



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



ATIVIDADE 2. PRODUÇÃO E EXPLORAÇÃO

E.2.3 PROCEDIMENTOS E PROTOCOLOS DE CULTIVO À ESCALA PILOTO DE ESPÉCIES SELECIONADAS

ALGALUP - Alternativa integral para la explotación de
macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

0558_ALGALUP_6_E

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABELAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	6
2.1. CULTIVOS EM ANFACO-CECOPESCA.....	6
2.1.1. Cultura de <i>Codium</i> spp.....	6
2.1.2. Cultura de <i>Osmundea pinnatifida</i>	8
2.2. CULTIVOS NA FCUP/CIIMAR.....	9
2.2.1. Ensaio piloto preliminares com <i>C. tomentosum</i>.....	9
2.2.2. Ensaio de densidade com <i>C. tomentosum</i>.....	10
3. RESULTADOS.....	12
3.1. CULTURA EM ANFACO-CECOPESCA.....	12
3.2. CULTURA NA FCUP/CIIMAR.....	16
4. CONCLUSÕES	19
5. BIBLIOGRAFIA	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Material biológico de <i>C. tomentosum</i> utilizado na experiência. (A) Tanque 1; (B) Tanque 2 e 4; (C) Tanque 3; (D) Tanque 5.....	10
Figura 2- Variação do peso (g) do <i>Codium</i> spp., nas diferentes condições de iluminação (luz branca, branca e azul, branca e vermelha, e branca e verde) ao longo do período de experimentação.	12
Figura 3- Variação do peso (g) do <i>Codium</i> spp., em condições de maior luminosidade (4x maior do que no ensaio anterior). (A) foi aplicado arejamento; (B) sem arejamento.....	13
Figura 4- Variação do peso de <i>C. tomentosum</i> e/ou <i>C. vermilara</i> ao longo do período de experiência, com adição de 500 μM N e 50 μM P e em diferentes condições de iluminação: luz branca e vermelha; e luz branca e azul.....	13
Figura 5- Variação do peso de <i>C. tomentosum</i> e/ou <i>C. vermilara</i> ao longo do período de experiência, com adição de 500 μM N e 50 μM P e em diferentes condições de iluminação: luz branca; luz branca e vermelha; e luz branca e azul.	14
Figura 6- Variação do peso de <i>Codium</i> spp. ao longo do período de experiência, com adição de 250 μM N e 50 μM P e em diferentes condições de iluminação: (R100) 100% luz branca + 100% luz vermelha; e (R50) 100% luz branca e 50% luz vermelha.	15
Figura 7- Variação do peso fresco da <i>O. pinnatifida</i> em diferentes condições: (LL-500) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (HL-500) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (LL-200) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P; e (HL-200) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P de intensidade luminosa e concentração de nutrientes, respetivamente.	16
Figura 8- Taxa de crescimento acumulado da <i>O. pinnatifida</i> em diferentes condições: (LL-500) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (HL-500) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (LL-200) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P; e (HL-200) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P de intensidade luminosa e concentração de nutrientes, respetivamente.	16
Figura 9- Taxa de crescimento ($\% \text{ dia}^{-1}$) de <i>C. tomentosum</i> nos 5 tanques experimentais.	17
Figura 10- Produtividade ($\text{g m}^{-2} \text{ semana}^{-1}$) de <i>C. tomentosum</i> nos 5 tanques experimentais....	17
Figura 11- Boxplot da taxa de crescimento de <i>C. tomentosum</i> sob 3 densidades (15, 10 e 5 g/L).	18
Figura 12- Boxplot da produtividade de <i>C. tomentosum</i> sob 3 densidades (15, 10 e 5 g/L).....	18

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Informações básicas sobre os ensaios de cultura de *Codium* spp. realizados..... 6

Tabela 2- Condições de cultivo do ensaio de *C. tomentosum*. 9

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelos organismos marinhos como fontes potenciais e promissoras de recursos vivos tem aumentado nos últimos anos com o objetivo de promover hábitos de consumo mais sustentáveis. Embora as macroalgas sejam consumidas em muitos países, ainda são consideradas subexploradas como fonte de alimento (Valentão, 2010). As macroalgas são consideradas um alimento saudável devido à sua composição, com elevadas propriedades nutricionais, e múltiplos benefícios para a saúde. Entre eles, os mais notáveis são a regulação dos níveis de colesterol, da função intestinal, o aumento a imunidade e a melhoria das funções do sistema nervoso.

Uma espécie de grande interesse dentro deste grupo é o *Codium tomentosum*, com alto teor em ácidos gordos insaturados e vitaminas A, B1 e C, e considerado uma fonte de cálcio, magnésio e ferro. Encontra-se na zona intertidal, sujeita a ambientes de repetida imersão e emersão por ação das ondas. Como resultado, ficam expostos ao ar, sujeitos a ambientes flutuantes de temperatura, salinidade e oxigenação, incluindo limitação de nutrientes e stress osmótico (Valentão, 2010).

O grande interesse pelo *C. tomentosum* devido à sua qualidade nutricional torna-o um objeto de estudo com vista a promover a sua utilização na indústria alimentar e farmacêutica. Estando exposto a condições ambientais adversas, é necessário standardizar as condições de cultivo ideais e estudar os seus efeitos no desenvolvimento da espécie. Portanto, neste estudo vamos analisar a taxa de crescimento e a produtividade de *C. tomentosum* em diferentes condições de cultura à escala piloto.

Este relatório inclui o trabalho realizado no âmbito da Atividade 2, Tarefa 2.3, incluindo os entregáveis 2.3.1 e 2.3.2. Neste relatório descrevemos os ensaios de crescimento das espécies de macroalgas selecionadas realizados à escala piloto e os resultados obtidos, bem como um protocolo de cultivo e otimização das suas condições. Esses ensaios consistiram no cultivo de duas das espécies de interesse selecionadas no projeto. Na FCUP/CIIMAR foi utilizada a espécie *C. tomentosum*, tendo sido realizados ensaios preliminares em sistemas de cultivo, para testar diferentes densidades de cultivo, origem e forma de alimentação, a fim de verificar o efeito sobre a biomassa (crescimento e epífitas); e um ensaio mais estabelecido, no qual estudamos o efeito da densidade de cultura no crescimento e produtividade desta espécie. Na ANFACO-CECOPECA as espécies foram *Codium* spp. e *Osmundea pinnatifida*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CULTIVOS EM ANFACO-CECOPESCA

2.1.1. Cultura de *Codium* spp.

A **tabela 1** compila as informações básicas sobre os ensaios de cultura de *Codium* spp. realizados.

Tabela 1- Informações básicas sobre os ensaios de cultura de *Codium* spp. realizados.

Nº ensaio	Data	Espécie	Sistema de cultura	Iluminação	Nutrientes	Principais resultados
1	Maio-Julho 2020	<i>Codium</i> spp.	Caixas 50 l	LED branca (812 lux); branca + verde; branca +vermelha; branca + azul	1.000 μ M N: 100 μ M P	Deterioração rápida
2	Julho-Agosto 2020	<i>Codium</i> spp.	Caixas 50 l	LED branca 6500K, 3.200 lux	500 μ M N : 50 μ M P; 0,2 ml/l microelementos + vitaminas	Deterioração rápida
3	Setembro-Outubro 2020	<i>Codium tomentosum</i> / <i>Codium vermilara</i>	Caixas 50 l	LED branca 6500K + azul, 3.200 lux ; LED branca 6500K + vermelha, 3.200 lux	500 μ M N: 50 μ M P	Crescimento seguido de rápida deterioração
4	Setembro-Outubro 2020	<i>C. tomentosum</i> / <i>C. vermilara</i>	Caixas 50 l	LED branca 6500K	Sem nutrientes	Sem crescimento, deterioração
5	Novembro-Dezembro 2020	<i>C. tomentosum</i> / <i>C. vermilara</i>	Caixas 50 l	LED branca 6500K; LED branca 6500K + azul, 3.200 lux; LED branca 6500K + vermelha, 3.200 lux	500 μ M N: 50 μ M P	Crescimento sustentado (luz branca + vermelha)
6	Maio-Junho 2022	<i>Codium</i> spp.	Caixas 50 l	LED branca 6500K + vermelha, 2.600 lux; LED branca 6500K + vermelha, 2.300 lux	250 μ M N: 50 μ M P	Crescimento sustentado (luz branca + vermelha)

ENSAIO 1

Foi realizado em caixas de 50 l, que foram iluminadas a partir do topo (distância de aproximadamente 30 cm até a superfície da água). Foram utilizadas as seguintes qualidades de iluminação: luz branca, 812 lux; luz vermelha, 93 lux; luz verde, 150 lux; luz azul, 44 lux nas seguintes combinações: branco, branca+vermelha, branca+verde e branca+azul. O fotoperíodo era de 14h de luz: 10h de escuro. A água da cultura foi suplementada com N na forma de NaNO_3 e P na forma de NaH_2PO_4 nas concentrações 1.000 μ M N e 100 μ M P. A temperatura permaneceu em valores de 19-20°C. Um leve arejamento foi aplicado nas culturas. Apenas uma réplica por condição foi utilizada. Semanalmente, as algas foram removidas das caixas, drenadas e pesadas. A água foi mudada e novos nutrientes foram adicionados.

ENSAIO 2

Foi realizado em caixas de 50 l. Para evitar a limitação pela luz, o sistema de iluminação foi substituído por um mais potente, equipado com 3.200 lux de luz branca + LEDs RGB, com a possibilidade de fazer diferentes combinações de cores e programação de iluminação. Foram utilizadas 3 réplicas, ou seja, 3 caixas, iluminadas com luz branca em fotoperíodo de 14h de luz: 10h de escuro. A concentração de nutrientes no meio foi de 500 μM N e 50 μM P e 0,2 ml/l de Goldmedium B. Foram realizados dois ensaios: (1) foi aplicado arejamento leve nas caixas; (2) nenhum arejamento foi aplicado. Semanalmente, as algas foram removidas das caixas, drenadas e pesadas. A água foi mudada e novos nutrientes foram adicionados apenas no primeiro ensaio.

ENSAIO 3

O desenho do Ensaio 5 foi semelhante ao do Ensaio 3, com três diferenças: a iluminação branca foi suplementada com luz azul ou vermelha, o uso da Mistura de Micronutrientes Goldmedium B foi eliminado e o uso de *C. fragile* foi descartado, utilizando *C. tomentosum* ou uma mistura de *C. tomentosum* e *C. vermilara* (a identificação e diferenciação de ambas as espécies não foi realizada).

ENSAIO 4

O objetivo e o desenho do Ensaio 6 foram totalmente diferentes do resto dos experimentos sobre o cultivo de *Codium* spp. Hwang et al. (2008) realizaram o cultivo de *C. fragile* a partir de fragmentos de haste fixados em cordas, que se desenvolvem para regenerar novas plantas. Tentamos aplicar a metodologia deste trabalho ao cultivo de *C. tomentosum* ou *C. vermilara*.

ENSAIO 5

Foi realizado em caixas de 50 l. Foram utilizadas 3 condições de iluminação: luz do dia branca 3.200 lux, e a mesma luz branca suplementada com luz azul ou vermelha. O fotoperíodo foi o mesmo dos casos anteriores: 14h de luz e 10h de escuro. A concentração de nutrientes foi de 500 μM N e 50 μM P. Neste caso, a água não era completamente renovada a cada semana, mas a cada 3 dias, 30% do volume era removido, que foi substituído por água fresca, e os nutrientes foram repostos em proporção ao volume renovado. Foi utilizada uma quantidade inicial de *C. tomentosum*/*C. vermilara* de cerca de 150 g por caixa. Cada condição de iluminação foi testada em triplicado.

ENSAIO 6

Foi realizado em caixas de 50 l, que foram iluminadas a partir do topo (distância de aproximadamente 30 cm até a superfície da água). Foram utilizadas as seguintes qualidades de

iluminação: luz branca 6500K + luz vermelha, 2600 lux e luz branca 6500K + luz vermelha, 2300 lux, nas seguintes combinações: primeiro, usando luz 100% branca com luz 100% vermelha (R100) e, na segunda, luz 100% branca com luz vermelha de 50% (R50). O fotoperíodo era de 14h de luz: 10h de escuridão. A água da cultura foi suplementada com N na forma de NaNO_3 e P na forma de NaH_2PO_4 nas concentrações 250 μM N e 50 μM P. A temperatura permaneceu em valores próximos a 18 °C. Arejamento moderado foi aplicado nas culturas. Foram utilizadas três réplicas por condição. Semanalmente, as algas foram removidas das caixas, drenadas e pesadas. A água foi mudada e novos nutrientes foram adicionados a cada 3 dias.

2.1.2. Cultura de *Osmundea pinnatifida*

ENSAIO 1

Os primeiros ensaios de cultura da *O. pinnatifida* foram realizados em janeiro e fevereiro de 2020, em balões de 1 l e utilizando as concentrações de nutrientes que haviam sido utilizadas nos primeiros testes de cultura de *Chondrus crispus* (projeto GAIN): 1.000 ou 2.000 μM NaNO_3 , 100 ou 200 μM NaH_2PO_4 e 0,5 ml/l Goldmedium B.

ENSAIO 2

O segundo experimento foi realizado em maio de 2020, em caixas de 50 l e com o primeiro sistema de iluminação que foi instalado (ver *Codium* spp. Ensaio 1), utilizando luz branca, branca + vermelha, branca + azul ou branca + verde.

ENSAIO 3

O terceiro ensaio foi realizado de janeiro a março de 2021 em balões de 1 l. *O. pinnatifida* é uma espécie que na Galícia aparece nos meses de inverno, de novembro a dezembro, e começa a desaparecer em abril. Está localizado no intertidal, em áreas sombreadas das rochas. Por essa razão, foi colocada a hipótese de que um fator importante no sucesso do cultivo desta espécie seria proporcionar a intensidade correta da luz, como no caso do *Codium* spp. A temperatura da água também pode ser um fator a ser levado em conta, mas neste experimento não foi controlada, e as culturas foram mantidas à temperatura de 20-21°C na câmara de cultura.

Foi realizado um ensaio multifatorial, onde foram utilizadas duas intensidades de luz: (HL) 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e (LL) 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e duas concentrações de nutrientes: (500) 500 e 50 μM N e P, e (200) 200 e 20 μM N e P, respetivamente. Assim, foram testadas 4 condições experimentais, denominadas HL-200, HL-500, LL-200 e LL-500, em triplicado.

2.2. CULTIVOS NA FCUP/CIIMAR

2.2.1. Ensaio piloto preliminares com *C. tomentosum*

O desenvolvimento de *C. tomentosum* nas culturas à escala piloto foi estudado a partir do estudo da taxa de crescimento diária e da produtividade em cinco tanques com diferentes condições de densidade e tempo de cultivo. Foram utilizados 5 tanques circulares de cultivo com 100L de capacidade, com arejamento contínuo, iluminação de 200-500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e adição constante de nutrientes, dependendo da densidade da cultura, mantendo-se assim o cultivo com duração de 6 meses (**Tabela 2**).

Tabela 2- Condições de cultivo do ensaio de *C. tomentosum*.

Número do tanque	Filamentos	Densidade (g/l)	Origem	Iluminação ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
1	Curto	10	Aguçadora	260
2	Indivíduos inteiros	24,6	Aguçadora	510
3	Curto	5	Aguçadora	330
4	Indivíduos inteiros	15	Viana de Castelo	480
5	Curto	5	Aguçadora	200

O procedimento prévio ao cultivo consistiu em campanhas de amostragem na praia de Aguçadoura (41°25'50" N, 8°46'37" W) e Viana de Castelo (41° 69' 46" N, -8° 83' 16"W), no norte de Portugal, onde foi recolhido o material biológico a ser utilizado. No laboratório, o *C. tomentosum* foi tratado, através de lavagem, remoção de epífitas e corte de partes afetadas. No caso dos tanques 1, 3 e 5, o material utilizado foram filamentos de 10-12 cm, enquanto no caso dos tanques 2 e 4 os indivíduos foram cultivados inteiros. A alimentação foi estabelecida de acordo com a densidade da cultura utilizando o meio Walne (Walne's medium for algal cultures: Culture Collection of Algae and Protozoa). As quantidades foram de concentração de 1,18 moles/litro de NaNO_3 , 3 vezes por semana. O material utilizado neste ensaio preliminar apresentava, assim, diferenças morfológicas no início da experiência (**Figura 1**).

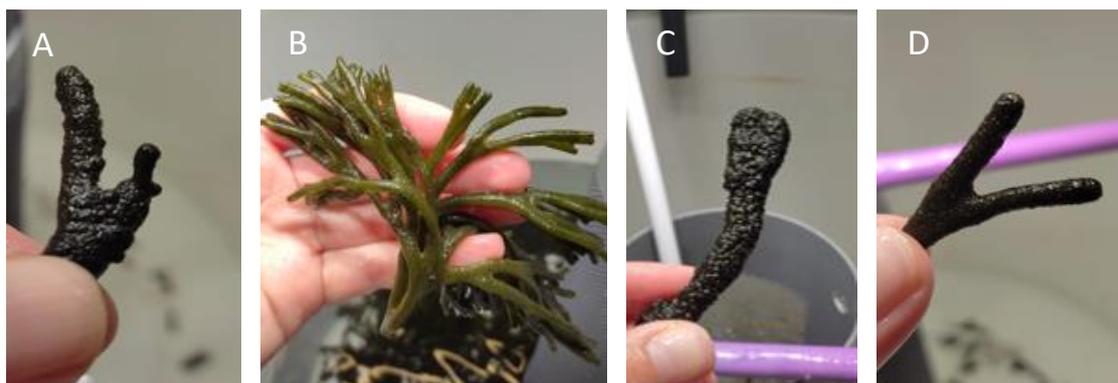


Figura 1- Material biológico de *C. tomentosum* utilizado na experiência. (A) Tanque 1; (B) Tanque 2 e 4; (C) Tanque 3; (D) Tanque 5.

No que diz respeito ao tratamento de dados, estudou-se o desenvolvimento da cultura com base na taxa de crescimento e produtividade utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Taxa de crescimento específica (\% dia}^{-1}\text{)} = 100 \times [\ln(\text{biomassa final}) - \ln(\text{biomassa inicial})] / \text{tempo (dias)}$$

$$\text{Produtividade (peso fresco m}^{-2}\text{ week}^{-1}\text{)} = (\text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}) / \text{tempo (dias)} \times 7 / A \text{ (área tanque, m}^2\text{)}$$

Foi ainda realizado um tratamento estatístico para ver o efeito das condições de cultivo no crescimento e produtividade. A análise de variância (ANOVA) foi realizada nos resultados das culturas dos tanques 2, 3, 4 e 5. Os fatores tidos em consideração foram: densidade (D_a), iluminação (I_b) e filamentos (Fl_c), todos fixos e ortogonais, onde a densidade tinha três níveis (24.5, 15 e 5), a iluminação dois níveis (alta= 810 e 680 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e baixa= 330 e 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e o fator comprimento de filamento dois níveis (longo; curto). O modelo linear fundamentou-se num modelo linear simples sem interação de fatores:

$$X_1 = D_a + I_b + Fl_c$$

Os fatores foram tratados individualmente devido à assimetria dos dados na interação, através do programa R.project.

2.2.2. Ensaio de densidade com *C. tomentosum*

O material biológico de *Codium tomentosum* utilizado neste ensaio foi recolhido em março das seguintes margens rochosas: Aguçadoura (41° 25' 50" N 8° 46' 37" O) e Viana do Castelo (41°41'53,79"N 8°51'19,57"O). Após a recolha, as algas marinhas foram transportadas para o laboratório em caixas térmicas e limpas para remover invertebrados e epífitas. Após a limpeza,

as algas foram mantidas num tanque de 100L para aclimação.

Os indivíduos foram colocados em tanques de 100L com arejamento, com três densidades diferentes (5, 10 e 15 g/L) distribuídas em seis tanques. A temperatura da água foi mantida constante, a 16°C. Os tanques estavam numa sala climatizada, com fotoperíodo de 12:12h (luz:escuro) e iluminação de $\approx 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A água era trocada uma vez por semana e os nutrientes eram adicionados três vezes por semana (concentração final de nutrientes no tanque: 0,05 mg/L NaNO_3 e 0,01 mg/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A temperatura da água, pH, salinidade e concentrações de oxigênio dissolvidos foram medidas uma vez por semana usando o medidor portátil Hach HQ40D. O ensaio teve duração de 4 semanas.

No final de cada semana, a biomassa das algas marinhas foi pesada para determinar seu desempenho de crescimento. A taxa de crescimento específica (SGR) e a produtividade (P) das algas marinhas foram determinadas e calculadas utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Taxa de crescimento específica (\% dia}^{-1}\text{)} = 100 \times [\ln(\text{biomassa final}) - \ln(\text{biomassa inicial})] / \text{tempo (dias)}$$

$$\text{Produtividade (peso fresco m}^{-2} \text{ week}^{-1}\text{)} = (\text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}) / \text{tempo (dias)} \times 7 / A \text{ (área tanque, m}^2\text{)}$$

Os valores médios de RGR e P foram calculados para cada período experimental (4 semanas) e utilizados para análise estatística. Diferenças significativas na taxa de crescimento específica e no rendimento de *C. tomentosum* foram analisadas utilizando o programa IBM SPSS Statistics 28.0.1.

3. RESULTADOS

3.1. CULTURA EM ANFACO-CECOPESCA

3.1.1. Cultura de *Codium* spp.

ENSAIO 1

Ao longo dos 42 dias em que o ensaio durou, observou-se uma perda de peso muito abrupta e quase contínua, com exceção da primeira semana em que os valores iniciais foram mantidos (**Figura 2**). Essa perda de peso deveu-se à fragmentação e deterioração das algas. Não houve diferenças entre as quatro condições de iluminação. A nossa hipótese é que a intensidade luminosa era muito baixa para permitir o crescimento de *Codium* spp. nessas condições de crescimento.

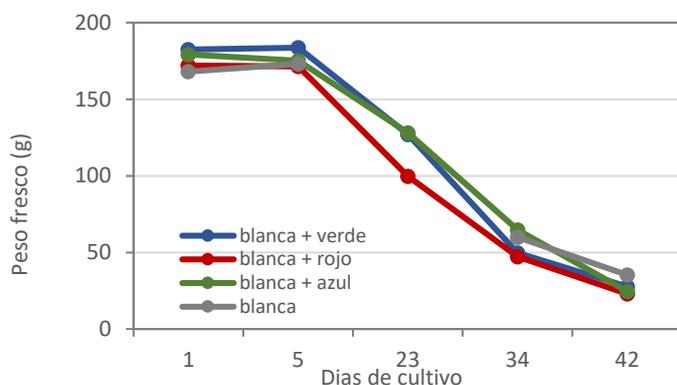


Figura 2- Variação do peso (g) do *Codium* spp., nas diferentes condições de iluminação (luz branca, branca e azul, branca e vermelha, e branca e verde) ao longo do período de experimentação.

ENSAIO 2

Na primeira experiência, observou-se uma perda rápida de peso desde o primeiro dia, embora no início as algas mantivessem uma boa aparência (**Figura 3A**). Na segunda experiência, a deterioração foi evidente desde o primeiro dia, de modo que o experimento foi interrompido ao dia 15, embora a perda de peso não tenha sido tão acentuada neste caso (**Figura 3B**). Os resultados sugerem que, apesar da disponibilidade de luz pelo menos 4 vezes maior do que no Ensaio 1, as culturas experimentaram algum fator limitante que causou seu rápido colapso.

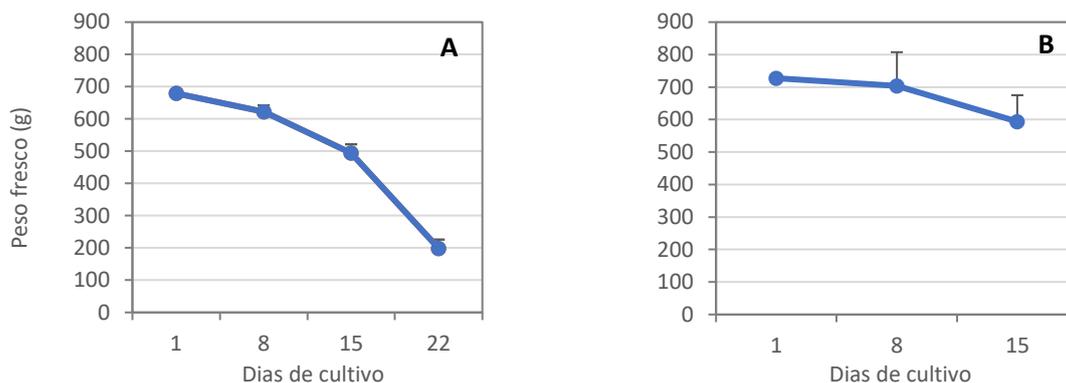


Figura 3- Variação do peso (g) do *Codium* spp., em condições de maior luminosidade (4x maior do que no ensaio anterior). (A) foi aplicado arejamento; (B) sem arejamento.

ENSAIO 3

Embora durante as duas primeiras semanas de cultivo tenha havido um pequeno aumento de peso, nas semanas seguintes houve uma deterioração significativa das algas, por isso o experimento foi interrompido (**Figura 4**). A otimização da absorção de nutrientes e a remoção do *C. fragile* devido à sua rápida fragmentação não melhoraram os resultados do Ensaio 3. A hipótese é que a densidade de biomassa era muito alta para a luz disponível neste sistema de cultura.

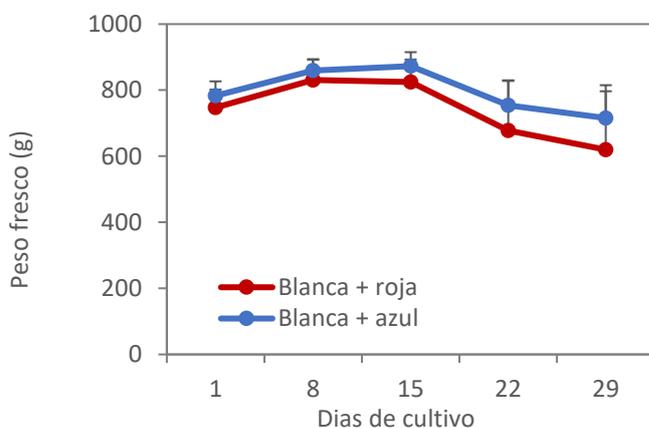


Figura 4- Variação do peso de *C. tomentosum* e/ou *C. vermilara* ao longo do período de experiência, com adição de 500 μ M N e 50 μ M P e em diferentes condições de iluminação: luz branca e vermelha; e luz branca e azul.

ENSAIO 4

Os fragmentos de algas permaneceram verdes e aparentemente em boas condições por cerca de 3 semanas, mas eventualmente se deterioraram, então o ensaio foi interrompido.

ENSAIO 5

Após 7 semanas de cultivo, foi observado um crescimento sustentado, mas reduzido, apenas em culturas iluminadas com luz branca + vermelha (**Figura 5**). Nas demais culturas, o crescimento foi registado durante as primeiras 4 semanas, e depois houve perda de peso e fragmentação, especialmente naquelas iluminadas com luz branca + azul. Os resultados obtidos superam os de experimentos anteriores realizados neste sistema de cultivo, mas novamente sugerem que o principal ponto crítico para alcançar o cultivo de *Codium* spp. está no fornecimento de iluminação correta, uma vez que as concentrações ou gamas de concentração de nutrientes apropriadas foram identificadas. O desenho do sistema de cultivo determina a intensidade da luz, a incidência de luz e o arranjo de algas no tanque de cultura, e todos esses fatores devem ser levados em conta ao ajustar as condições de iluminação e a densidade da cultura para alcançar o crescimento adequado.

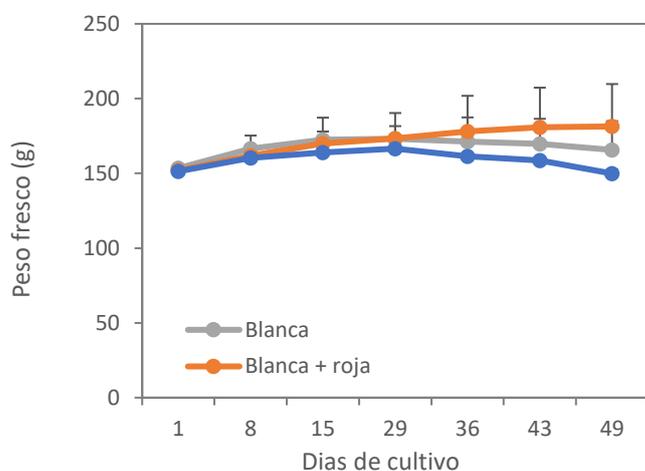


Figura 5- Variação do peso de *C. tomentosum* e/ou *C. vermilara* ao longo do período de experiência, com adição de 500 μM N e 50 μM P e em diferentes condições de iluminação: luz branca; luz branca e vermelha; e luz branca e azul.

ENSAIO 6

Ao longo dos 27 dias do ensaio, observou-se aumento semanal de peso em ambas as condições de luz (**Figura 6**). Com luz 100% branca com luz vermelha 100% aumentou $20,22 \pm 0,13$ g/semana, enquanto com luz 100% branca com 50% de luz vermelha o aumento foi de $20,08 \pm 0,14$ g/ semana. Esse aumento foi um pouco maior usando 6500K de luz branca + luz vermelha, 2600 lux, ambos em 100%.

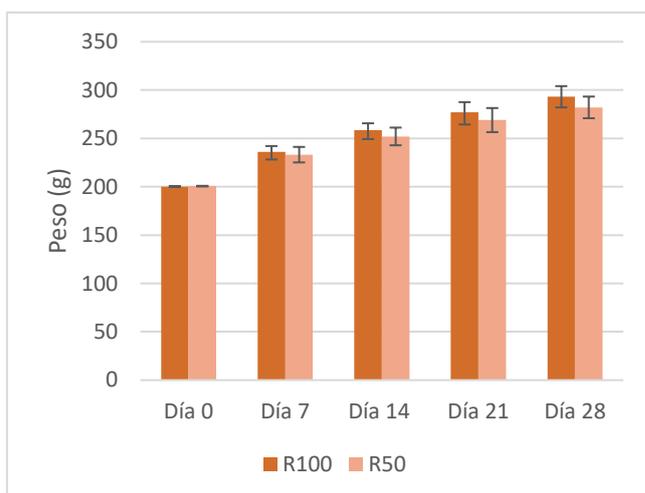


Figura 6- Variação do peso de *Codium* spp. ao longo do período de experiência, com adição de 250 μ M N e 50 μ M P e em diferentes condições de iluminação: (R100) 100% luz branca + 100% luz vermelha; e (R50) 100% luz branca e 50% luz vermelha.

3.1.2. Cultura de *Osmundea pinnatifida*

ENSAIO 1

Nesses testes houve uma rápida deterioração das algas, com perda de cor e fragmentação da haste.

ENSAIO 2

Novamente, a deterioração e a perda de peso foram contínuas desde o início do ensaio.

ENSAIO 3

Em todas as condições experimentais, observou-se uma fase inicial de crescimento, mais ou menos longa, na qual foram obtidas taxas de crescimento entre 12% e 35% (**Figura 7 e 8**). Os maiores valores de crescimento foram obtidos em LL-200 e HL-200, e a fase de crescimento mais longa foi obtida nesta última condição; as culturas LL-200 começaram a perder peso a partir do dia 22.

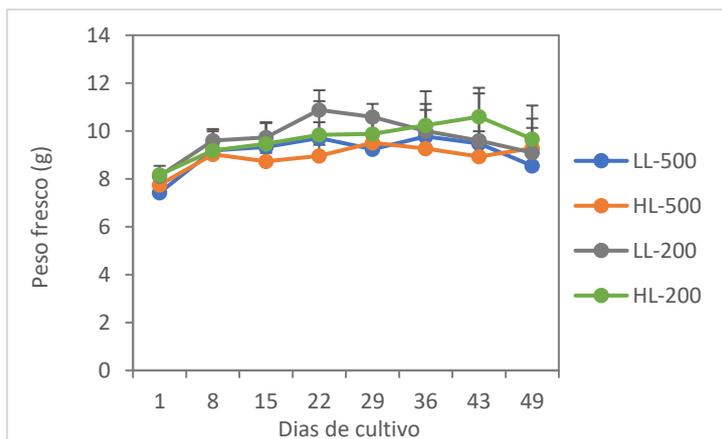


Figura 7- Variação do peso fresco da *O. pinnatifida* em diferentes condições: (LL-500) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (HL-500) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (LL-200) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P; e (HL-200) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P de intensidade luminosa e concentração de nutrientes, respetivamente.

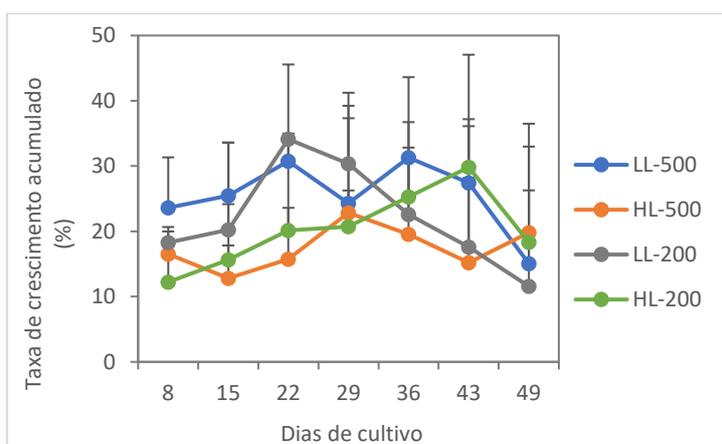


Figura 8- Taxa de crescimento acumulado da *O. pinnatifida* em diferentes condições: (LL-500) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (HL-500) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 μM N e P; (LL-200) com 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P; e (HL-200) com 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 200 μM N e P de intensidade luminosa e concentração de nutrientes, respetivamente.

3.2. CULTURA NA FCUP/CIIMAR

3.2.1. Ensaio piloto preliminar com *C. tomentosum*

Os resultados de crescimento e produtividade variaram entre tanques, em resposta a diferentes densidades de cultivo e ao modo de fragmentação da biomassa inicial.

O tanque 3 apresentou a maior taxa de crescimento (**Figura 9**), cujo material tinha 4 meses de cultivo prévio, densidade de 5g/L e filamento curto. Em contraste, os indivíduos completos dos tanques 2 e 4, apresentaram apenas um crescimento diário máximo de cerca de 2 % dia⁻¹, sugerindo que o cultivo em pequenos filamentos leva a uma maior rapidez no desenvolvimento do *C. tomentosum*. Por outro lado, o tanque 1 e 4 apresentaram taxas médias de crescimento muito semelhantes (cerca de 0,7% dia⁻¹).

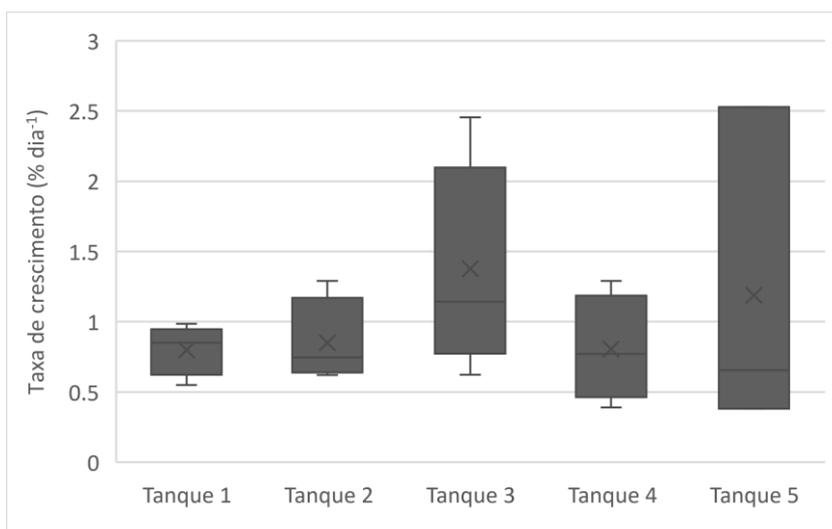


Figura 9- Taxa de crescimento (% dia⁻¹) de *C. tomentosum* nos 5 tanques experimentais.

Em relação à produtividade (**Figura 10**), as culturas dos tanques 2 e 4, onde os indivíduos estavam inteiros, destacam-se das restantes, com uma biomassa por tanque e forma de alimentação semelhante (**Tabela 2**). Estes resultados indicam que uma maior densidade de cultivo pode levar a um menor crescimento diário, mas maior produtividade do que outras formas de cultivo. Nos tanques 2 e 4 os valores são de $120,5 \pm 47,6$ (g m⁻² semana⁻¹) e $91,0 \pm 45,4$ (g m⁻² semana⁻¹).

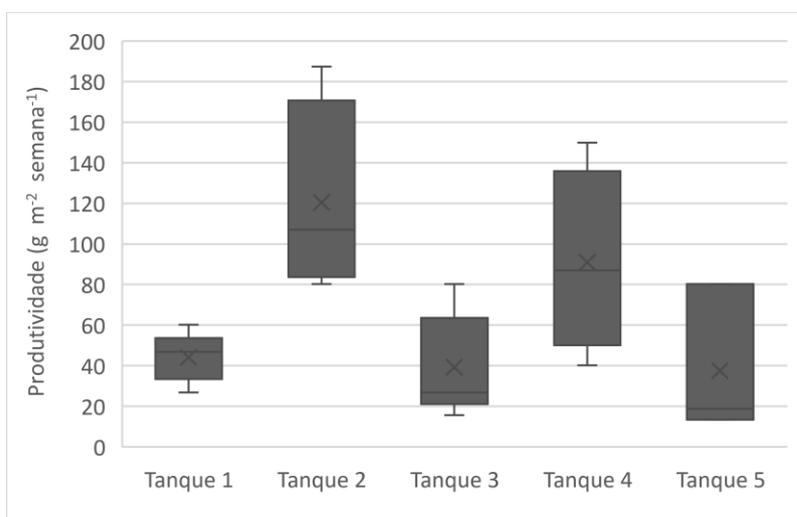


Figura 10- Produtividade (g m⁻² semana⁻¹) de *C. tomentosum* nos 5 tanques experimentais.

A análise estatística revelou diferenças significativas na produtividade relativas aos fatores de iluminação e comprimento do filamento. A iluminação mais elevada juntamente com filamentos inteiros mostrou uma produtividade média de $105,7 \pm 45,9$ (g m⁻² semana⁻¹), enquanto a de iluminação mais baixa e filamentos curtos foi de $40,7 \pm 22,5$ (g m⁻² semana⁻¹). A produtividade, portanto, foi beneficiada nas culturas com maior iluminação (510 e 480 μmol m⁻² s⁻¹), com indivíduos inteiros e altas densidades (24,6 g/litro).

3.2.2. Teste de densidade em *Codium tomentosum*

A Figura 11 e a Figura 12 mostram o desempenho de crescimento de *C. tomentosum* durante todo o período experimental. *C. tomentosum* foi capaz de crescer durante todo o curso do ensaio e sob todas as densidades testadas (**Figura 11**). A menor taxa de crescimento específico ($0,3 \pm 0,2\% \text{ dia}^{-1}$) foi observada na maior densidade (15 g/L), e o maior crescimento foi observado ($0,6490 \pm 0,3469 \% \text{ dia}^{-1}$) na menor densidade (5 g/L). A menor densidade (5 g/L) apresentou uma taxa de crescimento específica significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparada com a maior densidade (15 g/L).

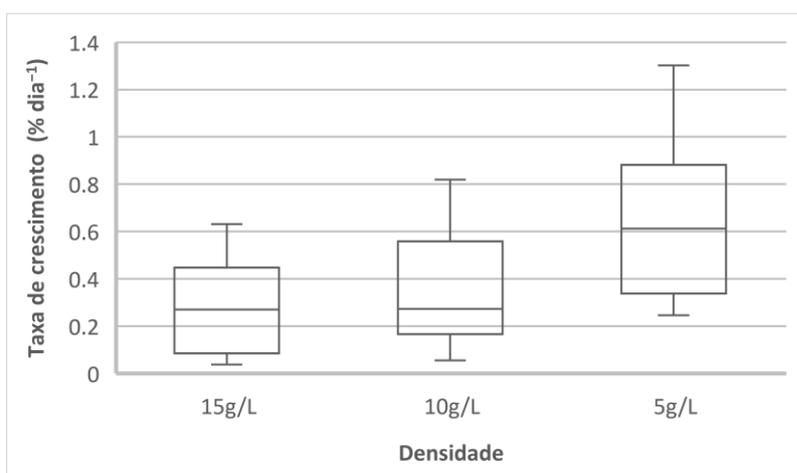


Figura 11- Boxplot da taxa de crescimento de *C. tomentosum* sob 3 densidades (15, 10 e 5 g/L).

A produtividade também foi significativamente influenciada pela densidade (**Figura 12**). Em contraste com a taxa de crescimento específica, a produtividade na densidade de 5 g/L foi a menor ($15,7 \pm 8,6 \text{ g de peso fresco m}^{-2} \text{ semana}^{-1}$) em comparação com outras densidades, e não foram observadas diferenças significativas entre as densidades. O maior e menor valor de produtividade foi observado nas densidades de 15 g/L ($45,6 \text{ g de peso fresco m}^{-2} \text{ semana}^{-1}$) e 10 g/L ($2,6 \text{ g de peso fresco m}^{-2} \text{ semana}^{-1}$), respetivamente.

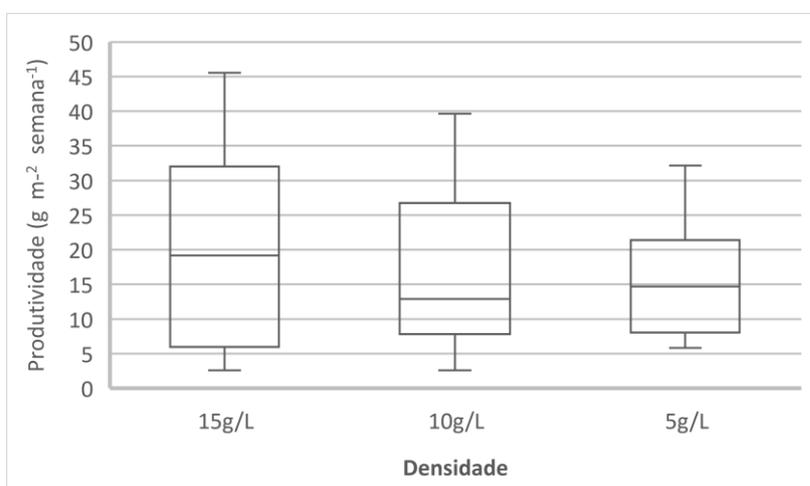


Figura 12- Boxplot da produtividade de *C. tomentosum* sob 3 densidades (15, 10 e 5 g/L).

4. CONCLUSÕES

Foram observadas diferenças em relação ao crescimento e produtividade de *C. tomentosum* em cultivo. Os ensaios preliminares mostraram que em condições de baixa densidade (5 g/L), filamentos curtos e intensidades luminosas à volta de 200-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi observado um crescimento mais eficiente do que em condições de maior densidade e intensidade luminosa superior. Contudo, em termos de produtividade o oposto foi observado, as culturas mais produtivas foram obtidas sob densidades de 15-30 g/L, numa morfologia em forma de aglomerado. Com base nestes resultados e nos resultados de ensaios de otimização à escala laboratorial (ver Entregável 2.2), foi realizado um ensaio à escala piloto em que testamos 3 densidades de cultivo (5, 10 e 15 g/L), mantendo a temperatura a 16°C, intensidade luminosa a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12h. Os resultados deste ensaio confirmaram que o crescimento é significativamente maior para densidades mais baixas (5 g/L) e menor para densidade mais elevadas (15 g/L) sendo o contrário verificado para a produtividade, embora sem significância estatística. Assim, os resultados sugerem que a densidade de 10 g/L será a mais indicada para o cultivo desta espécie à escala piloto.

5. BIBLIOGRAFIA

Hwang, E.K., Baek, J.M. & Park, C.S. Cultivation of the green alga, *Codium fragile* (Suringar) Hariot, by artificial seed production in Korea. *J Appl Phycol* 20, 469–475 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9265-5>

Franco João N, Tuya, F., Bertocci, I., Rodríguez Laura, Martínez Brezo, Sousa-Pinto, I., & Arenas, F. (2018). The 'golden kelp' *Laminaria ochroleuca* under global change: integrating multiple eco-physiological responses with species distribution models. *Journal of Ecology*, 106(1), 47–58. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12810>

Lara-Domínguez A (2005). Pastos marinos. En: Moreno-Casasola P, E Peresbarbosa-Rojas & AC Travieso-Bello (eds). Manejo costero integral: el enfoque municipal, pp. 229-240. Instituto de Ecología / Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Xalapa.

Terrados J & J Borum (2004). Why are seagrasses important? Goods and services provided by seagrass meadows. In: Borum J, CM Duarte, D Krause-Jensen & T Greve (eds). *European seagrasses: An introduction to monitoring and management*, pp. 8-10. The M&MS Project, Copenhagen

P. Valentão, P. Trindade, D. Gomes, P.G. de Pinho, T.Mouga, P.B. Andrade (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 119 (4).