA, esenciales para los animales marinos. La producción de microalgas en sistemas continuos o semicontinuos constituye una fuerte alternativa a la producción en *batch*, debido a mayores rendimientos, la posibilidad de modulación de la composición bioquímica de la biomasa y la estabilidad de la densidad celular que afecta también a la calidad nutricional. La disponibilidad de diferentes diseños de fotobiorreactores de alta eficiencia desarrollados para otras aplicaciones biotecnológicas, que se puede adaptar para la producción de microalgas para la acuicultura, requiere una mejor formulación de los medios de cultivo disponibles para la producción de especies marinas utilizadas en este campo, que permita el total aprovechamiento del potencial de estos sistemas de alta eficiencia.

En este estudio se probaron cuatro medios de cultivo diferentes para la producción de *Pavlova lutheri* cambiando la complejidad de la composición de los oligonutrientes y vitaminas: ALGAL, ABONO, ABONO+OLIGO y ALGAL+OHM. Los cultivos se hicieron en tubos con 80 mL de volumen, en régimen semicontinuo (tasa de renovación diaria de 25%), con una concentración final de 8 mM de NO₃ en todos ellos y sometidos a un fotoperíodo de 12h: 12h (luz/oscuridad). Se analizó el crecimiento, la productividad y la composición bioquímica de la biomasa de microalgas recogida durante la fase de estabilización celular. La suplementación del medio ALGAL con micronutrientes y vitaminas del medio de agua dulce – OHM- dio lugar a una duplicación de la densidad celular de *Pavlova lutheri* en régimen discontinuo, 74,4 x 10⁶ células mL⁻¹ y mantener densidades de 34,4 x 10⁶ células mL⁻¹ en semicontinuo. La densidad celular alcanzada con otros medios fue menor en ambos los regímenes *batch* y semicontinuo: 34,6 x 10⁶ y 21,4 x 10⁶ células mL⁻¹ (ALGAL), 29,4 x 10⁶ y 21,9 x 10⁶ células mL⁻¹ (ABONO+OHM), 13,4x10⁶ y 3,3x10⁶ (ABONO). En cuanto a los PUFAs, también se observó un contenido más alto en el grupo ALGAL+OHM (51,7%) que en el grupos ALGAL y ALGAL+OHM (44,1 y 46,2% respectivamente).

En el presente estudio también se abordó el cultivo de larvas de moluscos bivalvos para la acuicultura aplicando las técnicas de cultivo continuo de microalgas que permiten la obtención de biomasa de perfil nutricional optimizado. La almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) es un molusco bivalvo de gran valor comercial, siendo uno de los que más se produce en todo el mundo. Desde los años 90 hubo un aumento exponencial en su producción, que en 2006 alcanzó los 3 millones de toneladas.

Se analizó el efecto de dos dietas a base de microalgas de composición bioquímica mejorada sobre el crecimiento y la supervivencia de larvas de *Ruditapes philippinarum*. La dieta control consistió en una mezcla de *Isochrysis galbana*, *Monochrysis (Pavlova) lutheri* y *Chaetoceros* sp., mientras que la dieta RHODO se basó en la misma mezcla sustituyéndose un 25% de la dieta (en peso seco) por la criptófita *Rhodomonas lens*. Esta especie no ha utilizado hasta ahora de forma generalizada para el cultivo de moluscos, aunque estudios anteriores han demostrado su enorme potencial para el cultivo de otras especies, como *Artemia* sp. El cultivo de las larvas de almeja se hizo en tanques troncocónicos de fibra de vidrio con capacidad de 220 L, por triplicado, en sistema cerrado y con una densidad inicial de 8 larvas mL⁻¹. Cada 48/72h se renovó el agua, se filtraron todas las larvas, se midieron 30 individuos por tanque y se reemplazó el alimento con biomasa microalgal fresca. A los 2, 10 y 22 días de la fecundación se tomaron muestras para realizar análisis de composición bioquímica de las larvas.

Se observó un mejor crecimiento y supervivencia de las larvas de almeja japonesa con la sustitución del 25% de la dieta control por *R. lens*. Las larvas pediveliger alcanzaron $219 \pm 16,3 \mu\text{m}$ en el grupo RHODO en comparación con los $204 \pm 13,8 \mu\text{m}$ del grupo control, antes de la fijación, registrándose una supervivencia del 1,5% y 0,4%, respectivamente. El contenido de PUFAs en las larvas del grupo RHODO (32,6% del total de ácidos grasos) también fue superior al de las larvas del grupo control (26,2%).

Los resultados obtenidos indican el potencial de *R. lens* para el cultivo de larvas de almejas, por lo que sería interesante probar otros porcentajes de sustitución de dietas estándar con esta microalga, además de evaluar su potencial para el cultivo de otros moluscos.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Microalgas.....	2
1.1.1 Noções gerais	2
1.1.2 Uso de microalgas na aquacultura	2
1.1.3 Produção de microalgas.....	3
1.1.5 A microalga marinha <i>Pavlova lutheri</i>	8
1.2 Moluscos Bivalves	10
1.2.1 Noções gerais	10
1.2.2 Situação global.....	11
1.2.3 Produção de moluscos bivalves.....	13
1.2.4 Amêijoia japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>).....	17
OBJECTIVOS	20
2. Material e Métodos	21
2.1 <i>Pavlova lutheri</i>	22
2.1.1 Produção da microalga marinha <i>Pavlova lutheri</i>	22
2.1.2 Contagem celular e obtenção de biomassa para análises	24
2.1.3 Peso seco celular	25
2.1.4 Análise estatística.....	25
2.2 Cultura de larvas de Amêijoia japonesa.....	26
2.2.1 Dieta: cultura de microalgas	26
2.2.2 Acondicionamento, indução da desova e incubação de Amêijoia japonesa	26
2.2.3 Criação de larvas de <i>Ruditapes philippinarum</i>	28
2.3 Análise da composição bioquímica.....	33
2.3.1 Ácidos gordos.....	33
2.3.2 Carbono-Nitrogénio	34
2.3.3 Proteína.....	34
3. Resultados	35
3.1 Produção de <i>Pavlova lutheri</i>	36
3.1.1 Densidades celulares da microalga marinha <i>Pavlova lutheri</i>	36
3.1.2 Peso seco da biomassa e peso celular.....	38

3.1.3 Composição bioquímica da microalga marinha <i>Pavlova lutheri</i> em diferentes meios de cultura	41
3.2. Produção de Amêijoia japonesa.....	43
3.2.1 Crescimento das microalgas e dieta	43
3.2.2 Larvas: sobrevivência e crescimento	45
3.2.3 Composição bioquímica	48
4. Discussão de resultados.....	54
4.1 Produção de <i>Pavlova lutheri</i>	55
4.2 Amêijoia japonesa	60
4.2.1 Produção de microalgas e dieta.....	60
4.2.2 Larvas <i>Ruditapes philippinarum</i>	62
5. Conclusões	66
6. Referências Bibliográficas	68

1. Introdução

1.1 Microalgas

1.1.1 Noções gerais

As microalgas são organismos eucariotas fotossintéticos, que aproveitam a energia solar para sintetizar matéria orgânica a partir de substratos inorgânicos como sais solúveis, dióxido de carbono e água. A sua eficiência fotossintética é 2 a 5 vezes maior que a das plantas superiores (Thomas *et al.*, 1984). Apresentam elevadas taxas de produção, adaptando-se a condições ambientais distintas, podem ser encontradas em qualquer meio aquático onde exista uma fonte de carbono, nutrientes, luz suficiente e a temperatura se encontre dentro dos valores apropriados (Shelef e Soeder, 1980). No meio aquático, marinho ou limnológico, existe uma grande diversidade de microalgas representada por milhares de espécies que possuem um enorme potencial como fonte de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e minerais.

Actualmente as microalgas são organismos de grande importância económica, uma vez que são utilizadas como fonte de determinadas substâncias em produtos cosméticos e farmacêuticos (β -caroteno, astaxantina, ácidos gordos, pigmentos, flavonóides, ficobilinas, polissacarídeos, enzimas, tocoferol, etc.), no enriquecimento de alimentos tanto para consumo humano como animal, desempenhando também um papel fundamental na aquacultura (Spolaore *et al.*, 2006).

1.1.2 Uso de microalgas na aquacultura

As microalgas são a base da cadeia trófica em muitos processos da aquacultura. São usadas directamente como alimento de todas as fases de crescimento de moluscos bivalves e gastrópodes (Brown *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 2002), e indirectamente nas fases larvares de crustáceos e peixes em maternidades de aquacultura (Reitan *et al.*, 1997; Piña *et al.*, 2006). São igualmente importantes para o cultivo e enriquecimento de presas vivas utilizadas em aquacultura, como rotíferos e *Artémia* (Støttrup e Jensen, 1990; Støttrup, 2003).

Verificou-se que a produção das larvas de peixes em “águas verdes” melhora a sua sobrevivência, crescimento e factor de conversão alimentar em mais de 40 espécies, quando comparadas com condições de “águas transparentes” (revisito por Müller-Feuga *et al.*, 2003).

A prática de águas verdes consiste em adicionar microalgas ao tanque de produção de larvas de peixes, juntamente com rotíferos, para manter o enriquecimento destes, o que pode aumentar a sobrevivência em 100-500% em espécies difíceis de produzir em “águas transparentes” (Naas *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1993; Papandroulakis *et al.*, 2002). As razões destes efeitos positivos não são bem evidentes, no entanto estes autores sugerem que as microalgas ajudam na estabilização e melhoramento dos parâmetros da água, aumentam o contraste das presas com a luz, podem servir directa ou indirectamente de alimento, estimulam processos fisiológicos ou a ingestão de presas, regulam o crescimento bacteriano oportunista por acção antibacteriana ou probiótica e incrementam a quantidade e a qualidade das presas vivas (Müller-Feuga *et al.*, 2003).

O valor nutricional das microalgas está geralmente associado à sua composição bioquímica, especialmente ao seu conteúdo lipídico e à composição em ácidos gordos (AG) (Tompson *et al.*, 1996). A sua composição bioquímica é variável em função da espécie, sendo que em condições normais de produção se admite que os valores de proteína possam alcançar 60% do seu peso seco, os lípidos entre 7 e 23% e os hidratos de carbono entre 5 e 23% (Becker, 2004). Variando determinados factores como luz, concentração de nutrientes e temperatura pode-se manipular de forma considerável a proporção de proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Otero e Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 2002; Fábregas *et al.*, 2004).

1.1.3 Produção de microalgas

A produção de microalgas fotossintéticas deve ter em conta vários factores como: luz, temperatura, concentração e formulação de nutrientes, pH, condições fisiológicas das microalgas e concentração de CO₂ e O₂. Na produção de microalgas usando técnicas tradicionais é conveniente que estas sejam providas de arejamento, causando agitação e turbulência da água, permitindo que a exposição das células à luz seja mais uniforme, evitando que estas se depositem no fundo do recipiente de cultura e homogenizando os nutrientes e gases como o CO₂ e O₂, isto permite movimentar o O₂.

Os factores mais importantes para o crescimento de microalgas são a luz, temperatura, pH e concentração de nutrientes, sendo estes considerados limitantes do crescimento das microalgas.

Ao iniciar uma cultura de microalgas devemos ter em conta a concentração do inóculo, a intensidade da luz, a temperatura, o pH e a salinidade:

- A concentração celular inicial não deverá ser muito baixa uma vez que podemos perder a cultura por foto-inibição ou outras causas, devendo a

concentração inicial ser suficiente para um começo rápido do seu crescimento exponencial.

- A intensidade luminosa está associada à concentração celular que, como referido, se for demasiado forte poderá causar foto-inibição e, se for demasiado baixa poderá retardar o crescimento. A produção de microalgas pode ser realizada com luz constante ou utilizando ciclos circadianos. Em sistemas de produção massiva, foram descritos rendimentos máximos por hora de luz e taxas de crescimento máximo com fotoperíodos de duração intermédia (Maseda, 2002; Fábregas *et al.*, 2004).
- As temperaturas óptimas das microalgas têm um grande espectro, variando desde os 16 aos 35 °C, todavia, o ajuste deste parâmetro depende da espécie e da sua proveniência. Espécies de zonas temperadas têm como temperaturas óptimas de crescimento valores entre 16 e 21 °C, enquanto espécies tropicais têm como temperaturas óptimas de crescimento valores entre 25 e 35 °C (Renaud *et al.*, 2002).
- Relativamente aos nutrientes, sabe-se que as microalgas necessitam de macronutrientes como o fósforo e o nitrogénio, micronutrientes e vitaminas. Cada microalga tem as suas necessidades específicas, sendo a sua composição bioquímica dependente dos nutrientes que estejam à sua disposição (Otero, 1994).
- O pH determina a disponibilidade de CO₂ e dos minerais no meio de cultura e, influi directa ou indirectamente no metabolismo das microalgas. O pH óptimo de cultura de microalgas varia entre as espécies, mas encontra-se geralmente entre 7 e 9. Este, por sua vez, pode ser afectado por diversos factores como: quantidade de CO₂ dissolvido, temperatura, composição e capacidade tampão do meio de cultura e actividade metabólica das microalgas.
- As microalgas marinhas são geralmente tolerantes e adaptam-se a salinidades variáveis. Suportam variações através de regulações da sua pressão osmótica interna, mediante acumulação de metabolitos (Ben-Amotz e Avron, 1983). O seu valor óptimo encontra-se entre 20-24 ppt.

As microalgas podem ser produzidas em três tipos de sistemas de cultura: descontínuo ou *batch*, semi-contínuo e contínuo.

Os sistemas descontínuos ou em *batch* são sistemas fechados e estáticos, uma vez que durante o processo não é adicionado nenhum substrato nem retirado nenhum produto até ao final, excepto CO₂ em alguns casos. Assim, as células multiplicam-se até que algum dos nutrientes se esgote e se torne limitante, ou algum metabolito se acumule

até um nível tóxico. Ao longo do tempo de produção verifica-se então uma diminuição da concentração dos nutrientes no meio, em virtude do crescimento celular. É o sistema mais utilizado em aquacultura, geralmente em bolsas de plástico de 50 – 400 L (Figura 1).

Nos sistemas contínuos, quimiostatos ou turbidostatos, o substrato é adicionado e o produto retirado de forma contínua. Assim, o volume da cultura, a concentração de nutrientes e a densidade celular mantêm-se constantes uma vez atingido o estado de equilíbrio ou steady-state.

O sistema semi-contínuo é uma variante do sistema contínuo. A diferença dos dois sistemas de cultura é que no sistema semi-contínuo uma porção de cultura é retirada, sendo adicionado novo meio fresco em intervalos de tempos circadianos. Apesar da produção ser contínua, a concentração do substrato e densidade celular não são constantes ao longo do tempo, apresentando ciclos de 24 horas. No caso de culturas de microalgas submetidas a ciclos circadianos de luz/escuridão, onde se observa divisão celular sincronizada quando a renovação é efectuada a cada 24 horas estas são similares às culturas contínuas clássicas, sendo denominadas “ciclostatos”.

Estes três tipos de sistemas de produção podem ser aplicados a distintos sistemas físicos como são exemplo as bolsas de plástico (Figura 1), fotobiorreactores (Figura 2), balões de fundo raso de 5 L e tubos de ensaio (Figura 3), etc.



Figura 1 – Exemplo de sistemas de produção de microalgas em bolsas de plástico de volume variável. (Fotografias: Pedro Seixas).

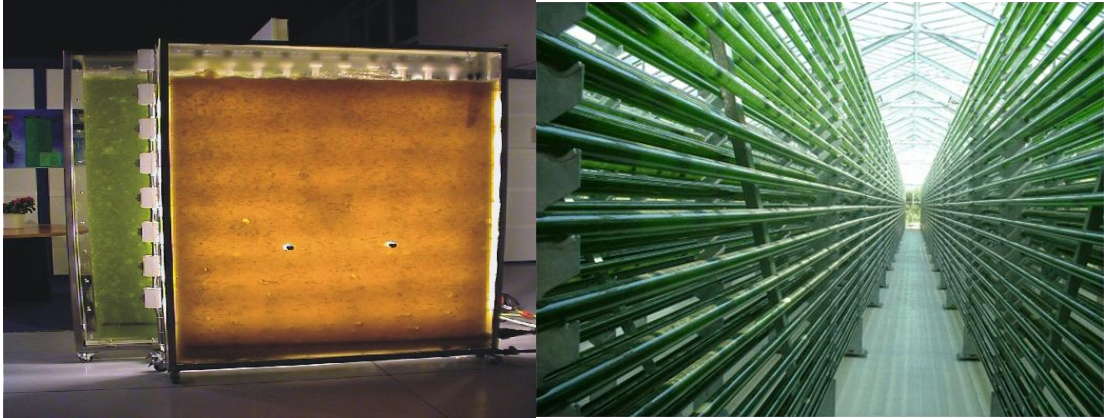


Figura 2 – Exemplos de sistemas de produção de microalgas em fotobiorreactores (foto esquerda: Ana Otero; foto direita retirada do site [<http://bioprime.blogspot.com>] em Setembro 2010).



Figura 3 – Exemplo de sistema de produção de microalgas em menor escala. Produção em balões de fundo raso de 5 L (esquerda) e em tubos de ensaio de 100-mL (direita). (Fotografias: Pedro Seixas)

Actualmente, mais de 40 espécies de microalgas, isoladas em diferentes partes do mundo, são cultivadas como culturas mono-algais em sistemas intensivos. Quando aplicadas em aquacultura estas cepas são mono-algais mas não axénicas, isto porque apresentam em pequena quantidade colónias bacterianas que, quando as condições de cultura são óptimas, não representam nenhum problema para a cultura. São 32 os principais géneros de microalgas utilizados em aquacultura a nível mundial para alimentar diferentes grupos de organismos aquáticos de importância comercial, de diferentes classes como (adaptado de Becker, 2004):

- Bacillariophyceae – *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*;
- Prymnesiophyceae – *Isochrysis*, *Pavlova*;
- Cryptophyceae – *Cryptomonas*, *Rhodomonas*, *Chroomonas*, *Nannochloris*;

- Cyanophyceae – *Spirulina*;
- Chlorophyceae – *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*;
- Eustigmatophyceae – *Nannochloropsis*;
- Prasinophyceae – *Tetraselmis*.

1.1.4 Composição bioquímica microalgas e produtividade

A importância das microalgas na cadeia trófica da produção em aquacultura baseia-se no facto destas servirem de alimento directa ou indirectamente às espécies a produzir, influenciando a sua sobrevivência e crescimento. Como já foi referido, a composição bioquímica é variável, dependendo de vários factores que interferem também sobre o crescimento celular, tal como a disponibilidade de luz, temperatura, pH, salinidade, concentração e composição de nutrientes, sistema de produção (Wikfors *et al.*, 1984; Wikfors, 1986; Fabregas *et al.*, 1984, 1986; Richmond, 2004). O sistema de produção contínuo pode ser uma ferramenta de manipulação da composição bioquímica das microalgas: apenas alterando os parâmetros das condições de cultura é possível produzir variações nos teores de composição bioquímica de uma dada espécie de microalga só, tão significativas como a variação dos teores de um amplo número de microalgas, (Scott, 1980; Taub, 1980).

A produção de microalgas por métodos contínuos apresenta vantagens em relação aos outros, mais convencionais, o que os torna mais adequados para a produção de microalgas:

- a produção pode atingir rendimentos 10 vezes superiores a outros métodos. Quando as condições de cultura são adequadas, a taxa de crescimento e a produção podem ser mantidas próximo do máximo estando as microalgas em fase de crescimento exponencial permanentemente, proporcionando biomassa de melhor qualidade nutritiva;
- a biomassa produzida é mais controlada e de qualidade uniforme, sendo instrumentos óptimos para manipulação da composição bioquímica;
- É um sistema de cultura que permite automatização, reduzindo custos de mão-de-obra.

1.1.5 A microalga marinha *Pavlova lutheri*

Pavlova lutheri (Droop) Green é uma microalga marinha flagelada, oval, achatada e geralmente com 7 – 9 µm de comprimento (Figura), pertencente ao filo Haptophyta (= Prymnesiophyta), e ocorre mundialmente em águas oceânicas e costeiras (Green, 1975).

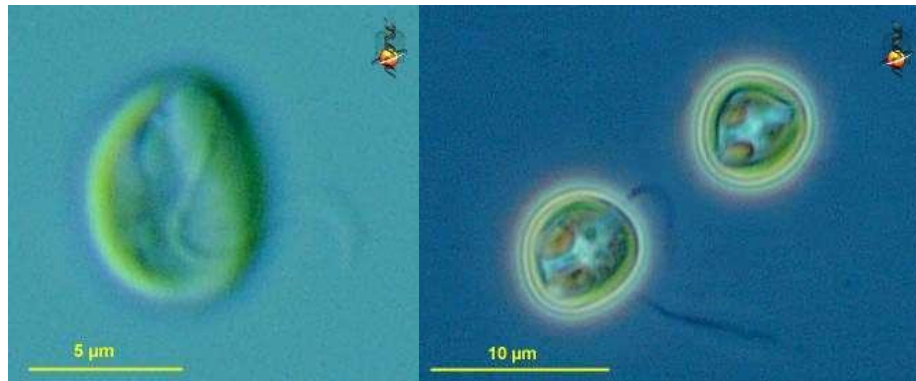


Figura 4 – *Pavlova lutheri* (fotografias retiradas de [<http://www.eol.org/pages/901688>] em Setembro 2010).

P. lutheri é caracterizada por conter elevados teores de ácidos gordos poliinsaturados (PUFA), especialmente os ácidos gordos eicosapentenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), essenciais aos animais marinhos (Kanazawa 1979; Tatsuzawa e Takizawa, 1995; Carvalho *et al.*, 2006). EPA e DHA são ácidos gordos poliinsaturados do tipo n-3 que, embora pouco sintetizados por muitos animais marinhos, são em alguns casos essenciais para o seu desenvolvimento e, quando não essenciais, promovem um crescimento regular e aumentam a sobrevivência das larvas quando presentes na sua dieta (Volkman *et al.*, 1989). Assim, a maximização do teor de PUFAs nas espécies de microalgas usadas como alimento em aquacultura pode ser crucial para o sucesso da produção de algumas espécies marinhas (Watanabe *et al.*, 1983).

Os micronutrientes têm também um papel importante. Um meio isento de enxofre é incapaz de sustentar o crescimento celular, e culturas sem cálcio, ferro ou manganésio apresentam rendimentos muito mais baixos do que os que possuíam esses micronutrientes (Carvalho *et al.*, 2006). Pelo contrário, culturas sem boro produzem maior número de células que aquelas contendo esse elemento. Um meio privado de boro, molibdénio e cobre levou a um aumento das quantidades relativas de ambos EPA e DHA, enquanto a deficiência em cálcio reduziu os níveis de PUFA (Carvalho *et al.*, 2006).

Como já foi referido, factores ambientais como temperatura, salinidade, luz e nutrientes, e as condições e tempo de cultura afectam a composição bioquímica e o crescimento das microalgas. Para *P. lutheri* já foram descritas algumas condições de crescimento como temperatura, nutrientes, luz (Tatsuzawa e Takizawa, 1995; Carvalho e Malcata, 2000; Carvalho *et al.*, 2006; Guedes e Malcata, 2010) assim como efeitos combinados de irradiação, temperatura e fonte de carbono (Carvalho *et al.*, 2009; Guihéneuf *et al.*, 2009), que terão influência na composição bioquímica da microalga.

P. lutheri é uma microalga utilizada extensivamente em aquacultura para alimentação de bivalves em todos os seus estados de desenvolvimento, assim como para o enriquecimento de rotíferos e *Artemia* sp., para alimentação de crustáceos e larvas de peixe (Volkman *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1996; Leonardos e Lucas, 2000; Ponis *et al.*, 2006 a,b). Alguns estudos mostraram que *Pavlova lutheri* é um bom alimento para larvas de bivalves (Davis e Guillard, 1958; Walne, 1963), existindo igualmente informação contrária que mostra que esta microalga é um alimento pobre para larvas de Ostra do pacífico, *Crassostrea gigas* (Langdon e Waldock, 1981; Ponis *et al.*, 2006 a,b) e de vieira, *Patinopectin yessoensis* (Tompson *et al.*, 1994), mostrando que excesso de EPA na dieta pode influenciar negativamente o crescimento das larvas (Tompson *et al.*, 1996).

1.2 Moluscos Bivalves

1.2.1 Noções gerais

Os bivalves são um grupo bem sucedido e diversificado, constituindo a segunda maior classe do filo Mollusca com aproximadamente 7500 espécies. São animais exclusivamente aquáticos, podendo ocorrer em ambientes de salinidade diversa, desde água salgada, a água doce e salobra. São filtradores e caracterizam-se por serem comprimidos lateralmente e possuírem uma concha composta por duas valvas que se articulam dorsalmente envolvendo todo o corpo do animal. No interior da concha encontramos um tecido que protege os órgãos do animal, chamado manto, que delimita a cavidade paleal, o qual comunica com o exterior por dois sifões, um inalante e um exalante. Possuem um pé utilizado para se enterrarem e fixarem ao substrato. São animais simples, sem cabeça e sem rádula, reproduzindo-se igualmente de forma simples, através da libertação de gâmetas na coluna de água, onde ocorre a fecundação e o desenvolvimento (Gosling, 2003).

Estes organismos são geralmente dióicos, com sexos separados (ex.: amêijoas), mas podem ser também hermafroditas, que pode ser funcional simultâneo (quando o animal emite simultaneamente os dois tipos de gâmetas, por ex. as vieiras), consecutivo (quando o animal muda de sexo durante a sua vida, sendo normal a passagem duma primeira fase masculina para uma segunda fase feminina), alternativo (quando a mudança de sexo ocorre a grandes intervalos, não se podendo prever para a época seguinte de postura o sexo que vai ter, por ex. ostra portuguesa) ou rítmico consecutivo (quando numa mesma época de postura muda de sexo, por ex. ostra plana). O ciclo reprodutivo ocorre do início ao final da produção das células sexuais (gametogénese) acabando ou não na desova. Engloba, assim, dois períodos: reprodutivo (que vai do início da gametogénese à emissão dos gâmetas) e vegetativo (durante o qual os gâmetas residuais são reabsorvidos). A gametogénese é influenciada por vários factores: temperatura, alimento e factores endógenos como o sistema nervoso e o sistema hormonal (Gosling, 2003).

Tipicamente, os bivalves iniciam a sua vida como larvas trocóforas. Ao fim de 24-48 horas tornam-se larvas velígeras D (ou larva D), com cerca de 100 µm de comprimento, que nadam e se alimentam livremente na água devido a um órgão, o velum. As larvas velígeras passam por diferentes fases e formas ao longo do desenvolvimento (larva D, larva umbolada e larva pedivelígera), ao mesmo tempo que aumentam o seu tamanho

(Figura 5). A larva pedivelígera, provida de pé bem desenvolvido, está pronta para a fixação e a metamorfose ao fim de 18-21 dias de crescimento, dependendo da espécie e das condições de cultivo (Gosling, 2003).

Os bivalves são animais filtradores de regime micrófago (suspensívoros ou detritívoros), alimentando-se principalmente de fitoplâncton e partículas orgânicas em suspensão e usam as brânquias para capturar alimentos da água e os nefrídeos para remover os restos indesejáveis, sendo a sua alimentação definida pela estrutura das suas brânquias. Os bivalves têm a capacidade de seleccionar o alimento da água (Gosling, 2003).

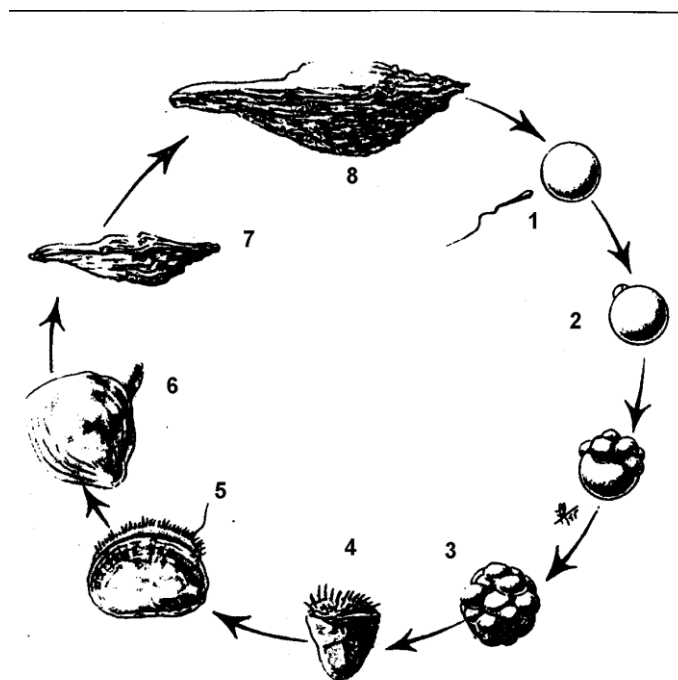


Figura 5 – Ciclo reprodutivo dos moluscos bivalves. Legenda: 1 – Espermatozóide e ovo; 2 – Ovo fecundado; 3 – Mórula; 4 – Larva trocófora; 5 – Larva velígera; 6 – Larva pedivelígera; 7- Juvenil; 8 – Adulto.

1.2.2 Situação global

Existe um grande interesse neste grupo de organismos, principalmente por muitos dos seus membros serem muito apreciados como alimento pelo Homem. Os bivalves com maior interesse económico e comercial são os mexilhões, as ostras, as vieiras e as amêijoas (Helm *et al.*, 2004).

A produção mundial de moluscos bivalves, apresentou em 2005 um novo recorde: 13,6 milhões de toneladas, representando cerca de 10% do total dos produtos da pesca. A partir de 1950 houve um crescimento na produção mundial de bivalves, sendo este mais significativo na década de 90, onde a média de crescimento da produção de bivalves foi aproximadamente de 5% ao ano. O rápido crescimento do sector da aquacultura e o aumento da produção de bivalves na China contribuíram para este aumento. Em 1995, a produção de bivalves em aquacultura rondou os 7 milhões de toneladas, e em 2005 atingiu aproximadamente os 12 milhões, representando respectivamente 78,5 e 87,3% do total produzido a nível global. Enquanto a quantidade de bivalves produzidos em aquacultura aumentou ao longo dos últimos anos, o mesmo não se passou com a produção selvagem, que se manteve mais ou menos estável ao longo dos anos. Tal conduziu à diminuição da percentagem de produção selvagem relativamente ao valor total produzido, que desceu de 21,5 para 12,7% de 1995 a 2005 (FAO, 2009).

O maior produtor mundial de moluscos bivalves é a China, que produziu 9,5 milhões de toneladas em 2005, representando 70% da produção global e 80,2% da produção de bivalves em aquacultura. Na lista dos maiores produtores seguem o Japão, Estados Unidos da América, Coreia do Sul e Tailândia com 5,8%, 5,2%, 2,8% e 2,8%, respectivamente. Outros importantes produtores de bivalves são o Canadá, Chile, França, Itália e Espanha (FAO, 2009).

Em 2005, 38,9% do total de moluscos bivalves produzidos em aquacultura consistiam em ostra e 35% consistiam em amêijoia e berbigão, seguindo-se as vieiras com 14,6% e o mexilhão com 14,4%. Nesse mesmo ano, a aquacultura de bivalves foi responsável por 97% da produção de ostra, 93% de mexilhão, 86% de amêijoia e berbigão e 64% de vieira e pectens. As vieiras são os bivalves mais importantes quanto ao seu valor (38%) uma vez que raramente causam infecções virais transmitidas por alimentos e pelo seu consumo ser restrito ao tecido muscular, o qual na maioria das vezes, é cozinhado antes de ser consumido. Seguem-se os mexilhões (33% do valor) e, amêijoas e ostras relativamente menos importantes (FAO, 2009).

Depois da Noruega, a Espanha é o maior produtor de aquacultura da Europa e o maior produtor no que respeita ao total de produtos da pesca e aquacultura (FAO, 2009).

Em Portugal a produção de moluscos e crustáceos corresponde a 45% do total de pescado produzido em aquacultura, sendo que em 2007 as amêijoas representaram quase 70% dessa produção, com 2335 toneladas, e 97% do valor total de moluscos e crustáceos. A produção total (aquacultura e capturas) de amêijoas em Portugal atingiu em 2007 as 2886 toneladas, sendo que 93% do total foi produzido em aquacultura. O valor das amêijoas nesse ano atingiu os 22.471.000 Euros (INE, 2008)

1.2.3 Produção de moluscos bivalves

A produção de moluscos bivalves em aquacultura tem vindo a crescer nas últimas décadas, sendo actualmente responsável pela maioria da produção total de bivalves.

De forma a serem obtidas as condições biológicas necessárias para um bom funcionamento de uma maternidade deve ser:

- garantido um contínuo suprimento de reprodutores em excelentes condições físicas visando a obtenção de larvas de boa qualidade, devendo os progenitores apresentar altas concentrações de glicogénio e lípidos para a produção de gâmetas;
- proporcionar quantidades suficientes de microalgas com grande valor alimentício;
- dispor de água de óptima qualidade para a larvicultura, isto é, que favoreça o crescimento e o desenvolvimento normal das espécies cultivadas quando outros factores bióticos e abióticos estiverem nos seus níveis óptimos.

O ciclo de produção de moluscos bivalves compreende várias fases, começando com a selecção e acondicionamento dos reprodutores, indução da desova, cultura larvar, fixação e aclimatização e cultura de pós-larvas.

O acondicionamento é um conjunto de técnicas que permite conseguir a maturação sexual fora do período e ambiente natural, que consiste em manter os indivíduos adultos a uma temperatura aproximadamente de 20 °C (dependendo da espécie), com fornecimento de alimento em quantidade e qualidade óptimas (Figura 6). O acondicionamento pode ser realizado em sistemas abertos ou fechados e é mais eficaz em indivíduos provenientes de regiões mais frias. O estado inicial dos reprodutores determina a qualidade da reprodução, dependendo o período de acondicionamento (2 a 10 semanas) e do estado inicial das gónadas (Helm *et al.*, 2004).



Figura 6 – Acondicionamento de reprodutores (imagem retirada de Álvarez e Camacho, 2008).

A indução da postura realiza-se após o período de acondicionamento (Figura 7). Podem ser aplicados vários estímulos para indução, sendo os mais eficientes os mais naturais que minimizam o stress. O método mais usado é a estimulação térmica que é também o mais eficiente. A importância deste método é a diferença entre a temperatura de acondicionamento e a temperatura de desova, geralmente mais elevado entre os 5 e os 10 °C. Regra geral, quando o stock de reprodutores não responde a estimulação térmica após um período razoável, é porque os gâmetas não estão totalmente maduros. A estimulação hormonal, com serotonina ou outros químicos para indução da desova raramente são benéficos e eficientes. Os ovos libertados usando estimulação hormonal são menos viáveis que os produzidos em resposta a indução térmica. Nos bivalves monóicos, a desova é mais complexa; o objectivo é minimizar a hipótese de os ovos serem fertilizados pelo esperma do mesmo indivíduo. Após a libertação dos gâmetas dá-se a fecundação, que é externa, variando o número de espermatozóides por ovo consoante a espécie, geralmente entre 5 a 10 espermatozóides por ovo (Helm *et al.*, 2004).



Figura 7 – Fêmea de Amêijoia japonesa a desovar (Retirado de Helm, 2004).

Após a fecundação os ovos são incubados em água do mar esterilizada e filtrada numa concentração de 100 ovos por mililitro a uma temperatura aproximadamente de 20 °C. Esta fase demora entre 24 e 48 horas, dependendo da espécie.

A cultura larvar inicia-se após a incubação, com as larvas velíferas D. O crescimento e qualidade larvar vão ser influenciados pela qualidade da água e respectivo tratamento (filtrada, U.V.), alimento, temperatura e salinidade.

Ao fim de 2-3 semanas, dependendo da espécie e das condições de cultura, as larvas apresentam pé e há redução do velum, estando as larvas na fase de fixação e metamorfose (Figura 8). No caso das amêijoas, são colocadas em tambores com malha, e consoante a espécie é adicionada ou não areia para fixação (Álvarez e Camacho, 2008).

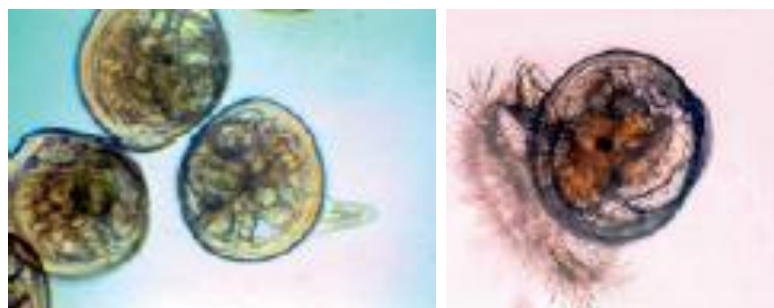


Figura 8 – Larvas pedivelíferas. (Fotografia retirada de Álvarez e Camacho, 2008).

Após a metamorfose, as larvas medem de 0,3 mm a 2 mm, e são cultivadas até um máximo de 20 mm, com fornecimento diário de alimento e mudas de água a cada 48 horas – pré-engorda. A pré-engorda pode ser realizada no meio natural.

A engorda é iniciada assim que as sementes atingem cerca de 20 mm. No crescimento/engorda, realizado em ambiente natural, existem vários sistemas de produção, consoante a espécie, localização e condições do meio. Pode ser realizado em culturas sobre o solo (emergente ou em águas profundas), culturas em sobre-elevação (sacas ou caixas), culturas em estacas e culturas em suspensão (mesa, jangada ou corda longa).

Em Portugal são usados diferentes métodos de engorda de moluscos bivalves, dos acima referidos, consoante o local e a espécie a produzir. Geralmente, para produção de amêijoas, é usado o método de cultura sobre o solo, realizada geralmente na zona intertidal, bem como em águas profundas. Os locais de implantação situam-se em estuários, rias, lagoas litorais, em parcelas de cultura chamadas parques, concessões ou viveiros. A escolha do solo é fundamental para o sucesso da produção, sendo conveniente um substrato firme, constituído por uma mistura de areia e vaza. O terreno é preparado, isto é, limpo de macroalgas, pedras e caranguejos, com o uso de um ancinho (Figura 9, 10). São feitos sulcos com cerca de 20-30 cm de profundidade. Os juvenis são então lançados no terreno e distribuídos, de modo a que a sua densidade seja de 250-450 amêijoas/m². É então colocada uma rede por cima da zona semeada. A densidade da cultura na altura da colheita deve ser de 8 a 10 kg de amêijoa/m². A apanha é feita manualmente (Figura 11), podendo ser também feita por máquinas desenvolvidas para o efeito (Schuller 1998).



Figura 9 – Preparação de terreno com ancinho para produção de amêijoa.



Figura 10 – Terreno de produção de amêijoas tratado e limpo.



Figura 11 – Apanha manual de amêijoas após período de engorda.

1.2.4 Amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*)

Ruditapes philippinarum, de nome comum amêijoia japonesa, é um molusco bivalve nativo do Japão tendo actualmente uma ampla distribuição desde o subtropical ao boreal inferior do Pacífico ocidental, e também em águas temperadas na Europa.

De elevado valor comercial, a amêijoia japonesa foi introduzida em várias partes do mundo. Foi acidentalmente introduzida na costa do Pacífico da América do Norte, sendo também transferida para águas havaianas, colonizando estes locais. A amêijoia japonesa foi importada para a Europa após sobre-pesca e rendimentos irregulares da amêijoia

nativa, *Ruditapes decussatus*, tendo sido introduzida em cativeiros franceses em 1972 (Goulletquer, 2005).

A produção de *R. philippinarum* em aquacultura cresceu na Europa, levando vários países a iniciarem a sua produção: Portugal, Irlanda, Espanha e Itália. Paralelamente, eram importadas sementes para a Polinésia Francesa, Noruega, Alemanha, Bélgica, Tunísia, Marrocos, Israel e Ilhas Virgens dos EU, para ensaios de aquacultura (Figura 12). Com o crescimento da aquacultura na Europa, durante os anos 80 houve uma expansão geográfica de populações selvagens de *R. philippinarum* em Itália, França e Irlanda, que se mostraram mais resistentes e de crescimento mais rápido que a espécie endémica, *R. decussatus*. Actualmente, as populações de *R. philippinarum* são o maior contribuinte para o desembarque de moluscos da Europa, e o principal foco da pesca pública intensiva, competindo com os produtos da aquacultura (Goulletquer, 2005).

A produção global em aquacultura de amêijoia japonesa teve um crescimento exponencial, desde a década de 90. Em 2002, a China liderava a produção de amêijoia japonesa, com 97,4% do total, seguindo-se a Itália, com 41000 toneladas, a República da Coreia com 19000 toneladas e os Estados Unidos da América e França com 1000 toneladas. Actualmente é uma das espécies mais produzidas no mundo, com mais de 3 milhões de toneladas em 2006, enquanto as capturas globais tiveram tendência a diminuir, atingindo no mesmo ano cerca de 45000 toneladas (Goulletquer, 2005).



Figura 12 – Principais produtores de *R. philippinarum* (Fonte FAO, 2006)

A produção global de *R. philippinarum* tem vindo a aumentar, quer através da expansão de área cultivada, quer com a introdução da espécie em novas áreas e novos

países. No entanto, algumas doenças como Perkinsus e a doença do anel castanho estão muitas vezes associadas às variações de produção em determinados locais, uma vez que causam elevadas mortalidades. Para além do problema das doenças, o desenvolvimento de populações selvagens, após a introdução desta espécie, tem induzido várias mudanças nas tendências de produção, facilitando o fornecimento de sementes (em Itália) ou pelo contrário, competindo economicamente com a aquacultura (França), favorecendo a pesca desportiva. Já na costa ocidental dos Estados Unidos da América, a produção comercial está ameaçada por predadores (Gouilletquer, 2005).

OBJECTIVOS

Este trabalho está dividido em duas partes, tendo a primeira como objectivos:

- Avaliar o efeito de diferentes meios nutritivos sobre o crescimento e produtividade de *Pavlova lutheri* em regime semi-contínuo.
- Analisar a composição bioquímica de *Pavlova lutheri* dos diferentes grupos com especial incidência no perfil de ácidos gordos.

E a segunda parte:

- Testar o efeito de duas dietas à base de microalgas de composição bioquímica optimizada e controlada, na sobrevivência, crescimento e composição bioquímica de larvas de amêijoa japonesa (*Ruditapes philippinarum*).

2. Material e Métodos

2.1 *Pavlova lutheri*

2.1.1 Produção da microalga marinha *Pavlova lutheri*

Para as culturas foi usada água do mar previamente filtrada através de filtros de fibra de vidro (Whatman GF/C). A salinidade foi medida usando um refractómetro Atago S/Mill e depois ajustada a 35 ppt com água destilada. Após o ajuste, a água do mar foi autoclavada a 121 °C durante 15 minutos, à qual se adicionavam nutrientes da forma apresentada na Tabela 1.

A microalga *Pavlova lutheri* (CSIC, Espanha) foi cultivada em tubos de ensaio com 100 mL de capacidade (80 mL de volume total) e 3 cm de diâmetro, testando o efeito de quatro meios de cultura diferentes com maior ou menor complexidade em oligoelementos e vitaminas, realizados em quadruplicado: ALGAL, ABONO, ABONO + OLIGO, ALGAL + OHM.

Os tubos foram colocados num suporte adaptado para a sua colocação (Figura 13) e, submetidos a luz fluorescente de lâmpadas OSRAM Daylight L36W/10 colocadas atrás dos tubos. A intensidade luminosa foi medida com um fotómetro Neurtext HD 8366, sendo a irradiância máxima na fase de crescimento *batch* de 170 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A conversão lux a $\mu\text{mol photon. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi efectuada através do factor de conversão proposto por Ginzburg (1987): 51.2 lux = 1 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As culturas foram submetidas a um ciclo circadiano de 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão. A intensidade luminosa durante o regime de renovação diária foi reduzida para 130 $\text{photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As culturas foram providas de arejamento constante, 114 mL minuto^{-1} , com pulsos de CO₂ de 10 segundos a cada 10 minutos durante o ciclo de luz, de modo a manter o pH entre 7,5 e 8,0. As culturas foram realizadas numa câmara isotérmica onde a temperatura foi mantida a 21 ± 1,5 °C.

Tabela 1 – Formulação dos diferentes meios nutritivos dos grupos a testar no crescimento da microalga *Pavlova lutheri*. A concentração final de NO₃ foi de 8 mM em todos os grupos*.

Nutrientes	ALGAL	ABONO	ABONO+OLIGO	ALGAL+OHM
NaNO ₃	68 g L ⁻¹	-	-	68 g L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	6,24 g L ⁻¹	-	-	6,24 g L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂	-	78,64 g L ⁻¹	78,64 g L ⁻¹	-
KH ₂ PO ₄	-	9,9 g L ⁻¹	9,9 g L ⁻¹	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	34,93 g L ⁻¹	34,93 g L ⁻¹	49,3 g L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	-	22,19 g L ⁻¹
ZnCl ₂	27,2 mg L ⁻¹	-	27,2 mg L ⁻¹	27,2 mg L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	39,58 mg L ⁻¹	-	39,58 mg L ⁻¹	237,48 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	48,4 mg L ⁻¹	-	48,4 mg L ⁻¹	72,59 mg L ⁻¹
CoCl ₃	3,3 mg L ⁻¹	-	3,3 mg L ⁻¹	3,3 mg L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	4,98 mg L ⁻¹	-	4,98 mg L ⁻¹	7,47 mg L ⁻¹
EDTA-Na	1,956 mg L ⁻¹	-	1,956 mg L ⁻¹	1,956 mg L ⁻¹
Fe Citrate	1,34 g L ⁻¹	-	1,34 g L ⁻¹	1,34 g L ⁻¹
Boro	-	4 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹	-
Welgro	-	0,06 mL	0,06 mL	-
C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	-	-	-	525,94 mg L ⁻¹
Cl ₂ Co.6H ₂ O	-	-	-	2,37 mg L ⁻¹
Cr ₂ O ₃	-	-	-	15,19 mg L ⁻¹
SeO ₂	-	-	-	1,10 mg L ⁻¹
EDTA	-	-	-	1,22 mg L ⁻¹
Tiamina	7 mg L ⁻¹	-	7 mg L ⁻¹	42 mg L ⁻¹
Biotina	1 mg L ⁻¹	-	1 mg L ⁻¹	51 mg L ⁻¹
B ₁₂	0,6 mg L ⁻¹	-	0,6 mg L ⁻¹	30,6 mg L ⁻¹

No meio nutritivo ALGAL e ALGAL+OHM a concentração final de N foi 8 mM e de P foi 0,40 mM, enquanto que para os grupos ABONO e ABONO+OLIGO a concentração de N foi de 8 mM e de P foi 0,73 mM.

Os tubos com água do mar foram inoculados com a microalga *P. lutheri* com uma densidade inicial de $2,44 \times 10^6$ células mL⁻¹. Uma vez alcançado o início da fase estacionária das culturas, iniciou-se o regime semi-contínuo com uma renovação diária de 25% do volume total das culturas (Figura 13). Uma vez que a densidade celular do grupo ABONO desceu consideravelmente, optou-se por renovar apenas 20% do seu volume, neste grupo, para não sofrer foto-inibição, a partir do dia 5. As renovações foram realizadas durante a primeira hora do ciclo de luz (Fábregas *et al.*, 1996 a,b).

Após renovação das culturas, era adicionada água do mar esterilizada, num volume igual ao retirado e o meio enriquecido com a mesma concentração de nutrientes usada inicialmente.

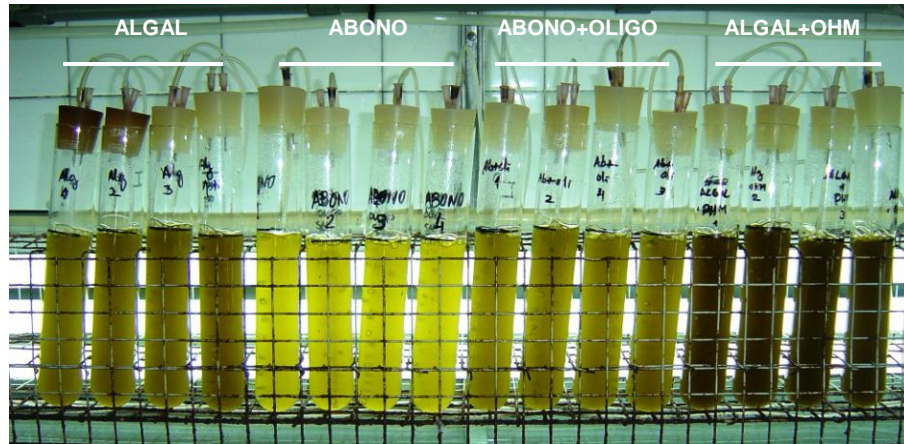


Figura 13 – Fase final do período de crescimento em sistema descontínuo da microalga marinha *P. lutheri*. De notar as diferentes densidades celulares dos diferentes grupos.

2.1.2 Contagem celular e obtenção de biomassa para análises

As contagens celulares foram efectuadas a cada dois dias, utilizando câmaras de contagens Improved Neubauer (Brand) e um microscópio de contraste de fase (Nikon Labophot). Para as contagens realizaram-se diluições em água do mar, de forma a que o número de células contadas por campo de contagem de 1 mm² se encontrasse no intervalo 30-300 (ICSH, 1988).

Para recolha de biomassa para análise de composição bioquímica centrifugaram-se amostras de 10 mL dos volumes recolhidos (10 tubos por grupo), durante 12 minutos a 3100 rpm numa centrífuga Kubota KS8000. O líquido sobrenadante foi retirado e a biomassa restante nos tubos foi imediatamente congelada a -20 °C. Algumas das amostras foram liofilizadas num aparelho Labconco Lyph-lock 6, sendo usadas posteriormente para análise elemental da composição de C-N-H.

2.1.3 Peso seco celular

Pesaram-se os filtros de fibra de vidro Whatman GF/C, previamente secos durante 24 horas a 80 °C, em quadruplicado para cada grupo. Filtrou-se 2 e 3 mL de cultura de microalgas e lavou-se com formiato de amónio 0,5 M para eliminar sais da água do mar, numa máquina de vácuo. Após secagem de 24 horas a 80 °C os microfiltros foram pesados novamente.

O peso seco foi calculado pela diferença de peso do filtro dividido pelo número de células de microalgas em cada caso.

2.1.4 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o software SPSS V 14.0.1 (SPSS, Inc.).

Realizaram-se testes ANOVA com provas post-hoc de Tukey ($P < 0,05$) para comparar a biomassa, densidade de estabilização, peso seco e pesos da biomassa dos quatro meios nutritivos a testar.

2.2 Cultura de larvas de Amêijoia japonesa

2.2.1 Dieta: cultura de microalgas

Foram realizadas culturas de *Rhodomonas lens*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros* sp. em balões de fundo raso de 6 L em regime semi-contínuo.

A água do mar usada para as culturas de microalgas foi previamente filtrada por filtros de 40 e 10 µm, e autoclavada a 121 °C durante 15 minutos. Uma vez esterilizada foi adicionado ALGAL-1 com concentração final de 4mM NaNO₃ (Fábregas *et al.*, 1986) nas diferentes culturas. Os balões de fundo raso com as culturas foram colocados em prateleiras de vidro submetidos a luz fluorescente por lâmpadas OSRAM Daylight L36W/10, quatro lâmpadas por baixo e quatro atrás, 24 horas por dia, na câmara de culturas das instalações do I.Ga.F.A. cuja temperatura se manteve constante a 22 °C. As culturas foram providas de arejamento e o pH das culturas foi mantido entre 7,5 e 8,3 através de pulsos de CO₂ de 10 segundos a cada 10 minutos. As culturas foram renovadas a uma taxa de 30% do volume total com água esterilizada e a mesma concentração de nutrientes, a cada muda de água dos tanques (ou seja, cada 2 ou 3 dias), mantendo a biomassa pouco variável ao longo da experiência. A biomassa recolhida foi usada para dieta das larvas da amêijoia japonesa. As renovações foram realizadas no momento de alimentação das larvas de amêijoia japonesa (não sendo necessário renovar a determinada hora uma vez que estavam providas de luz constante). A densidade celular foi calculada pela biomassa recolhida através de contagens usando uma câmara de contagens (improved Neubauer haemocytometer).

Para análise da composição bioquímica das microalgas usadas na dieta, foi recolhida uma amostra de 10 mL de cada cultura de microalgas na fase de renovação, centrifugada e congelada imediatamente a -18 °C, para posterior análise bioquímica.

2.2.2 Acondicionamento, indução da desova e incubação de Amêijoia japonesa

Amêijoas da espécie *Ruditapes philippinarum* foram adquiridas dia 28 de Abril de 2010 na lota de Rianxo (Galiza, Espanha), e estiveram em acondicionamento desde do dia de aquisição até ao dia 4 de Maio. O acondicionamento realizou-se em tanques rectangulares de fibra de vidro de 40 L, com fundo duplo, para que as fezes e pseudo-

fezes não se depositassem na zona de estabulação dos progenitores. Os tanques mantiveram-se em circuito aberto com água proveniente do circuito de água do mar filtrada e a 18 °C. O alimento, à base de *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, foi repostado nos tanques durante 24 horas por gotejamento.

Para indução da desova foi usado choque térmico. Após acondicionamento foram retiradas dos tanques e envoltas num pano húmido frio durante 2,5 horas. Posteriormente foram colocadas numa mesa de indução negra (para melhor visualização da desova) com água a 36 ppt a 24°C (Figura 14). Para melhor estimulação, foram também adicionados gâmetas de um macho maduro e microalgas. Os indivíduos que desovaram foram colocados imediatamente em gobelés, individualmente, com água à mesma temperatura tratada com UV. Uma vez obtidos os gâmetas procedeu-se à fecundação dos ovos num cristalizador, cerca de 10 espermatozóides por ovo. A fecundação realizou-se em água do mar filtrada a 10 µm e esterilizada com UV.

Das 41 amêijoas 15 eram fêmeas, 12 machos e 14 não desovaram.

A incubação decorreu durante 48 horas em tanques de 220 L, ligeiramente arejados, com água filtrada por dois filtros, de 40 e 10 µm.



Figura 14 – Indução da desova de reprodutores de *Ruditapes philippinarum* numa mesa negra, com água filtrada e aquecida a 24°C (Fotografia: Pedro Seixas)

2.2.3 Criação de larvas de *Ruditapes philippinarum*

A criação e crescimento das larvas ocorreu em condições semelhantes a processos industriais em 6 tanques de fibra de vidro cónicos com capacidade de 220 L (Figura 15), providos de arejamento suave constante através de bolas de aquarologia, localizadas no centro do tanque. Cada tanque foi enchido com 200 L de água do mar, previamente filtrada por dois filtros, um de 40 µm e um outro de 10 µm.



Figura 15 – Tanque cónico de fibra de vidro de 220 L de capacidade utilizado para a criação das larvas de *Ruditapes philippinarum*, alimentadas com duas dietas diferentes (Fotografia: Pedro Nascimento)

Os parâmetros salinidade, temperatura e concentração de O₂ da água foram medidos diariamente, os quais apresentaram valores constantes de $37 \pm 1,5$ ppt, $21,6 \pm 1,6$ °C e $6,7 \pm 0,3$ O₂ mg L⁻¹, respectivamente, ao longo da experiência.

Após a incubação de 48 horas filtraram-se as larvas com crivos de 41 e 60 µm, descartando-se aquelas que se encontravam no crivo mais pequeno. As larvas retidas no crivo de 60 µm foram contadas em câmaras de contagem de 1mL. Foram medidos 30 indivíduos usando o micrómetro ocular dum microscópio óptico.

Cerca de 10.110.000 larvas D foram divididas pelos 6 tanques, obtendo-se uma densidade inicial de 8 larvas mL⁻¹ em cada tanque. As larvas de 3 dos tanques foram alimentadas com uma dieta composta por *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros* sp., constituindo o grupo CONTROL; e as larvas dos outros 3 tanques foram alimentadas com uma dieta composta pela mesma mistura do grupo CONTROL, substituindo-se aproximadamente 25% do seu peso seco pela criptófita *Rhodomonas lens* – grupo RHODO.

As dietas foram feitas após calcular a densidade das microalgas, tendo em conta os seguintes pesos celulares teóricos, obtidos em trabalhos prévios realizados no laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade de Santiago de Compostela:

- *Isochrysis galbana*: 30 pg célula⁻¹
- *Pavlova lutheri*: 33 pg célula⁻¹
- *Chaetoceros* sp.: 55 pg célula⁻¹
- *Rhodomonas lens*: 100 pg célula⁻¹.

Na Tabela 2 descreve-se a formulação das dietas fornecidas por tanque nos diferentes grupos, mostrando o peso total de cada microalga em cada dieta e o total de alimento por tanque.

Tabela 2 – Alimento fornecido às larvas dos diferentes grupos (por tanque), nos dias de alimentação.

Dia	2		4		6	
	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)
<i>I. galbana</i>	207,4	155,5	261,8	196,3	894,4	670,8
<i>P. lutheri</i>	215,7	161,8	216,6	162,4	634,2	475,7
<i>Chaetoceros</i>	519,8	389,8	409,8	307,3	0*	0*
<i>R. lens</i>	-	232,5	-	201,3	-	282,0
TOTAL alimento	942,9	939,7	888,1	867,3	1528,6	1428,5

Dia	8		10		13	
	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)
<i>I. galbana</i>	342,0	256,5	386,4	241,5	729,6	456,0
<i>P. lutheri</i>	294,5	220,9	543,8	339,9	563,6	352,3
<i>Chaetoceros</i>	226,9	170,2	230,3	230,3	446,9	446,9
<i>R. lens</i>	-	251,3	-	364,5	-	399,8
TOTAL alimento	863,4	898,8	1160,6	1176,2	1740,1	1654,9

Dia	15		17		20	
	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)	CONTROL (mg)	RHODO (mg)
<i>I. galbana</i>	630,0	449,8	407,4	290,9	378,3	203,7
<i>P. lutheri</i>	500,1	357,1	419,3	299,4	389,3	209,6
<i>Chaetoceros</i>	485,1	346,4	408,1	291,4	174,9	174,9
<i>R. lens</i>	-	343,5	-	378,0	-	378,0
TOTAL alimento	1615,2	1496,8	1234,8	1259,6	942,5	966,2

O peso total (mg) foi calculado com base no volume dado a cada tanque, tendo em conta valores teóricos do peso de cada microalga: *Isochrysis galbana* (33 pg), *Pavlova lutheri* (33 pg), *Chaetoceros* sp. (55 pg), *Rhodomonas lens* (100 pg)

* No dia 10 não foi incluída a microalga *Chaetoceros* nas dietas por problemas com a cultura.

** *Chaetoceros* proveniente de garrafão em sistema descontínuo.

Nos dias de cultura 2, 6, 10, 13, 15, 17 e 22 (considerando a fecundação dia 0), a água dos tanques foi mudada na sua totalidade, os tanques lavados com água doce e novamente encheidos até aos 200 L com água do mar filtrada da forma descrita anteriormente. Às mudanças de água correspondem filtrações das larvas por crivos, variando estes ao longo do tempo consoante o tamanho das larvas (ver Tabela 3) e 30 indivíduos por tanque foram medidos ao microscópio óptico usando o micrómetro da ocular. Nos dias 10, 13, 15, 17, 20 e 22 usaram-se dois crivos para ver em qual dos dois ficavam retidas mais larvas. Caso fossem retidas mais larvas no filtro de malha inferior, estas eram novamente colocadas nos tanques, se o seu número fosse consideravelmente menor, estas eram descartadas, prosseguindo-se apenas com as do filtro maior. Nos dias 2, 6, 10, 13, 15, 17 e 22 foram realizadas contagens de indivíduos numa câmara de contagem de 1 mL para cálculo da sobrevivência. No dia 24 deu-se por concluída a experiência e as larvas foram colocadas a fixar.

Para análise da composição bioquímica das larvas de Amêijoia japonesa foram recolhidos 30, 50 e 100 mL de larvas nos dias 2, 10 e 22 de cultura, respectivamente. Para a filtração das larvas usou-se um crivo de 30 µm de onde se recuperaram as larvas com uma pipeta Pasteur. Em cada dia de amostragem foram feitas recolhas em duplicado para determinação do perfil de ácidos gordos e análise elemental de C-N-H. Do segundo dia de amostragem foram recolhidas larvas D antes da distribuição destas pelos 6 tanques, e dos outros dias de amostragem foram recolhidas duas amostras por tanque. Após recolha foram congeladas a -18 °C para posterior análise bioquímica.

Tabela 3 – Procedimentos nos diferentes dias de muda de água na cultura de *Ruditapes philippinarum*.

Dias de cultura	Filtro retenção (µm)	Medição	Contagem indivíduos	Rejeição larvas do filtro menor
0	41/60	-	S	S
2	60	S	S	-
4	60	S	-	-
6	80	S	S	-
8	80	S	-	-
10	80/100	S	S	N
13	80/100	S	S	S
15	100/120	S	S	N
17	100/120	S	S	S
20	120/140	S	-	N
22	120/140	S	S	S

Aos dias de cultura correspondem mudas de água e os filtros utilizados. Para medições, contagem de indivíduos e rejeição de larvas o S assinala os dias em que foram realizadas. O N indica os dias em que não foram rejeitadas larvas dos filtros de retenção mais pequenos. O dia 0 corresponde ao dia de fecundação.

2.2.4 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o software SPSS V 14.0.1 (SPSS, Inc.).

Para comparação do tamanho das larvas entre os dois grupos, CONTROL e RHODO foi usado o teste-T de Student. Para os dados de sobrevivência foi utilizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney (Zar, 1999). Em ambos os testes usou-se 0,05 como nível de significância.

2.3 Análise da composição bioquímica

Para análises da composição bioquímica das microalgas e das larvas de amêijoia japonesa, em ambos os trabalhos foram utilizados os mesmos procedimentos.

A análise da composição de ácidos gordos foi realizada em amostras frescas de microalgas e de larvas da amêijoia japonesa, enquanto para composição C:N foram utilizadas amostras liofilizadas.

2.3.1 Ácidos gordos

A análise de ácidos gordos (AG) foi efectuada através da extracção lipídica de 10 mL de microalga fresca congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguindo o método de Bligh e Dyer (1959). As amostras foram extraídas com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 v/v) e a fase polar separada mediante a adição de clorofórmio e água (1:1 v/v). As fases separaram-se por ligeira centrifugação (3 minutos a 1500 rpm). A fase apolar foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionaram 50 μL de uma solução 1 mg/mL de Triheptadecanoína (Sigma, St. Louis, MO.) como standard interno. Após a evaporação do clorofórmio com baixo fluxo de nitrogénio, os extractos lipídicos foram submetidos a metanólise durante 2,5 horas a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante a adição de 2,5 mL de $\text{HCl}:\text{CH}_3\text{OH}$ (5 % w/w) (Sato e Murata, 1988). Os metil-ésteres dos ácidos gordos assim extraídos, foram separados da fase polar mediante dupla extracção com hexano. O volume final de hexano reduziu-se a 100 μL para posterior análise num cromatógrafo de gases-espectrómetro de massas (GC-MS) Perkin-Elmer 800-8000 Series, usando uma coluna Omegawax™ 250 fused silica (Supelco) de 30 m e 0,25 mm de diâmetro. As condições de análises utilizadas foram as seguintes: volume injectado, 1 μL ; gás portador, He; fluxo do gás portador na coluna, 0,8 mL minuto^{-1} relação split (1:99); temperatura injector: $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ciclo do cromatógrafo: tempo “splitless” 1 minuto; temperatura: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 minuto; rampa de $35\text{ }^{\circ}\text{C}\text{ minuto}^{-1}$ até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$; $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 55 minutos. Ciclo de aquisição de espectros de massas: retardo do solvente, 4,5 minutos; classificação de massas, 0,50-400; tempo inter-scan, 30 segundos.

Os ácidos gordos foram identificados mediante a comparação dos espectros de massas com os espectros contidos na livraria de espectros de massas WIST/NBS.

O cálculo da concentração foi realizado através da integração da área dos picos, que no sistema GS-MS é directamente proporcional à massa, e comparado com a concentração do standard interno.

2.3.2 Carbono-Nitrogénio

A análise da composição C:N foi realizada em triplicado utilizando a biomassa previamente liofilizada. Pesaram-se 1-2 mg das amostras numa balança analógica Sartorius ($\pm 0,001$ mg) numa cápsula especial de estanho. Para realização das análises utilizou-se um auto-analisador Carlo Erba EA 1108 equipado com um auto-sampler AS200.

O método analítico baseia-se na oxidação instantânea e completa da amostra que converte todas as substâncias orgânicas e inorgânicas em produtos da combustão. Os gases resultantes da combustão passam através de um forno de redução e são varridos ao interior da coluna cromatográfica (Porapak PQS) pelo gás transportador, neste caso hélio, onde são separados à concentração dos componentes individuais da amostra.

O instrumento calibra-se com acetanilida, standard aconselhado para amostras com elevado conteúdo orgânico e a concentração das amostras é calculada mediante um algoritmo de regressão linear em base à área dos picos gerados pelo detector. Para a realização destes cálculos o auto-analisador está equipado com um computador (EAGER 200 Workstation).

2.3.3 Proteína

O teor em proteína foi calculado através do teor de nitrogénio multiplicando pelo factor 5,8 ($N \times 5,8$) proposto por Gnaiger e Bitterlich (1984).

3. Resultados

3.1 Produção de *Pavlova lutheri*

3.1.1 Densidades celulares da microalga marinha *Pavlova lutheri*

No crescimento das culturas em *batch*, iniciados com uma densidade celular idêntica em todos os grupos ($2,44 \times 10^6$ células mL⁻¹), foram observadas diferenças significativas nas densidades finais no final da fase logarítmica (Figura 16).

O crescimento mais elevado observado para a microalga *P. lutheri* foi no grupo ALGAL+OHM o qual atingiu valores de $74,4 \times 10^6$ células mL⁻¹. Seguiram-se os grupos ALGAL ($34,6 \times 10^6$ células mL⁻¹) e ABONO+OLIGO ($29,4 \times 10^6$ células mL⁻¹) com densidades celulares semelhantes, tendo sido o grupo ABONO ($13,4 \times 10^6$ células mL⁻¹) aquele que obteve o valor mais baixo (Figura 16).

A fase de estabilização celular observou-se a partir do 13^o dia em todos os grupos, excepto no grupo ABONO (Figuras 16 e 17). O grupo ALGAL+OHM foi o que apresentou maiores densidades celulares de estabilização, com $32,4 \times 10^6$ células mL⁻¹. O grupo ALGAL e ABONO+OLIGO ao longo do regime de renovação mostraram sempre densidades celulares muito próximas e, estabilizaram em $21,4$ e $21,9 \times 10^6$ células mL⁻¹, respectivamente. O grupo ABONO não mostrou estabilidade com as renovações, não resistindo inclusivamente a uma taxa de renovação (TR) de 20%.

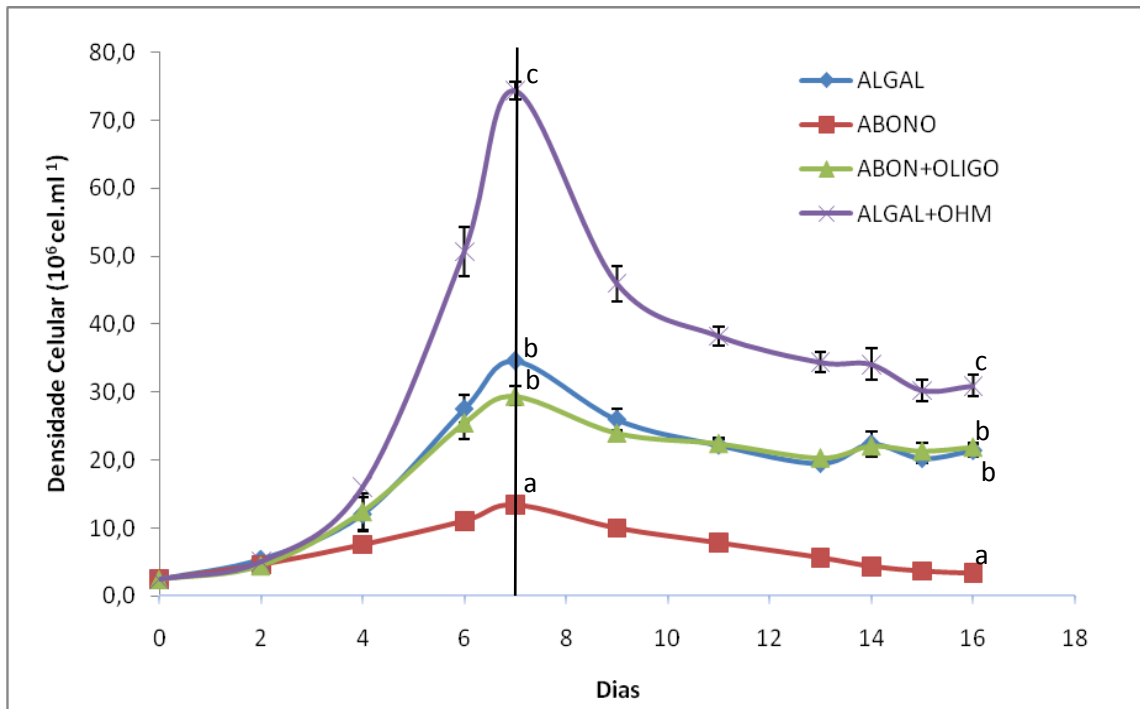


Figura 16 – Densidades celulares da microalga *P. lutheri* observadas nos diferentes grupos ao longo do tempo. O crescimento exponencial corresponde à fase de crescimento descontínuo (*batch*), sendo iniciado o regime semi-contínuo, com renovações diárias, a partir do dia 7, marcado pela recta vertical.

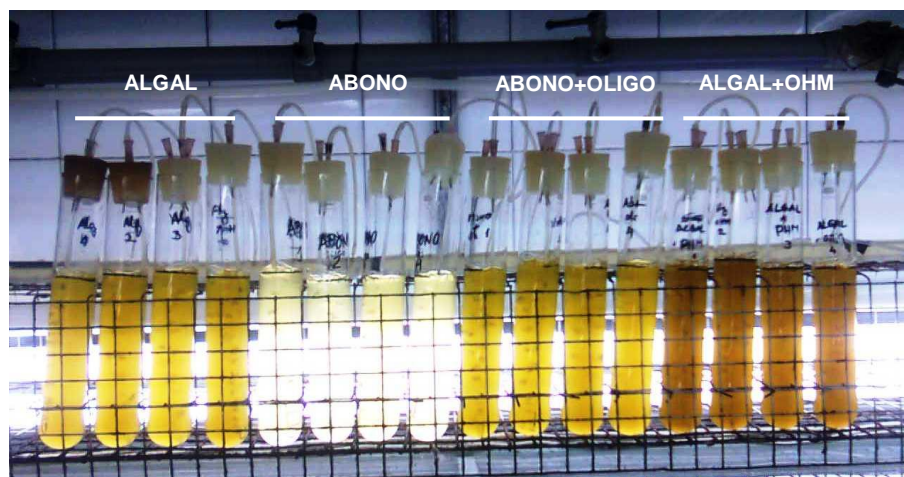


Figura 17 – Estabilização das culturas de *P. lutheri* em regime semi-contínuo com taxa de renovação diária de 25% para os grupos ALGAL, ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM e TR 20% para o grupo ABONO (Fotografia: Pedro Nascimento).

3.1.2 Peso seco da biomassa e peso celular

O peso celular, o peso seco da biomassa (g L^{-1}), no final do crescimento logarítmico foi significativamente mais elevado no grupo ALGAL+OHM ($1,36 \text{ g L}^{-1}$) e, mais baixa no grupo ABONO ($0,80 \text{ g L}^{-1}$). Nos grupos ALGAL e ABONO+OLIGO observou-se um valor próximo a $1,08 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 18).

Na fase de estabilização das culturas no regime semi-contínuo o grupo ALGAL+OHM manteve o maior peso seco da biomassa ($0,78 \text{ g L}^{-1}$), seguindo-se os grupos ABONO+OLIGO ($0,70 \text{ g L}^{-1}$) > ALGAL ($0,65 \text{ g L}^{-1}$) > ABONO ($0,22 \text{ g L}^{-1}$)(Figura 19).

O peso celular variou entre os diferentes grupos no final do crescimento logarítmico. O maior peso celular foi obtido pelas células do grupo ABONO com peso médio de $53 \pm 4,4$ pg, enquanto o menor peso celular foi obtido pelas células do grupo ALGAL+OHM com peso médio de $19 \pm 0,3$ pg. Os grupos ABONO+OLIGO e ALGAL tiveram pesos semelhantes, com $37 \pm 4,9$ e $34 \pm 1,7$ pg, respectivamente (Tabela 4).

Na fase de estabilização do regime semi-contínuo os pesos celulares também foram diferentes para as microalgas dos diferentes grupos, onde mais uma vez o maior peso celular pertenceu ao grupo ABONO, com $70 \pm 4,7$ pg. O grupo ALGAL+OHM apresentou mais uma vez o menor peso celular, $27 \pm 0,9$ pg, enquanto os grupos ABONO+OLIGO e ALGAL obtiveram valores semelhantes, $34 \pm 1,4$ e $32 \pm 4,9$ pg respectivamente (Tabela 4).

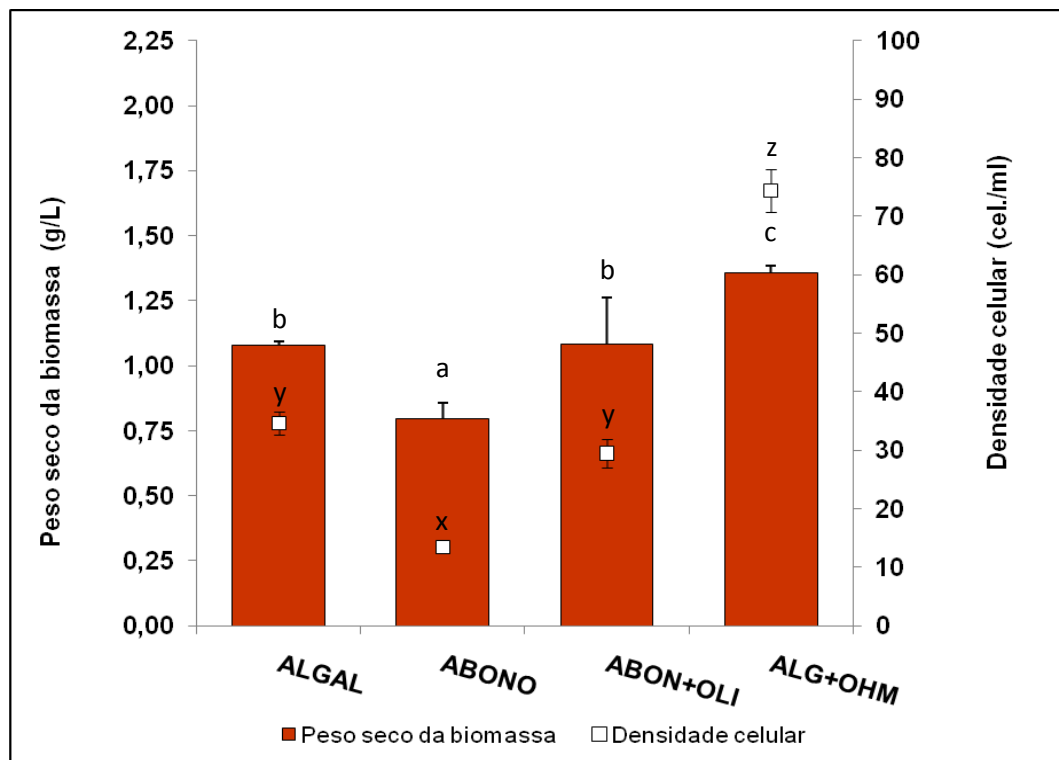


Figura 18 – Densidade celular e peso seco da biomassa das culturas de *P. lutheri* no final do regime descontínuo, para os diferentes grupos. Diferentes letras indicam existência de diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$ (a,b,c – peso seco da biomassa; x,y,z – densidade celular).

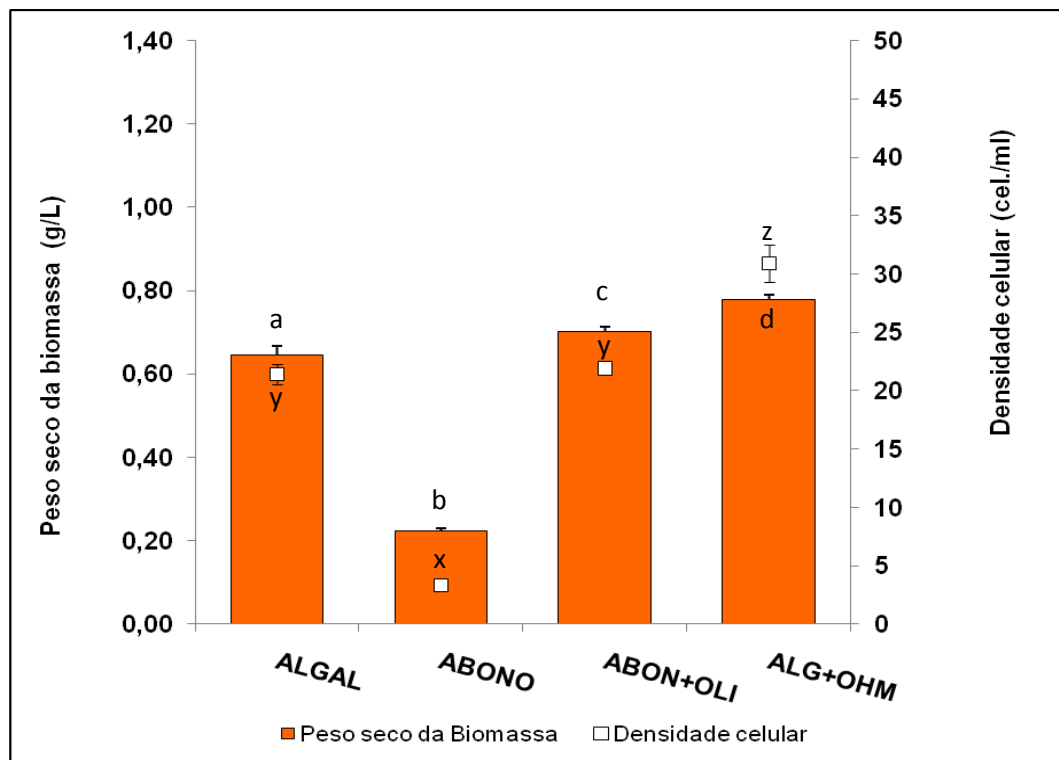


Figura 19 – Densidade celular e peso seco da biomassa das culturas de *P. lutheri* na fase de estabilização (steady-state) do regime semi-contínuo, para os diferentes grupos. Diferentes letras indicam existência de diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$ (a,b,c – peso seco da biomassa; x,y,z – densidade celular).

Tabela 4 – Peso seco celular obtido através dos microfiltros.

	Batch (pg)	Semi-contínuo (pg)
ALGAL	34,2 ^b ± 1,7	31,6 ^b ± 4,9
ABONO	53,1 ^a ± 4,4	69,6 ^a ± 4,7
ABONO+OLIGO	37,3 ^b ± 4,9	34,4 ^b ± 1,4
ALGAL+OHM	18,6 ^c ± 0,3	27,4 ^b ± 0,9

Diferentes letras indicam existência de diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

3.1.3 Composição bioquímica da microalga marinha *Pavlova lutheri* em diferentes meios de cultura

Apenas se realizaram análises bioquímicas à biomassa obtida na fase de estabilização das culturas em regime semi-contínuo.

Carbono-Nitrogénio e teor proteico

Na Tabela 5 podemos observar as relações C:N obtidas para os grupos ALGAL, ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM com TR 25% e para o grupo ABONO com TR 20%. A maior relação de C:N observou-se no grupo ABONO, com 10,3. O grupo com menor relação C:N foi o grupo ABONO+OLIGO, com 7,4.

O grupo ABONO+OLIGO foi o grupo que apresentou maior teor proteico, com 42,8%, seguido dos grupos ALGAL (39,0%), ALGAL+OHM (35,7%) e ABONO (27,1%).

Tabela 5 – Relação C:N e % proteína (% N \times 5,8) na microalga marinha *Pavlova lutheri*, no período de estabilização do regime semi-contínuo (TR 25 %)

	ALGAL	ABONO*	ABONO+OLIGO	ALGAL+OHM
C:N	7,5 \pm 0,03	10,7 \pm 0,2	8,0 \pm 0,1	8,1 \pm 0,1
% Proteína	39,0 \pm 1,6	27,1 \pm 0,4	42,8 \pm 0,1	35,7 \pm 0,4

* TR 20% para o grupo ABONO

Ácidos gordos

Observaram-se diferenças quantitativas no perfil de ácidos gordos da microalga *P. lutheri* na fase de estabilização do regime semi-contínuo nos 3 diferentes meios nutritivos analisados. Não se analisou a biomassa do grupo ABONO devido à baixa produtividade dos mesmos.

O teor de ácidos gordos saturados rondou os 32% nos grupos ALGAL e ABONO+OLIGO, sendo ligeiramente inferior no grupo ALGAL+OHM enquanto a soma dos ácidos gordos mono-insaturados mostrou valores próximos nos grupos ALGAL e ABONO+OLIGO (22 – 23%), apresentando teores mais baixos no grupo ALGAL+OHM, 18% (Tabela 6).

O teor de ácidos gordos PUFAs mostrou uma tendência para se correlacionar com a densidade celular de estabilização, com valores entre os 44 e os 52% para os três

grupos, sendo o grupo ALGAL o grupo com menor teor e o grupo ALGAL+OHM o grupo com maior teor (Tabela 6).

O ácido gordo poliinsaturado EPA (20:5n3) foi o mais abundante nos três grupos, representando entre 22 e 26% do total de AG, nos grupos ALGAL, ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM. O ácido gordo DHA variou entre os 6 e os 9% do total de AG (ALGAL+OHM < ABONO+OLIGO < ALGAL).

O ácido palmítico (16:0) mostrou valores semelhantes nos três grupos, entre os 18 – 19%, sendo o segundo ácido gordo mais representativo nos grupos ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM. No grupo ALGAL o ácido gordo mono-insaturado 16:1 foi o segundo mais representativo (19%).

Tabela 6 – Composição de ácidos gordos (% total AG) de *Pavlova lutheri* produzida em regime semi-contínuo com uma taxa de renovação de 25% em diferentes meios de cultura, ajustados a 8 mM de nitrato.

Ácido gordo	ALGAL	ABONO+OLIGO	ALGAL+OHM
14:0	13,2 ± 3,8	12,4 ± 0,8	11,8 ± 1,4
16:0	18,5 ± 3,0	19,1 ± 0,9	18,4 ± 1,6
16:1	18,9 ± 2,6	17,1 ± 1,0	14,5 ± 1,5
18:0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
18:1n7	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0
18:1n9	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,0	2,3 ± 0,1
18:2n6	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,4 ± 0,0
18:3n6	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0
18:3n3	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1
18:4n3	9,1 ± 0,6	8,7 ± 0,0	12,2 ± 0,3
20:5n3	22,1 ± 4,5	23,4 ± 1,4	25,6 ± 2,5
22:5n6	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	1,8 ± 0,5
22:6n3	8,7 ± 3,7	8,0 ± 1,1	6,2 ± 1,4
∑ Saturados	32,4 ± 6,6	32,1 ± 1,8	30,7 ± 3,0
∑ Mono-insaturados	23,4 ± 2,3	21,7 ± 0,9	17,6 ± 1,4
∑ PUFA	44,1 ± 8,9	46,2 ± 2,7	51,7 ± 4,4
∑ n-3	42,0 ± 8,5	43,2 ± 2,4	46,6 ± 3,6
∑ n-6	2,2 ± 0,4	3,0 ± 0,2	5,1 ± 0,8

Não foram realizadas análises bioquímicas ao grupo ABONO devido à muito baixa produtividade e falta de estabilização deste grupo.

3.2. Produção de Amêijoja japonesa

3.2.1 Crescimento das microalgas e dieta

Apesar das culturas utilizadas para a alimentação da amêijoja japonesa não poderem ser considerados como culturas contínuas de forma *stricta*, uma vez que não foram renovados diariamente mas sim cada 2 ou 3 dias, as densidades celulares nos dias de renovação foram bastante similares, permitindo que fosse possível manter as dietas de forma pouco variável nos dias de alimentação. No entanto, houve algumas variações nas densidades no decorrer da experiência, excepto para *Rhodomonas lens* que se mostrou mais estável. Na Figura 20 podemos observar como variaram as densidades celulares das microalgas ao longo dos 22 dias de cultura.

Isochrysis galbana foi a microalga que atingiu densidades celulares mais elevadas, 30×10^6 células mL^{-1} . *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros* sp. e *Rhodomonas lens* atingiram densidades celulares máximas de $21,7 \times 10^6$, $12,6 \times 10^6$ e $6,3 \times 10^6$ células mL^{-1} respectivamente.

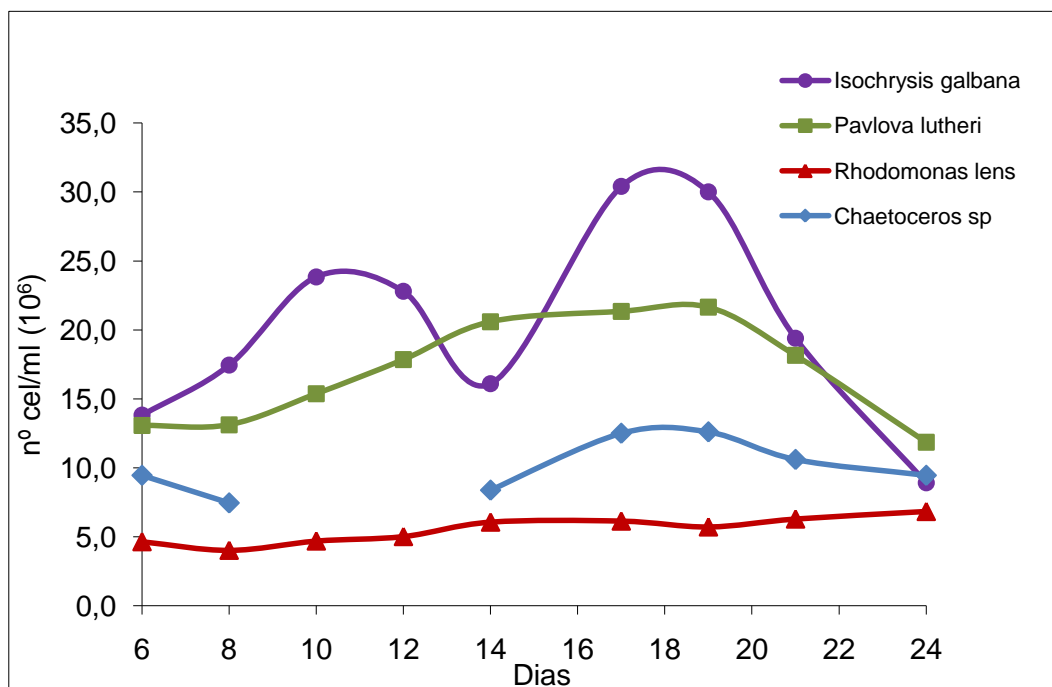


Figura 20 – Densidade celular das microalgas marinhas *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Rhodomonas lens* e *Chaetoceros* sp., cultivadas em balões de fundo raso de 6 L em regime semi-contínuo com TR 30% a cada 2 ou 3 dias, durante os 22 dias de cultivo. No dia 12 foi adicionado *Chaetoceros* proveniente de balões de fundo raso em regime descontínuo.

As dietas com duas ou três espécies de microalgas de alto valor nutricional, incluindo uma diatomácea de tamanho adequado e uma flagelada, proporcionam um melhor crescimento e desenvolvimento larvar do que mono-dietas (Helm, 2004). A dieta fornecida ao grupo CONTROL foi composta por uma diatomácea e por duas flageladas. A dieta fornecida ao grupo RHODO, no final, diferiu da dieta CONTROL pela substituição de 26,5% do peso total da mistura do grupo CONTROL, pela substituição pela criptófita flagelada *Rhodomonas lens*.

Apesar de ter havido variação na concentração celular das culturas das microalgas, as dietas pouco variaram quantitativamente ao longo do tempo nos dois grupos (Figura 21). No final da experiência foram fornecidos ao grupo CONTROL 10916 mg de microalga (peso seco), enquanto ao grupo RHODO foram dados 10688 mg, com uma ligeira diferença de apenas 2,1%.

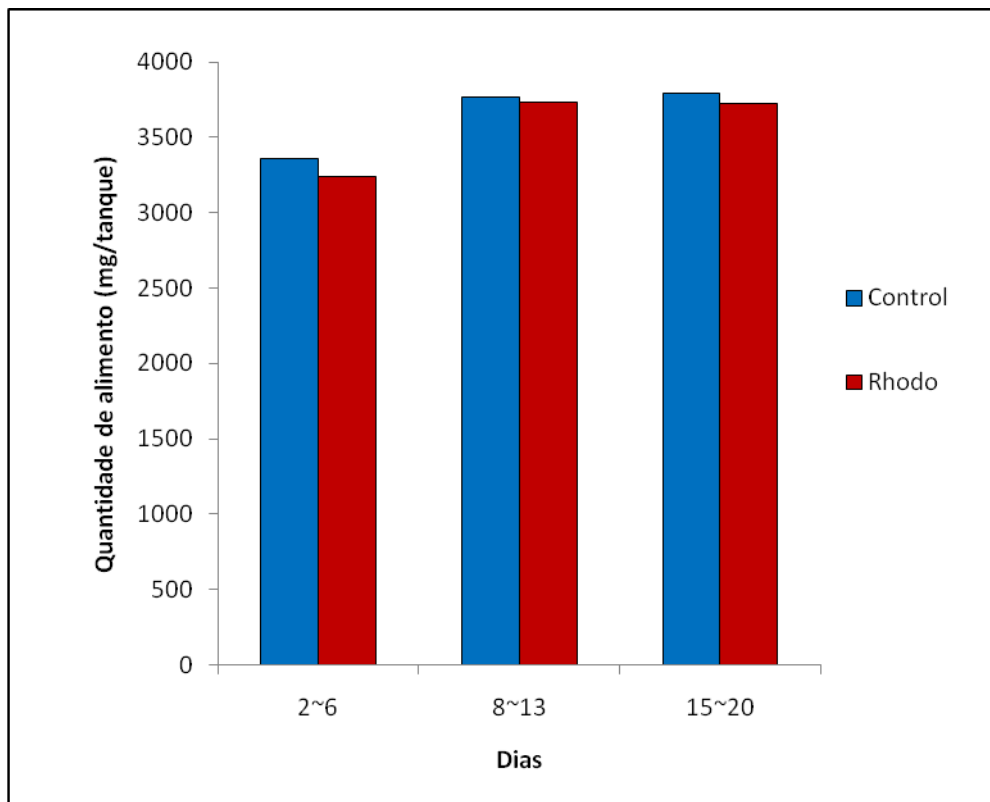


Figura 21 – Quantidade total de alimento dado por tanque ao longo da experiência e separada por semanas. A primeira alimentação foi efectuada no 2º dia após a fecundação.

3.2.2 Larvas: sobrevivência e crescimento

Sobrevivência

Como se pode observar na figura 22, a sobrevivência das larvas foi diminuindo ao longo do tempo. No dia 6, observou-se uma maior sobrevivência do grupo RHODO (94%) do que no grupo CONTROL, tendo sido semelhantes nos dias 10 e 15. Para os dois últimos dias de cálculo de sobrevivência, 17 e 22, o grupo RHODO (6,8 e 1,5%) apresentou maiores valores de sobrevivência que o grupo CONTROL (3,7 e 0,4%), sendo estes valores significativos ($P < 0,05$).

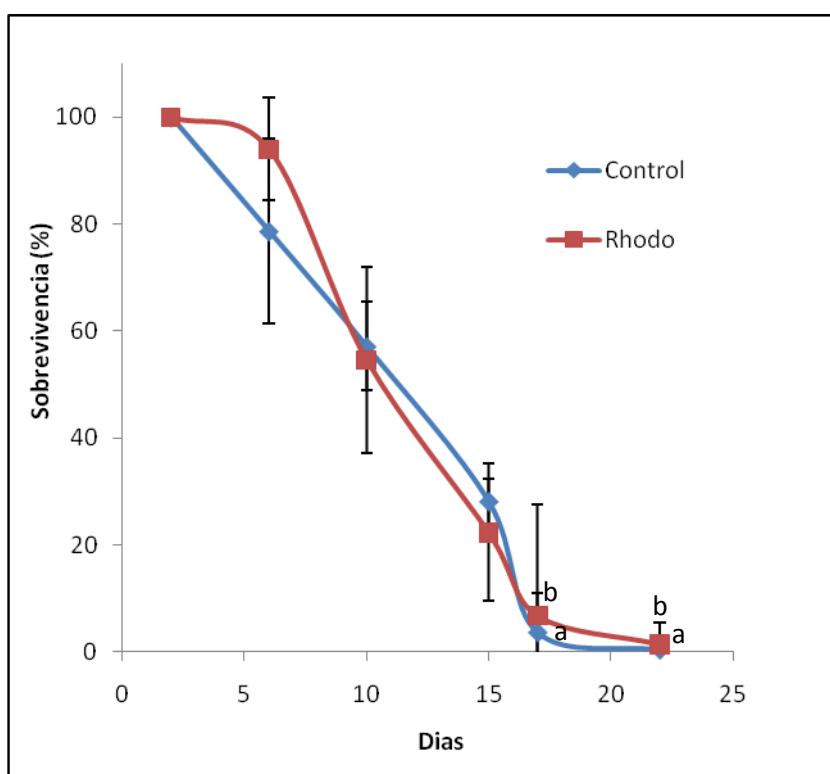


Figura 22 – Sobrevivência das larvas de *R. philippinarum* nos grupos CONTROL e RHODO ao longo do período da experiência. Letras diferentes indicam existência de diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

Crescimento

48 horas após a fecundação, todas as larvas retidas no crivo de 60 μm eram velígeras D (Figura 23), com tamanho médio de $102 \pm 6,8 \mu\text{m}$. No filtro de 41 μm ficaram retidas larvas trocóforas perfeitas, trocóforas deformadas, ovos nas primeiras divisões e óvulos por fecundar.

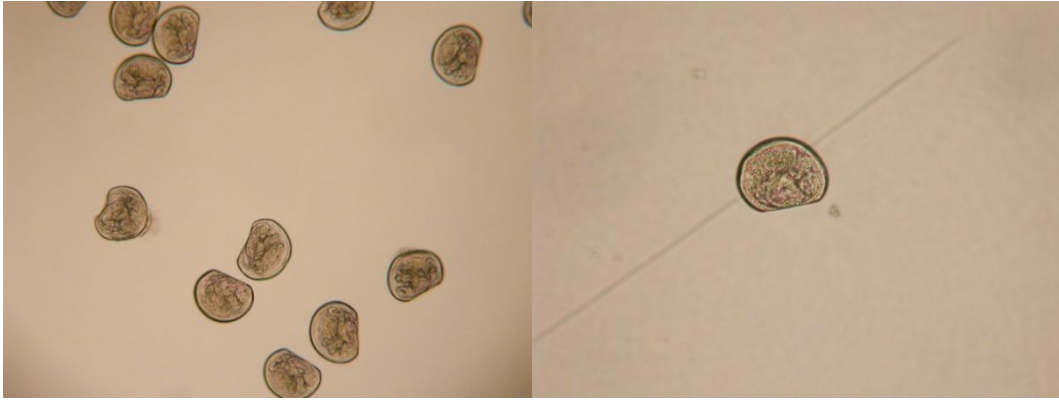


Figura 23 - Larvas D de *Ruditapes philippinarum* com 48 horas de vida, após fecundação, com tamanho médio de 102 μm (Fotografia: Pedro Nascimento).

No dia 11 observaram-se as primeiras larvas velígeras umboladas e, no dia 20, cerca de 30% dos indivíduos de cada tanque apresentavam pé. No dia 22 quase todos os indivíduos eram já larvas pedivelígeras, representando cerca de 90% do total de cada tanque. Na Tabela 7 podemos observar o tamanho médio das larvas por tanque durante o período da experiência, não havendo diferenças significativas entre os triplicados de cada grupo nos diferentes dias. Entre os grupos há diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tamanhos médios das larvas nos dias 8, 20 e 22, sendo que nos restantes dias as diferenças não foram significativas (Figura 24).

Tabela 7 – Média \pm s.d. das medições efectuadas às larvas (30 indivíduos por tanque) de *R. philippinarum* ao longo da experiência.

CONTROL			
Dia	Tanque: 1	2	3
2	102,3 \pm 6,8	102,3 \pm 6,8	102,3 \pm 6,8
4	112,0 \pm 6,6	111,0 \pm 6,6	111,7 \pm 7,9
6	124,7 \pm 8,2	122,3 \pm 9,0	124,0 \pm 7,2
8	131,0 \pm 8,4	128,0 \pm 8,1	127,0 \pm 8,4
10	136,3 \pm 8,5	140,3 \pm 7,2	139,7 \pm 8,1
13	150,7 \pm 10,1	153,7 \pm 10,0	157,7 \pm 7,7
15	161,3 \pm 8,2	167,7 \pm 11,0	164,3 \pm 12,2
17	184,0 \pm 8,6	184,3 \pm 11,9	184,0 \pm 9,3
20	190,0 \pm 7,4	187,0 \pm 8,8	190,3 \pm 11,0
22	204,7 \pm 14,1	206,0 \pm 13,8	202,0 \pm 13,5

RHODO			
Dia	4	5	6
2	102,3 \pm 6,8	102,3 \pm 6,8	102,3 \pm 6,8
4	113,0 \pm 6,5	112,7 \pm 6,9	113,0 \pm 7,5
6	121,7 \pm 7,9	125,3 \pm 7,8	122,0 \pm 10,6
8	133,7 \pm 8,9	133,7 \pm 12,5	133,0 \pm 9,5
10	140,3 \pm 8,1	141,0 \pm 7,6	141,3 \pm 6,8
13	157,7 \pm 9,7	158,3 \pm 12,6	157,3 \pm 10,8
15	169,7 \pm 12,7	173,0 \pm 13,2	169,3 \pm 12,6
17	185,3 \pm 10,1	189,3 \pm 17,6	195,0 \pm 14,1
20	202,3 \pm 15,2	209,0 \pm 17,3	208,0 \pm 18,6
22	217,3 \pm 16,8	220,0 \pm 14,9	220,0 \pm 17,2

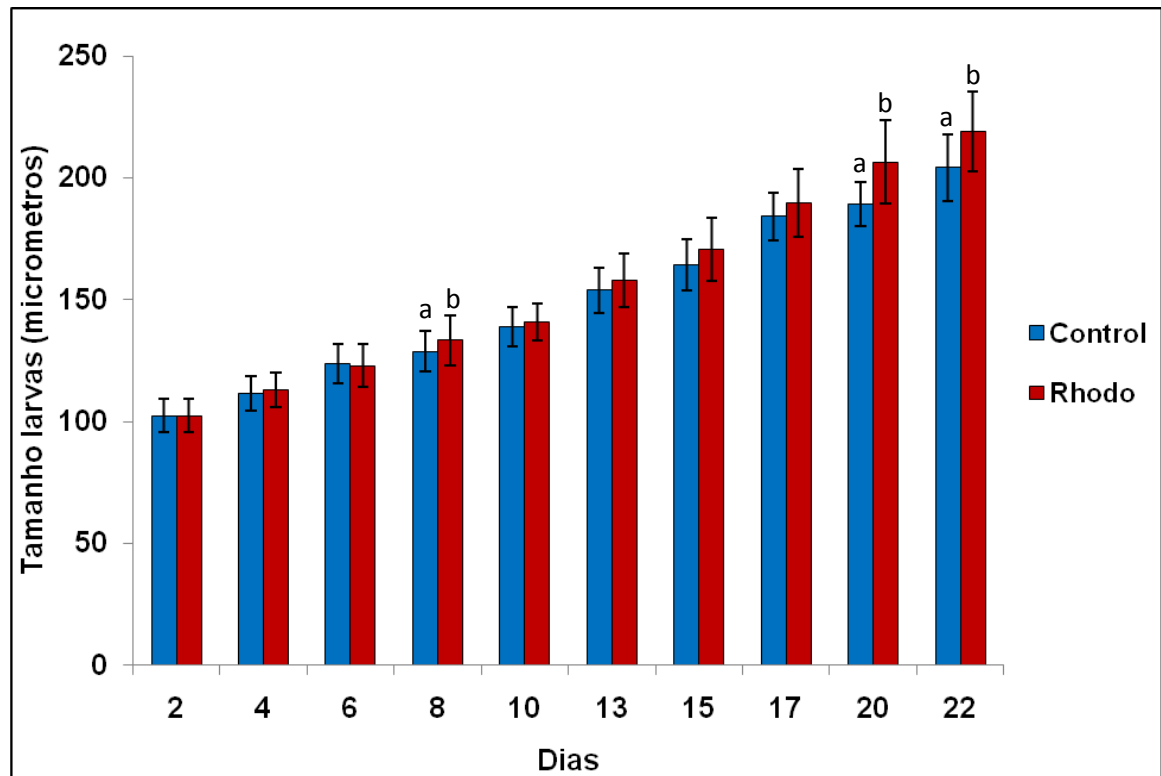


Figura 24 – Comparação do tamanho médio das larvas de *R. philippinarum* dos grupos CONTROL (alimentadas com *I. galbana*, *Chaetoceros* sp. e *P. lutheri*) e RHODO (alimentadas com *R. lens*, *I. galbana*, *Chaetoceros* sp. e *P. lutheri*). Diferentes letras indicam existência de diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$, nos dias 8, 20 e 22.

3.2.3 Composição bioquímica

Microalgas

Carbono-Nitrogénio e Proteína

Observou-se diferentes relações de carbono-nitrogénio nas diferentes microalgas como podemos observar na Tabela 8. A microalga *R. lens* obteve os valores mais baixos para a relação C:N, enquanto *I. galbana* obteve os valores mais altos. Para relações menores de C:N maior é a quantidade de proteína existente na microalga, sendo a *R. lens* a mais rica em proteína, seguindo-se da *P. lutheri*, *I. galbana* e *Chaetoceros* (Tabela 8).

Tabela 8 – Relação Carbono-Nitrogênio e teor proteico (%) das microalgas produzidas em regime semi-contínuo com TR 30% a cada 2 ou 3 dias.

Microalgas	C:N	% Proteína
<i>Pavlova lutheri</i>	9,3 ± 0,1	32,9 ± 0,2
<i>Rhodomonas lens</i>	5,1 ± 0,1	54,0 ± 1,4
<i>Isochrysis galbana</i>	11,0 ± 0,03	27,5 ± 0,2
<i>Chaetoceros</i> sp.	8,8 ± 0,03	22,3 ± 0,02

Ácidos gordos

A composição de ácidos gordos (% do total AG) das diferentes microalgas usadas para dieta das larvas de *R. philippinarum* apresentaram diferenças tanto qualitativas como quantitativas (Tabela 9).

Chaetoceros sp. foi a microalga que apresentou maior teor em ácidos gordos saturados, representando 51,6%, enquanto para as microalgas *Isochrysis*, *Rhodomonas* e *Pavlova* os valores foram entre 32 e 36%.

A soma de ácidos gordos mono-insaturados foi diferente nas diferentes microalgas: 36% em *I. galbana*, 25% em *P. lutheri* 18,2% em *Chaetoceros* e 7,7% em *R. lens*.

Os ácidos gordos PUFAs representaram mais de 30% nas quatro espécies diferentes, *R. lens* apresentou o maior teor (56,6%).

O ácido gordo mais abundante em cada espécie foi diferente. Para *Pavlova lutheri* foram identificados dois ácidos gordos com cerca 22% do total de ácidos gordos: o ácido gordo EPA (20:5n3) e o ácido gordo palmítico (16:0). Com 27% os ácidos gordos insaturados 16:1 e 18:3n3 foram os ácidos gordos com maior teor nas microalgas *Isochrysis galbana* e *Rhodomonas lens*, respectivamente. Em *Chaetoceros* predominou o ácido gordo 14:0 com 45%.

Tabela 9 – Composição em ácidos gordos (% do total de AG) das diferentes espécies de microalgas usadas nas dietas CONTROL e RHODO.

<i>Ácido gordo</i>	<i>P. lutheri</i>	<i>R. lens</i>	<i>I. galbana</i>	<i>Chaetoceros</i>
14:0	12,2 ± 1,1	12,2 ± 0,6	7,5 ± 0,2	44,8 ± 0,7
16:0	22,7 ± 1,7	22,2 ± 1,2	23,8 ± 0,9	5,3 ± 0,2
16:1	18,4 ± 0,7	2,6 ± 0,4	26,8 ± 0,9	14,1 ± 0,9
16:2	n.o.	n.o.	n.o.	0,9 ± 0,2
16:3	n.o.	n.o.	n.o.	2,9 ± 0,1
18:0	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1
18:1n11	n.o.	n.o.	n.o.	1,8 ± 0,1
18:1n9	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1	4,2 ± 0,2	2,3 ± 0,1
18:1n7	5,2 ± 0,4	2,5 ± 0,4	4,9 ± 0,0	n.o.
18:2n6	1,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	0,7 ± 0,0	2,4 ± 0,0
18:3n6	0,8 ± 0,0	n.o.	n.o.	n.o.
18:3n3	2,1 ± 0,1	26,6 ± 0,3	0,9 ± 0,0	3,1 ± 0,0
18:4n3	n.o.	9,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
20:4n6	0,3 ± 0,0	n.o.	1,5 ± 0,0	9,4 ± 0,7
20:4n3	n.o.	0,4 ± 0,3	n.o.	n.o.
20:5n3	21,9 ± 0,5	8,2 ± 0,7	13,1 ± 0,4	10,0 ± 0,9
22:5n6	0,6 ± 0,2	n.o.	1,6 ± 0,2	n.o.
22:6n3	11,8 ± 2,8	8,8 ± 1,9	10,3 ± 1,0	0,5 ± 0,2
∑ Saturados	36,1 ± 3,0	35,7 ± 1,8	32,4 ± 0,9	51,6 ± 0,9
∑ Mono	25,0 ± 1,3	7,7 ± 1,0	36,0 ± 1,0	18,2 ± 0,9
∑ PUFA	38,9 ± 4,3	56,6 ± 2,4	31,6 ± 1,6	30,2 ± 1,8
∑ n-3	35,8 ± 4,2	53,3 ± 2,5	27,8 ± 1,4	4,6 ± 0,2
∑ n-6	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,8 ± 0,2	11,8 ± 0,7

n.o. – não observado.

As microalgas foram produzidas em balões de fundo raso de 6 L, em meio ALGAL-1, em regime semi-contínuo com renovações de 30% a cada 2 ou 3 dias, e luz durante 24 horas. Média ± s.d. (análise em triplicado).

Larvas *Ruditapes philippinarum**Carbono-Nitrogénio*

Na amostragem realizada às larvas de *R. philippinarum* com 10 dias de vida, a relação C:N apresentou valores entre 10 e 13, não havendo grandes diferenças entre os tanques com diferentes dietas (Tabela 10).

Tabela 10 – Relação Carbono-Nitrogénio de larvas com 10 dias de idade de *R. philippinarum*, alimentadas com duas dietas diferentes.

Tanque	CONTROL			RHODO		
	1	2	3	4	5	6
C:N	12,7 ± 0,01	10,1 ± 0,6	10,4 ± 0,0	10,6 ± 0,3	12,8 ± 1,9	10,4 ± 0,0

Nas larva D com 48 horas de vida, a relação C:N foi de 10,2, havendo um aumento desta relação para larvas com 10 dias de vida. Entre os dois grupos CONTROL e RHODO não houve grandes diferenças na relação C:N apresentando as larvas dos dois grupos uma relação C:N de aproximadamente 11 (Tabela 11).

Tabela 11 – Evolução da relação C:N das larvas D com 48 horas para as larvas de amêijoia japonesa com 10 dias, alimentadas com dietas diferentes.

	D	CONTROL	RHODO
C:N	10,2 ± 0,50	11,1 ± 1,4	11,3 ± 1,3

Os resultados obtidos da amostragem das larvas com 22 dias foram rejeitados uma vez que a falta de larvas nas amostras deram valores incoerentes, não representativos da realidade. Tal deveu-se ao baixo número de indivíduos recolhidos para amostra e excesso de sal na amostra.

Ácidos gordos

As diferentes dietas originaram diferenças na composição em ácidos gordos das larvas dos diferentes grupos e nas diferentes amostragens (Tabela 12).

Nas larvas D, a soma dos AG saturados, assim como a soma dos ácidos gordos PUFAs apresentaram cada uma valores entre os 37 e os 38%, enquanto a soma de ácidos gordos mono-insaturados representou 25%. O AG palmítico (16:0) foi o mais representativo nas larvas D com 26% do teor de ácidos gordos. Já o ácido gordo eicosapenténico (EPA, 20:5n3) foi o segundo mais representativo das larvas D, com 12,5%. O ácido gordo DHA (22:6n3) apenas representou 6,2%.

O teor de PUFAs foi diferente ao longo do tempo nos dois grupos. No grupo CONTROL houve um ligeiro aumento do seu teor até ao dia 10 (40%), baixando depois para os 26% até ao dia 22. Já no grupo RHODO verificou-se uma descida gradual no teor dos ácidos gordos PUFAs, até aos 33%. O teor em ácidos gordos saturados aumentou ao longo dos dias em ambos os grupos, atingindo 47% e 43% do total de ácidos gordos nos grupos CONTROL e RHODO, respectivamente. O teor de ácidos gordos mono-insaturados ao longo do crescimento das larvas mostrou alguma variação, no entanto manteve valores semelhantes ao das larvas D, aproximadamente 25%. Observou-se o mesmo com o teor do ácido gordo palmítico (16:0) que apresentou aproximadamente o mesmo teor, 26%, sendo o ácido gordo mais abundante em todas elas.

O teor do ácido gordo EPA manteve o mesmo valor ao fim de 10 dias de crescimento larvar, descendo ligeiramente no grupo RHODO (10,7%) e mais no grupo CONTROL (6,6%) até ao 22º dia de vida das larvas. O ácido gordo DHA mostrou um aumento do seu teor no dia 10 em ambos os grupos, 13,4 e 11,1 % nos grupos CONTROL e RHODO, respectivamente. Já no dia 22 houve um decréscimo deste ácido gordo para 4,4% no grupo CONTROL e 9,6% para o grupo RHODO.

Quando comparada a composição bioquímica das larvas alimentadas com diferentes dietas, não houve diferenças representativas nos teores de ácidos gordos no dia 10, sendo que a maior diferença observou-se no teor de ácidos gordos PUFAs, com 40% no grupo CONTROL e 36% no grupo RHODO.

Já no dia 22 observaram-se algumas diferenças representativas no teor de ácidos gordos saturados (CONTROL (47%) > RHODO (43%)), mono-insaturados (CONTROL (27%) > RHODO (24%)) e PUFAs (CONTROL (26%) < RHODO (33%)). O ácido gordo EPA (20:5n3) foi o segundo mais representativo no grupo RHODO (11%), enquanto no grupo CONTROL o seu teor foi de 6,6%. O ácido gordo mono-insaturado 16:1 foi o segundo mais representativo do grupo CONTROL com 13%, contra 8,4% no grupo RHODO.

Tabela 12 – Composição em ácidos gordos (% do total de AG) das larvas de *R. philippinarum*, das 3 amostragens realizadas, larvas D, grupo CONTROL e grupo RHODO para 10 e 22 dias de vida.

Ácidos Gordos	2 dias		10 dias		22 dias	
	larva D	CONTROL	RHODO	CONTROL	RHODO	
14:0	3,9 ± 0,1	4,7 ± 0,6	5,3 ± 1,0	6,2 ± 0,2	6,8 ± 1,0	
15:0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1	
16:0	26,3 ± 0,6	26,8 ± 0,4	25,7 ± 2,3	27,0 ± 2,0	27,0 ± 2,3	
16:1	9,2 ± 0,3	6,4 ± 0,2	7,3 ± 1,3	13,2 ± 4,1	8,4 ± 1,4	
16:2	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,8	4,2 ± 0,9	1,7 ± 0,5	
18:0	6,3 ± 0,2	6,0 ± 4,7	9,2 ± 1,9	11,9 ± 1,8	8,4 ± 1,0	
18:1n9	3,7 ± 0,2	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,7	6,0 ± 2,6	2,7 ± 0,1	
18:1n7	5,3 ± 0,3	8,0 ± 0,8	8,5 ± 1,7	6,7 ± 1,6	9,6 ± 0,2	
18:2n6	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,7	0,7 ± 0,1	
18:3n3	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,0	n.o.	0,2 ± 0,2	
18:4n3	1,1 ± 0,0	3,4 ± 0,8	3,4 ± 0,6	8,6 ± 2,1	4,8 ± 0,9	
20:1n11	3,5 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,6 ± 0,5	1,8 ± 0,3	
20:1n9	1,4 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	n.o.	0,3 ± 0,2	
20:1n7	2,2 ± 0,0	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,3	0,8 ± 0,7	1,4 ± 0,2	
20:2	1,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	n.o.	0,8 ± 0,2	
20:4n6	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 1,0	1,7 ± 0,2	
20:4n3	0,9 ± 0,0	n.o.	n.o.	n.o.	0,1 ± 0,2	
20:5n3	12,5 ± 0,3	12,1 ± 0,5	12,1 ± 0,9	6,6 ± 1,4	10,7 ± 0,9	
22:2n9	2,0 ± 0,1	3,0 ± 2,0	1,7 ± 0,7	n.o.	0,1 ± 0,2	
22:2n7	5,1 ± 0,4	1,3 ± 2,2	1,4 ± 2,4	n.o.	1,8 ± 0,6	
22:3n6	1,6 ± 0,1	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	
22:4n6	0,8 ± 0,1	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	
22:5n6	n.o.	1,7 ± 0,3	1,0 ± 1,0	n.o.	0,4 ± 0,4	
22:5n3	2,2 ± 0,2	0,4 ± 0,7	0,3 ± 0,5	n.o.	n.o.	
22:6n3	6,2 ± 0,4	13,4 ± 1,1	11,1 ± 4,0	4,4 ± 2,6	9,6 ± 2,4	
∑ Saturados	37,3 ± 0,8	38,1 ± 3,7	41,2 ± 5,0	46,5 ± 2,3	43,2 ± 3,0	
∑ Mono	25,3 ± 0,7	22,3 ± 1,2	23,1 ± 2,2	27,3 ± 3,9	24,2 ± 1,1	
∑ PUFA	37,5 ± 1,3	39,6 ± 3,2	35,7 ± 7,2	26,2 ± 5,0	32,6 ± 4,1	
∑ n3	23,7 ± 0,8	29,4 ± 2,1	27,3 ± 4,8	19,6 ± 5,4	25,5 ± 3,1	
∑ n6	4,5 ± 0,2	3,5 ± 0,3	2,8 ± 1,2	2,4 ± 1,3	2,9 ± 0,7	

n.o – não observado. Média ± s.d. (n=3).

4. Discussão de resultados

4.1 Produção de *Pavlova lutheri*

Neste trabalho foram testados diferentes meios de cultura para *Pavlova lutheri*, com o objectivo de otimizar o crescimento celular e a produtividade desta espécie. Apesar de existirem meios de cultura largamente utilizados (Walne, f₂, etc.) para a produção da maior parte das microalgas marinhas (Coutteau, 1996), estes apresentam baixas concentrações de macronutrientes, principalmente nitrogénio e fósforo, o que torna inviável a sua utilização para a produção de forma eficiente de microalgas em sistemas de fotobiorreactores, nos quais as concentrações de nitrogénio habitualmente utilizadas são mais elevadas. Além disso, pouco se sabe sobre os requerimentos específicos de cada grupo de microalgas marinhas. O silício, por exemplo, é imprescindível para as diatomáceas, mas uma limitação em certos oligoelementos ou vitaminas pode conduzir a uma diminuição considerável da densidade de uma determinada cultura. Outros factores como a luz, temperatura, pH, sistema de produção, etc. são também cruciais na optimização da produção de microalgas (Wikfors *et al.*, 1984; Wikfors, 1986; Fábregas *et al.*, 1984, 1986; Richmond, 2004;).

Verificaram-se diferenças significativas no crescimento celular de *Pavlova lutheri* com os diferentes meios de cultura. O grupo ALGAL+OHM foi o que atingiu maior densidade celular em ambos os sistemas de produção, descontínuo e semi-contínuo, seguido dos grupos ALGAL, ABONO+OLIGO com densidades semelhantes, e por fim o grupo ABONO. As diferenças observadas podem ser explicadas pelas diferenças na composição em oligoelementos e vitaminas dos diferentes meios, mostrando a importância da concentração destes no substrato para otimizar as culturas.

Durante a fase de crescimento em descontínuo, o grupo ALGAL+OHM atingiu uma densidade celular de $74,4 \times 10^6$ células mL⁻¹ próximo da fase estacionária, valores muito superiores aos obtidos em regime descontínuo com meio nutritivo f₂: $5-6 \times 10^6$ células mL⁻¹, em mangas de 80-85 L (Dunstan *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993a), 9×10^6 células mL⁻¹, em balões de fundo raso de 2 L (Tatsuzawa e Takizawa, 1995); com meio GPM: 12×10^6 células mL⁻¹, em culturas de 100 mL (Carvalho *et al.*, 2000). Vários factores poderão ter contribuído para estes valores mais elevados: maior eficiência do meio nutritivo ALGAL, relativamente a outros meios nutritivos (Herrero *et al.*, 1991), e principalmente do meio suplementado com os oligoelementos e vitaminas do meio OHM. Ao contrário, o meio f₂ tem 0,88 mM, o ALGAL e ALGAL+OHM têm 8 mM. A limitação de luz no crescimento de microalgas principalmente nas mangas de 85 L, mostrando a eficiência da iluminação nos

tubos de menor diâmetro (Otero *et al.*, 1997), e a suplementação de CO₂ no presente trabalho.

As primeiras renovações foram realizadas com uma taxa de 30% em todos as culturas, observando-se uma diminuição acentuada da densidade celular, que apresentou indícios de estar a sofrer foto-inibição pelo excesso de luz, pelo que se optou por diminuir a taxa de renovação de 30% para 25% em todos os grupos excepto no grupo ABONO (de 30% para 20%), diminuindo-se também a intensidade luminosa para duas lâmpadas fluorescentes, para que as culturas não entrassem em decréscimo. Efectuadas estas alterações as culturas estabilizaram perfeitamente.

Tal como noutras espécies de microalgas cultivadas em sistema semi-contínuo (Otero, 1994; Otero e Fábregas, 1997) com taxas de renovação de 25% atingiram-se valores de densidade celular mais baixos que na fase final do sistema descontínuo, sendo no entanto superiores (ALGAL+OHM: $32,4 \times 10^6$ células mL⁻¹) às densidades celulares máximas obtidas por outros autores em diferentes condições semelhantes: 20×10^6 células mL⁻¹ em sistema contínuo (Laing, 1991) e em sistema semi-contínuo em culturas de 1,5 L com meio ASW (Guedes *et al.* 2010).

Tanto em regime descontínuo como em semi-contínuo os melhores valores de densidade celular se obtiveram com o meio ALGAL suplementado com os oligoelementos do OHM. Os oligoelementos do meio OHM contêm os minerais Ca e Mg em maior quantidade e Se, Mo, Cr, que geralmente não se incluem na formulação dos meios para espécies marinhas por considerar-se que estão em suficientes concentrações na água do mar. Os resultados obtidos, que coincidem com os resultados obtidos para outras espécies marinhas como *Isochrysis galbana* (Seixas *et al.*, 2010) indicam que alguns oligonutrientes presentes na água do mar podem ser limitantes em culturas de maior densidade de certas espécies de microalgas, sendo imprescindível a melhoria das formulações actuais neste sentido.

Carvalho *et al.* (2006) mostrou a importância dos micronutrientes no crescimento e desenvolvimento de culturas descontínuas da microalga marinha *P. lutheri*; meios isentos de enxofre são incapazes de sustentar o crescimento celular, enquanto meios com ausência de cálcio, ferro ou manganésio mostram rendimentos mais baixos que meios com esses micronutrientes; já num meio sem boro, produzem-se mais células do que num meio com esse elemento. No presente trabalho, os menores crescimentos celulares foram observados no grupo ABONO, cujo meio era desprovido de muitos oligoelementos e vitaminas, confirmando o menor rendimento em meios sem esta suplementação. Os grupos ALGAL e ABONO+OLIGO que mostraram valores de crescimento semelhantes, com maior densidade de estabilização para o segundo, tinham diferentes concentrações no meio dos micronutrientes, com o meio do grupo ABONO+OLIGO a conter mais

enxofre e cálcio. Apesar do crescimento celular ser menor em meios contendo boro, e este estar presente no grupo ABONO+OLIGO, outros nutrientes como o enxofre e cálcio deveriam estar em quantidade suficiente para compensar o efeito negativo do boro.

O grupo ALGAL+OHM foi o que apresentou maior crescimento celular, sendo também o grupo cujo meio continha mais enxofre, mais cálcio e mais ferro.

Os pesos secos obtidos neste trabalho na fase de estabilização, entre 27 e 70 pg célula⁻¹, foram inferiores ou semelhantes aos referidos por Brown *et al.* (1991, 1993a), que aponta valores de 102,3 e 56,6 pg célula⁻¹ respectivamente, mas superiores ao obtido por Mike *et al.* (2004), 14,7 pg célula⁻¹. O peso da biomassa obtido neste trabalho foi 0,8 – 1,4 g L⁻¹ no final da fase de crescimento descontínuo e 0,2 – 0,8 g L⁻¹ na fase de estabilização do regime semi-contínuo, foram bastante superiores aos valores obtidos por Brown *et al.* (1993a) (120 – 214x10⁻⁴ pg mL⁻¹), sendo também mais elevados que os obtidos por Guedes (2010) (0,4 g L⁻¹).

Os grupos ALGAL e ABONO+OLIGO mostraram valores muito semelhantes ainda que no final do crescimento descontínuo houve um melhor crescimento do grupo ALGAL, que apresentou maior densidade celular e maior peso da biomassa, e menor peso celular, perante o grupo ABONO+OLIGO. O grupo ABONO mostrou sempre os valores mais baixos de densidade celular e peso da biomassa, apresentando no entanto os maiores pesos celulares; uma vez que a densidade celular era menor as células tinham mais espaço para crescer, dividindo-se também mais tarde, mostrando ser um meio pouco eficiente para o crescimento de *Pavlova lutheri* e o meio ALGAL+OHM o mais eficiente.

Carbono-Nitrogénio e teor Proteico

O teor proteico nas microalgas pode ser afectado por factores como o tempo de cultura, diminuindo ou aumentando nas fases de cultura mais tardias, dependendo das espécies, em regime descontínuo (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989); apresentando *P. lutheri* nesse trabalho valores entre 16 e 43% em teor proteico. No presente trabalho obtiveram-se valores de teor proteico entre os 27% e os 43%, tendo os grupos ALGAL e ABONO+OLIGO mostrado valores próximos. O grupo ABONO e ALGAL+OHM foram os grupos com menor teor proteico, no entanto, o grupo ALGAL+OHM apresentou valores próximos do grupo ALGAL.

Os valores de proteína total obtidos no presente trabalho, embora próximos dos obtidos por outros autores, mostraram-se relativamente superiores. Brown *et al.* (1991) obteve valores próximos de 30%, enquanto Carvalho *et al.* (2000) apresentou diferentes valores para o teor proteico de *P. lutheri* em resposta a diferentes meios nutritivos, variando entre 5 – 25% (% de peso seco livre de cinzas (AFDW)).

Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos só foi analisado nos grupos ALGAL, ABONO+OLIGO e ALGAL+OHM, uma vez que o grupo ABONO não estabilizou com as renovações diárias devido à diminuição contínua da sua densidade celular.

O ácido gordo eicosapentenóico (EPA, 20:5n3) foi o mais abundante em todas as culturas, aumentando do grupo de menor densidade celular, para o grupo de maior densidade celular, facto este que estará relacionado com a luz disponível para as células. A proporção de PUFAs, especialmente EPA, é significativamente mais elevada com menor intensidade luminosa, enquanto que alguns autores apontam que o teor de ácidos gordos saturados e DHA aumentam com a intensidade luminosa (Guihéneuf *et al.*, 2009). Maiores densidades celulares limitam a quantidade de luz que chega às células pelo que isso induz as células a produzir mais pigmentos fotossintéticos captadores de fotões, com consequentemente aumento do teor de AG. Podemos observar um aumento do teor de PUFAs, assim como do ácido gordo EPA, 22 – 26%, juntamente com um aumento da densidade dos respectivos grupos (20,9 – 32,4 x10⁶ células mL⁻¹). No teor do ácido gordo DHA, observamos o inverso, havendo um decréscimo do seu teor.

É sabido que o teor de ácidos gordos é também influenciado por outros factores, como o meio nutritivo (Carvalho *et al.*, 2000), que interfere no crescimento e densidade celular, levando às diferenças no teor de ácidos gordos nos diferentes grupos, de meios nutritivos diferentes, como explicado acima.

Vários factores podem ter contribuído para as diferenças na composição bioquímica da microalga marinha *P. lutheri* obtidas neste trabalho quando comparado com valores obtidos por outros autores: meio nutritivo, regime de produção, intensidade luminosa, ciclo circadiano, pH, salinidade,

Os valores obtidos para o teor em ácidos gordos saturados neste trabalho, entre 31 e 32%, foram obtidos também por Brown *et al.* (1993a), 31 – 32%. Tatsuzawa e Takizawa (1995) obtiveram dois valores distintos, um acima dos 35% e outro com 26%. Carvalho *et al.* (2000), obteve valores bem mais baixos, com valores entre os 18 e os 21%, tendo no entanto obtido um valor mais próximo de 28%, igualmente obtido por Guihéneuf *et al.* (2009), 24 – 29%, assim como Mike *et al.* (2004). O teor de ácidos gordos dos três grupos analisados apresentaram valores totais de PUFAs entre 44 e 52%, valores idênticos aos obtidos por Brown *et al.* (1993a) 43 – 44%, Tatsuzawa e Takizawa (1995) 50%, Carvalho *et al.* (2000) 45 – 49%, Mike *et al.* (2004) 53% e Guihéneuf *et al.* (2009) 47 – 55%. Alguns destes autores obtiveram valores de PUFAs inferiores aos obtidos neste trabalho, devido a diferentes factores como temperatura, regime de produção, meio nutritivo, luz, etc.: 37% e 40% (Brown *et al.*, 1993), 38% (Tatsuzawa e Takizawa, 1995) e 22% (Carvalho *et al.*, 2000). Em relação aos mono-insaturados os valores observados

neste trabalho (21 e os 23%) foram semelhantes aos descritos por outros autores (Brown *et al.*, 1993; Tatsuzawa e Takizawa, 1995; Carvalho *et al.*, 2000; Mike *et al.*, 2004; Guihéneuf, 2009).

4.2 Amêijoja japonesa

4.2.1 Produção de microalgas e dieta

Crescimento celular

A densidade de estabilização de algumas das microalgas em regime semi-contínuo não se mostrou muito estável, tal deveu-se ao facto das renovações não serem diárias, sendo realizadas a cada 48 ou 72 horas, consoante as mudas de água dos tanques de *R. philippinarum*.

As microalgas *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* e *Chaetoceros* sp., mostraram menor estabilidade e diminuição da densidade celular nos últimos dias de cultura; devido ao facto de por negligência não ter sido controlada nem acertada a salinidade da água dos balões de fundo raso, que no final da experiência se encontrava já em valores (40 ppt) fora do óptimo microalgas (32-35 ppt). Este efeito comprovou-se ao melhorar a cultura após acertar a salinidade dos mesmos.

A microalga *Isochrysis galbana* foi a que apresentou maiores valores de densidade celular (30×10^6 células mL^{-1}). Este valor foi superior aos obtidos por outros autores, em condições semelhantes, com o mesmo meio, mas com renovações diárias: 16×10^6 células mL^{-1} (Herrero *et al.*, 1991), 23×10^6 células mL^{-1} (Seixas *et al.*, 2008); em regime contínuo: 20×10^6 células mL^{-1} (Laing, 1991). Os valores foram no entanto inferiores aos obtidos por Fu *et al.* (2008), com valores de densidade celular de 35×10^6 células mL^{-1} , e semelhantes aos obtidos por Fidalgo *et al.* (1998) com 30×10^6 células mL^{-1} , ambos em regime descontínuo.

Os valores da densidade de *Pavlova lutheri* foram semelhantes aos obtidos no trabalho descrito anteriormente, cerca de 20×10^6 células mL^{-1} .

As densidades celulares máximas de *Chaetoceros* sp. obtidas neste trabalho, $12,6 \times 10^6$ células mL^{-1} , foram bastante superiores às densidades máximas obtidas por outros autores, em condições e regimes diferentes: 7×10^6 células mL^{-1} , em regime contínuo (Csordas e Wang, 2004) e em regime descontínuo, 8×10^6 células mL^{-1} (Sánchez-Saavedra e Voltolina, 2006). Em trabalhos anteriores, realizados na Universidade de Santiago de Compostela (dados não publicados), atingiram-se densidades máximas entre 10 - 12×10^6 células mL^{-1} para *Chaetoceros* sp em regime descontínuo.

Rhodomonas lens foi a microalga que apresentou menores variações na densidade celular, resistindo também à salinidade mais elevada. Geralmente com densidade celular

média de 6×10^6 células mL^{-1} atingiu o seu máximo com 7×10^6 células mL^{-1} . Estes valores são bastante superiores aos obtidos por Seixas *et al.* (2008; 2009), onde com o mesmo sistema de cultura, mas efectuando renovações diárias, obteve valores de $3,5 \times 10^6$ células mL^{-1} .

Dieta

As dietas ao longo do tempo de alimentação foram pouco variáveis na sua composição, excepto nos dias 10 e 12. No dia 10 não foi adicionada *Chaetoceros* às dietas uma vez que as densidades celulares desta microalga caíram, por problemas relacionados com a salinidade (apenas detectado no final da experiência). No dia 12, foi adicionado *Chaetoceros gracilis* proveniente de balões de fundo raso em regime descontínuo, com valores de densidade celular baixos ($4,5 \times 10^6$ células mL^{-1}), daí a sua proporção na dieta ser inferior aos dias anteriores (também por indisponibilidade de maior quantidade). No entanto, quanto ao peso seco adicionado, não existem diferenças significativas entre a duas dietas utilizadas.

Composição bioquímica

Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos da microalga *Isochrysis galbana* foi diferente dos obtidos por Seixas *et al.* (2008) em regime semi-contínuo com renovações diárias. Relativamente ao total de ácidos gordos saturados, os teores obtidos neste trabalho foram inferiores e os teores de mono-insaturados foram superiores, enquanto o teor de ácidos gordos PUFAs foi semelhante.

Pavlova lutheri apresentou teores de ácidos gordos saturados e mono-insaturados superiores e teores de PUFAs inferiores aos obtidos no trabalho realizado com *P. lutheri* descrito anteriormente, em meio ALGAL.

A produção de *Chaetoceros* sp. em regime semi-contínuo levou à produção de elevados teores de ácidos gordos saturados (52%), superiores aos obtidos por outros autores para a espécie *Chaetoceros muelleri* cujo máximo obtido foi 45%, por (Pernet *et al.*, 2003). Outros autores, para outras espécies de *Chaetoceros* obtiveram valores inferiores de ácidos gordos saturados, 34% (Renaud *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2006). O teor de ácidos gordos mono-insaturados foi inferior aos obtidos por outros autores, geralmente com valores de 35% (Renaud *et al.*, 2002; Pernet *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2006). Já o teor de PUFAs foi semelhante aos obtidos por Liang (2006) e Pernet (2003).

Para a *Rhodomonas lens* os teores de ácidos gordos saturados e mono-insaturados foram superiores e o teor de PUFAs foi inferior aos obtidos por Seixas *et al.* (2008).

Esta diferença quantitativa nos perfil de ácidos gordos das microalgas usadas neste trabalho, quando comparadas com o perfil de ácidos gordos das mesmas microalgas obtido por Seixas *et al.* (2008) e com o trabalho de *P. lutheri* descrito anteriormente, pode estar associado a diferenças no modo de produção, o que confirma que o sistema semi-contínuo com renovações diárias é melhor para melhoria da composição bioquímica das microalgas. Quando comparado com trabalhos de outros autores acima referidos, outros factores podem estar associados como luz (ciclo circadiano, intensidade), salinidade, meio nutritivo, etc.

Carbono:Nitrogénio e teor proteico

O teor proteico das microalgas produzidas em regime semi-contínuo nas instalações do I.Ga.F.A. foram todos mais baixos que os obtidos por outros autores:

- O teor proteico de *Isochrysis galbana* neste trabalho foi de 33%, mais baixo que o obtido por Seixas *et al.* (2008), usando o mesmo meio nutritivo, cujo teor proteico foi cerca de 42%.
- Para *P. lutheri* o teor proteico foi de 30%, inferior ao obtido no trabalho anteriormente descrito, cujo teor proteico, para meio ALGAL foi de 40%.
- *Chaetoceros* foi a microalga que apresentou menor teor proteico, 22%. Sánchez-Saavedra e Voltolina (2006), para essa microalga obtiveram valores entre os 32 e os 45%.
- *Rhodomonas lens* neste trabalho obteve valores de teor proteico de 54%, mais baixos que os obtidos por Seixas (2008), cujo teor proteico atingiu os 62%, confirmando também que uma melhoria nas condições do sistema de produção semi-contínuo permite melhorar o teor proteico da microalga.

4.2.2 Larvas *Ruditapes philippinarum*

Sobrevivência

Nos primeiros 6 dias verificaram-se diferenças representativas na sobrevivência das larvas dos dois grupos (CONTROL e RHODO), esta diferença pode estar associada à dieta, uma vez que todos os tanques tinham as mesmas condições de cultura. Já nos restantes dias a sobrevivência diminuiu bastante até ao dia 17 com valores semelhantes entre os dois grupos, havendo diferenças significativas nos valores calculados no dia 17 e 22. A diminuição brusca observada após o 6º dia pode ter sido influenciada por vários factores:

- O maneiio durante as mudas de água. Durante as mudas de água, por indisponibilidade de material as larvas por vezes foram mantidas tempo excessivo fora dos tanques que, embora submersas em água salgada, ficaram nos crivos. Nos crivos menores, apesar de em pouco número, foram sempre descartadas larvas vivas, as chamadas caudas, juntamente com larvas mortas, entrando na contagem das larvas mortas.
- O próprio processo e frequência de muda de água pode ter causado stress nas larvas aumentando a sua vulnerabilidade;
- Valores de salinidade relativamente elevados durante o período de cultura; apesar de serem animais tolerantes a variações de salinidade, esta esteve sempre acima dos 36 ppt;
- A água utilizada para a cultura das larvas apenas era filtrada, não sendo tratada com o U.V..

A sobrevivência obtida pelo grupo RHODO no 6º dia de vida das larvas (94%) foi superior ao valor mais alto de sobrevivência obtida por Yan (2006), 90%. O mesmo autor obteve valores de sobrevivência mais baixos, influenciados por factores como densidade e dieta, sendo alguns dos valores idênticos ao observado no grupo CONTROL (aproximadamente 80%), enquanto outros foram mais baixos (aproximadamente 60%).

Os valores de sobrevivência neste trabalho, após o 6º dia baixaram consideravelmente mais do que o obtido por outros autores, sendo que a sobrevivência das larvas ao dia 10 neste trabalho, semelhante nos dois grupos (55%), foi inferior à obtida por Yan (2006), com valores entre os 53 e os 72%.

Crescimento

Ao final de 48 horas de vida, as larvas D mediam aproximadamente 102 µm, valores semelhantes aos descritos por outros autores para a mesma espécie: Jones (1993), Helm (2004), Yan (2006), Álvarez e Camacho (2008) e Yan (2009).

O crescimento observado nos dois grupos foi semelhante, no entanto o tamanho das larvas do grupo RHODO foi sempre superior. Nos dias 8, 20 e 22 os tamanhos das larvas do grupo RHODO foram significativamente superiores, para $P < 0,05$. Uma vez que as condições de produção eram iguais entre os dois grupos, pode dizer-se que as diferenças no tamanho estão associadas às diferentes dietas de cada grupo.

Rhodomonas lens é uma microalga com elevado teor proteico e valores moderados dos AG EPA (8-10%) e DHA (7%) (Seixas *et al.*, 2008; 2009). Outros autores mostraram que elevados teores de EPA em microalgas podem ter efeitos negativos no crescimento de algumas espécies de bivalves (Tompson *et al.*, 1996). A dieta do grupo RHODO,

continha a mistura do grupo CONTROL sendo substituído 25% do seu peso por RHODO, baixando o teor do ácido gordo EPA e aumentando o teor proteico, podendo ser uma das razões que levou ao maior crescimento das larvas do grupo RHODO.

Os tamanhos obtidos pelas larvas do grupo RHODO neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por Lovatelli (1985) à mesma temperatura. No entanto, foram inferiores aos obtidos por outros autores (Lovatelli, 1985; Helm *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2010) cujas temperaturas de produção eram superiores. É sabido que a temperatura é dos principais factores que afectam o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das larvas em cultura, sendo maior o crescimento a temperaturas mais elevadas (Lovatelli, 1985; Helm, 2004). Geralmente, a 24 °C, consoante a densidade larvar, a relação de crescimento da concha da amêijoia japonesa é de 10 µm por dia, atingindo o estado de pedivelígera com 180 – 210 µm (Jones *et al.*, 1993). Neste trabalho a relação de crescimento foi inferior, uma vez que a temperatura era também inferior, aproximadamente 10 µm a cada dois dias. Apesar do crescimento lento as larvas do grupo RHODO atingiram o estado pedivelígera com tamanho médio de 219 µm. O crescimento lento das larvas de ambos os grupos possivelmente deveu-se às temperaturas de cultura (21,6 °C)

Composição bioquímica

Carbono-Nitrogénio

O valor da relação C:N mostrou valores semelhantes entre as larvas alimentadas com diferentes dietas ao 10^o dia de cultura (8^o dia de alimentação). A semelhança dos valores obtidos para esta relação pode estar associados ao facto de em 8 dias as dietas não influenciarem a composição corporal no que respeita a esta relação. A evolução da relação C:N desde as larvas D para as larvas com 10 dias de vida não foi também representativa (10 e 11, respectivamente).

O cálculo do teor proteico não foi possível uma vez que o peso das amostras recolhido não era suficiente para realizar correctamente as análises, tendo além disso sido influenciado pelo peso do sal retido nas amostras que não foram lavadas com água destilada, originando valores pouco fiáveis.

Ácidos gordos

A composição bioquímica dos AG das larvas D com 48 horas de vida e das larvas com 10 dias de vida de ambos os grupos (CONTROL e RHODO) apresentaram valores muito semelhantes no que respeita ao total de ácidos gordos saturados, mono-insaturados e PUFAs. O mesmo se verifica nos casos mais particulares dos ácidos gordos mais representativos, o ácido palmítico (16:0) e o ácido eicosapenténico (EPA; 20:5n3) cujos

valores se mantiveram ao longo dos 10 dias de vida, mesmo alimentados com dietas diferentes. Já o ácido gordo docosa-hexaenóico (DHA, 22:6n3) é o único cujo teor duplica da larva D com 48 horas de vida até à larva com 10 dias de vida, para ambos os grupos. Em oito dias de alimentação as diferenças quantitativas observadas na composição em ácidos gordos foram pouco representativas, tanto quando comparadas as larvas com 48 horas de vida com larvas com 10 dias de vida, tanto quando comparadas as larvas com 10 dias de vida alimentadas com diferentes dietas.

Ao fim de 22 dias de crescimento o AG mais representativo nas larvas pedivelígeras continua a ser o ácido palmítico com teor semelhante ao obtido nas larvas D de 48 horas e 10 dias de vida.

Quando comparada a composição em ácidos gordos das larvas dos grupos CONTROL e RHODO com 22 dias de vida, podemos observar algumas diferenças quantitativas no que respeita ao total de ácidos gordos de cadeia longa poliinsaturados (20 e 22C), em maior quantidade no grupo RHODO. É sabido que *Ruditapes philippinarum* é capaz de sintetizar estes ácidos gordos através de ácidos gordos de cadeia pequena (18C) presente na dieta (Laing *et al.*, 1990) presentes em grandes quantidades em *Rhodomonas lens*, justificando assim a maior percentagem de EPA, DHA e PUFAs nas larvas com 22 dias do grupo RHODO, comparativamente com as do grupo CONTROL.

Será importante realizar estudos com melhor seguimento da composição bioquímica das larvas, testando o efeito de diferentes percentagens de substituição na dieta “standard” com *R. lens*.

5. Conclusões

1. A suplementação do meio ALGAL com os micronutrientes e vitaminas do meio OHM permitiu duplicar a densidade celular de *Pavlova lutheri* em regime descontínuo e manter densidades de estabilização 55% mais altas em regime semi-contínuo, pelo que foi possível melhorar uma formulação de nutrientes para esta espécie.

2. Meios demasiado simples como o ABONO, à base de fertilizantes para agricultura, não mostraram ser suficientes para manter uma cultura de *Pavlova lutheri* em regime semi-contínuo.

3. A substituição de 25% da dieta “standard” da amêijoia japonesa com a microalga *Rhodomonas lens* originou um maior crescimento e sobrevivência final das larvas de *Ruditapes philippinarum*, pelo que se conclui que esta espécie pouco utilizada até agora na produção de moluscos pode ter elevado interesse. Serão necessários mais estudos sobre a utilização desta microalga para a produção de larvas de amêijoia japonesa e outros moluscos bivalves, afinando as técnicas de manejo dos cultivos larvários e utilizando microalgas produzidas em sistema semi-contínuo com renovação diária para garantir a composição óptima e estável do alimento.

6. Referências Bibliográficas

- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 232, 23-37.
- Albentosa, M., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., 1996. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113A, 2, 113-119.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., 2002. Wheatgerm flour in diets for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, spat. *Aquaculture*, 212, 335-345.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussates* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 154, 305-321.
- Becker, W., 2004. Microalgae for Aquaculture. The Nutricional value of Microalgae. In: Richmond, A. (Ed.). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. London: Blackwell Science, pp. 380-391.
- Ben-Amotz, A., Avron, M., 1983. Accumulation of methabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 95-119.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145, 79-99.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. and Leroi, J.M., 1993a. The gross and amino acid compositions of *batch* and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone TISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5: 285-296.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Barrett, S.M. and LeRoi, J.M., 1993b. The influence of inadiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone T-ISO). *J. Phycol.*, 29: 601-612.

- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.a., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.
- Caers, M., Coutteau, P., Lombeida, P., Sorgeloos, P., 1998. The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. *Aquaculture*, 162, 287-299.
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*, 170, 307-322.
- Carvalho, A.P., Malcata, F.X., 2000. Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*. *Cryptogam. Algol.*, 21, 59–71.
- Carvalho, A.P., Malcata, F.X., 2003. Kinetic modeling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: study of the combined influence of light and temperature. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1128–1135.
- Carvalho, A.P., Monteiro, C.M., Malcata, F.X., 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J. Appl. Phycol.*, 21, 543-552.
- Carvalho, A.P., Pontes, I., Gaspar, H., Malcata, F.X., 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 358-366.
- Coutteau, P., 1996. Micro-algae. In: Sorgeloos, P., Lavens, P. (Eds.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Fisheries Technical Paper No. 361. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 7-47.
- Csordas, A., Wang, J.K., 2004. An integrated photobioreactor and foam fractionation unit for the growth and harvest of *Chaetoceros* spp. in open systems. *Aquacult. Eng.*, 30, 15-30.
- Davis, H.C., Guillard, R.R., 1958. Relative value of ten genera of microorganisms as foods for oyster and clam larvae. *Fish Bull*, 58, 293-304.

- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J.M., Kraffe, E., Marty, Y., Samain, J., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 460-470.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 173, 163-179.
- Delgado, M., Pérez-Camacho, A., 2007. Influence of temperature on gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to ingested food and energy balance. *Aquaculture*, 264, 398-407.
- Duerr, E.O, Molnar, A., Sato, V., 1998. Cultures microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.*, 7, 65-70.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Garland, C.D., 1993. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. App. Phycol.*, 5, 71-83.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga M., 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in *batch* cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42, 207-215.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J., 1986. Biomass production and biochemical composition in mass culture of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke varying nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53, 101-113.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Cordero, B., Otero, A., 1996a. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in semi-continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 266-268.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E.D., Cordero, B., Patiño, M., 1996b. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*, 143, 197-204.

- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. Patiño, M., 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. Mar. Biotechnol., 3, 256-263.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Otero, A., 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. Changes under different irradiances in semicontinuous culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 31-35.
- FAO, 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, 196p.
- Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. Aquaculture, 228, 289-305.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture, 83, 17-37.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., 1998. Effect of Microalgal Diets and Commercial Whatgerm Flours on the Lipid Profile of *Ruditapes decussates* spat. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 119A, No.1, 369-377.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L.), fed with microalgal diets and cornstarch. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 124, 309-318.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., 2006. Lipid composition of *Ruditapes philipinarum* spat: Effect of ration and diet quality. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 144, 229-237.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C., 1998. Effects of nitrogen and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture, 166, 105-116.

- Flye-Saite-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Ford, S., Powell, E., Hofmann, E., Klinck, J., 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture*, 266, 130-143.
- Fu, W., Liu, Y., Zhang, M., Liu, C., Chen, Y., 2008. High cell density culture of marine microalga *Isochrysis galbana* Parke through stoichiometry (Abstract). *Journal of Biotechnology* 136, S573.
- Gnaiger, E., & Bitterlich, G., 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, 62, 89-98.
- Ginzburg, M., 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.*, 14, 91-183.
- Gosling, E., 2003. *Bivalve Molluscs – Biology, Ecology and Culture*, (Gosling, ed). Blackwell Publishing. Cornwall, United Kingdom.
- Gouletquer, P., 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Ruditapes philippinarum*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en] – acedido em Setembro 2010.
- Green, J.C., 1975. The fine-structure and taxonomy of the haptophycean flagellate *Pavlova lutheri* (Droop) comb. nov. (= *Monochrysis lutheri* Droop). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 55, 785-793.
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2010. Change in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 87, 791-801.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., Tremblin, G., 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 369, 136-143.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, 471. 177p.

- Herrero, Cid, A., Fábregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.*, 10, 99-110.
- ICSAH. 1988. International committee for standardization in haematology (ICSH): selected method for visual platelet counting. *Labmédica*, 5 (4), 25-36.
- INE, 2008. Estatística da Pesca 2007. Instituto Nacional de Estatística, I.P., Lisboa-Portugal, 97p.
- Jones, G.G., Sanford, C.L., Jones, B.L., 1993. Manila Clams: Hatchery and Nursery Methods. Innovative Aquaculture Products Ltd., B.C., Canadá. 70p.
- Jørgensen, C.B., 1996. Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 142, 287-302.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979. Relationships between the essential fatty acid requirement of aquatic animal and their capacity for bioconversion of linoleic acid to highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B, 295-298.
- Laing, I., 1991. Cultivation of marine, unicellular algae. *Lab. Leaflet. MAFF Direct. Fish. Res.*, Lowestoft, 67, 31pp.
- Laing, I., Child, A.R., Janke, A., 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 70, 1-12.
- Laing, I., Jones, E., 1988. A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae. *Aquacult. Eng.*, 7, 89-96.
- Langdon, C.J., Siegfried, C.A., 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture* 39, 135–153.
- Langdon, C.J., Waldock, J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 61, 431–448.

- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.
- Leonardos, N., Lucas, I.A.N., 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182, 301–315.
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P., 2006. Changes in growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition with culture age in *batch* cultures of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.*, 49, 165–173.
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P., 2006. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 82, 161-172.
- Liu, W., Pearce, C.M., Alabi, A.O., Gurney-Smith, H., 2009. Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, 293, 248-254.
- Lovatelli, A., 1985. Condition for the culture of clam larvae with particular reference to *Tapes semidecussatus* Reeve. MSc Thesis, Plymouth Polytechnic, U.K., 179p.
- Marin, M.G., Moschino, V., Depieri, M., Lucchetta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*, 219, 859-871.
- Maseda, A., 2002. La luz modifica la productividad, la composición y el proteoma de microalgas del género *Nannochloropsis*. PhD thesis. Universidade de Compostela, 2002, 326 p.
- Mike, L.M., Brick, V.M., Parrish, C.C., 2004. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture*, 234, 293-317.
- Müller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P., 2003. Uses of microalgae in aquaculture. In Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp. 252-299.

- Naas, K.E., Naess, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, 105, 252-299.
- Otero, A., 1994. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. PhD thesis. Universidad de Santiago de Compostela, 1994. 168 p.
- Otero, A., Fábregas, J., 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159, 111-123.
- Otero, A., García, D., Fábregas, J., 1997. Factors controlling eicosapentaenoic acid in semicontinuous cultures of marine microalgae. *J. App. Phycol.*, 9, 465-469.
- Otero, A., García, D., Morales, E., Arán, J., Fábregas, J., 1997. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnol. App. Biochem.* 26, 171-177.
- Otero, A., Patiño, M., Domínguez A., Fábregas, J., 2002. Tailoring the nutritional composition of microalgae for aquaculture proposes – the use of semicontinuous culture techniques. *Aquaculture Europe*, 33, 13-16.
- Papandroulakis, N., Divanach., Anastasiadis, P., Kentouri, M., 2002. The pseudo-green water technique for intensive rearing for sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquacult. Int.*, 9, 205-216.
- Pawiro, S., 2010. Bivalves: Global production and trade trends. In: Rees, G., Pond, K., Kay, D., Bartram, J., Domingo, J.S. (Eds) *Safe management of Shellfish and Harvest Waters*. World Health Organization (WHO). London, UK., 11-19pp.
- Pérez-Camacho, A., Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., 1998. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstarch) diets on growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussates* seed. *Aquaculture*, 160, 89-102.
- Pérez-Camacho, A., Alvarez, I.F., 2008. El Criadero de Moluscos Bivalvos. In: *Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Unidades Didácticas de Acuicultura: Moluscos Bivalvos*.

- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., Roussy, M., 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221, 393-406.
- Piña, P., Voltolina, D., Nieves, M., Robles, M., 2006. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquaculture*, 253, 523-530.
- Ponis, E., Parisi, G., Le Coz, J.R., Robert, R., Zittelli, G.C., Tredici, M.R., 2006a. Effect of the culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquac. Nutr.*, 12, 322–329.
- Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Le Coz, J.R., Mathieu, M., Robert, R., 2006b. Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture*, 254, 544–553.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., 2003a. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 221, 491–505.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., Tredici, M., 2003b. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquac. Int.*, 11, 69–79.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G., Olsen, Y., 1993. Nutritional effects of algal addition in first feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 118, 257-275.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture. Int.*, 2, 33-48.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155, 207-221.
- Renaud, S., Thinh, L., Lambrinidis, G., Parry, D., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195-214.

- Renaud, S., Thinh, L., Parry, D., 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, 147-159.
- Richmond, A., 2004. Biological Principles of Mass Cultivation. In: Richmond, A. (Ed.). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. London: Blackwell Science, 125-177pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D., 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacult. Eng.*, 35, 161-165.
- Sato, N. & Murata. 1988. Membrane lipids. *Methods Enzimol.* 167, 251-259.
- Schuller, M.J., 1998. Espécies cultivadas em Portugal: Ostra; Amêijoia. In: Henriques, M.A., *Manual de Aquacultura*. ICBAS. 59-75pp.
- Scott, J.M., 1980. Effect of growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 60, 681-702.
- Seixas, P., 2009. Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentados con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. PhD thesis. Universidade de Santiago de Compostela. 254p.
- Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, Martiña, F., Otero, A., 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp.. *J. Expm Mar. Biol. Ecol.* 381, 1-9.
- Seixas, P., Mayer, C., Nascimento, P., and A. Otero (2010). Differences in nutrient requirements in continuous cultures of marine microalgae commonly used in aquaculture. In: Pulz, O., Boback, A. and Hofmeister, D. (Eds.). 8th European Workshop Biotechnology of Microalgae. Nuthetal, Germany, 7-10 June 2010. pp. 47.
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L.M.P., Otero, A., 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283, 83-91.

- Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds) 1980. Algae Biomass. Production and use. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amesterdam. 852 pp.
- Spoloare, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101, 87-96.
- Støttrup, J.G., 2003. Production and Nutricional Value of Copepods. In: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Ltd., 145-195pp.
- Støttrup, J.G., Jensen, J., 1990. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. J. Exp. Mar. Exp. Biol. Ecol., 141, 169-182.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., 1995. Change in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. Phytochemistry, 40, 397-400.
- Taub, F.B., 1980. Use of continuous culture technique to control nutricional quality. In: Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier, Amesterdam, 707-721pp.
- Thomas. W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A., Eldridge. P., 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. Biomass 5, 181-209.
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J., 1994. Influence of irradiance on the nutritional value of two phytoplankton species fed to larval Japanese scallops (*Parinopectin yessoensis*). Mar. Biol., 119, 89-97.
- Tompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J., 1996, Nutricional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), Aquaculture, 143, 379-391.
- Uchida, M., Kanematsu, M., Miyoshi, T., 2010. Growth promotion of the juvenile clam, *Ruditapes philippinarum*, on sugars supplemented to the rearing water. Aquaculture, 302, 243-247.

- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, P.D., Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 29, 219–240.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live food organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34, 115-143.
- Walne, P.R., 1963. Observations on the food value of seven species of algae to the larvae of *Osretea edulis*. 1 Feeding experiments. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 43, 767-784.
- Walne, P.R., 1974. *Culture of Bivalve Molluscs: 50 Years' Experience at Conwy*. Fishing News Books, Oxford, 173p.
- Walne, P.R., 1966. Large scale culture of larvae *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest.*, II 25 (4), 1–52.
- Walne, P.R., 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fisheries Investigation*, vol. 26. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, United Kingdom, 162p.
- Wilkfors, G.H., 1986. Alternating growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59, 1-14.
- Wilkfors, G.H., Twarog, J.W.Jr., Ukeles, R., 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oyster *Cassostrea virginica*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 167, 251-263.
- Yan, X., Zhang, Y., Huo, Z., Yang, F., Zhang, G., 2009. Effects of starvation on larval growth, survival and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 29, 327-334.
- Yan. X., Zhang, G., Yang, F., 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253, 350-358.

Yang, F., Yao, T., Huo, Z., Zhang, Y., Yan, X., Zhang, G., 2010. Effects of starvation on growth, survival, and body biochemical composition among different sizes of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 30, 135-140.

Zar, J. H., 1999. *Biostatistical analysis*. 4th Ed., Prentice Hall, Inc. New Jersey. 660 pp.

Zhang, G., Yan, X., 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture*, 258, 452-461.