

Universidade dos Açores
Departamento de Biologia



Crescimento de *Ulva rigida* C. Agardh em condições de stress de macronutrientes

Maria Inês Pavão

Dissertação

Mestrado em Biotecnologia e Biodiversidade Vegetal

2014

Universidade dos Açores
Departamento de Biologia



Crescimento de *Ulva rigida* C. Agardh em condições de stress de macronutrientes

Maria Inês Pavão

Dissertação

Mestrado em Biotecnologia e Biodiversidade Vegetal

Orientadora: Professora Doutora Ana Isabel Neto

2014

“Falar com os olhos... e o que eles dizem... os dois extremos tocam-se: a última despedida dos que deixam este mundo e a saudação dos que passam a inserir-se nele. O impacto do mistério que o envolve, na neblina muito densa que os anos e o tempo ainda não descerraram, para deixarem o sol da vida brilhar em pleno.”

J. Almeida Pavão

Agradecimentos

Gostaria, nestes próximos parágrafos, de dar uma nota de reflexão a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a elaboração deste projeto.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Isabel Neto, por toda a dedicação, por todas as vezes que a inquietei, pela sua forma assertiva de ensinar, pela sua compreensão quando a exaustão fala mais alto.

Ao meu “coorientador” Doutor Gustavo Martins pelas muitas horas de esclarecimentos e ensinamentos.

Ao meu querido amigo e colega Bruno Ivo Magalhães que comigo percorreu esta longa etapa, pela amizade, companheirismo e espírito crítico. Foi com muito gosto e orgulho que caminhei a seu lado.

À Eunice Nogueira e D. Natália Cabral por todos os afazeres no laboratório. À Inés Sanchez, Mariana Antunes, Olaia Moran e Olivier Laroche pela dedicação e disponibilidade no acompanhamento das experiências.

Ao Afonso Prestes, Ana Rita Prestes, Rita Patarra e Nuno Álvaro, pela ajuda nos cálculos, dicas e mapa fabuloso.

Ao António Valério, Ayla Harbich, Carlos Pereira, Carolina Sousa, Francisco Amaral, Hugo Ponte, Mariana Brandão, Mariana Galvão, Mariana Silva, Pepe Brix, Pilar Soares, os meus amigos da Picos, a todos pela amizade e apoio nas alegrias e nas agonias, pela boa disposição e energia.

À minha família, onde se incluem os meu cunhados Bernardo, Nélia e Kira, e muito em especial aos meus queridos irmãos, Filipe, Pedro, Beatriz e Maria João, os génios da minha sanidade.

O meu muito sentido e sincero agradecimento a todos.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CARACTERIZAÇÃO DE <i>ULVA RIGIDA</i> C. AGARDH.....	1
1.2 O CRESCIMENTO E BIORREMEDIAÇÃO	1
1.3 UTILIZAÇÃO.....	3
2 METODOLOGIA.....	5
3 RESULTADOS	13
3.1 TESTE DE NITRATO (N)	13
3.2 TESTE FOSFATO (P)	15
3.3 EPÍFITOS	16
3.4 MORTALIDADE.....	17
4 DISCUSSÃO	21
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2625
ANEXOS.....	3130
6 ANEXO 1.....	3234
7 ANEXO 2.....	3433

Índice de figuras

Figura 1 - Câmara de cultivo	5
Figura 2 - Local de recolha, ETAR da Pranchinha (mapa elaborado por NVÁlvaro, CIRN/CIIMAR).....	6
Figura 3 - Métodos utilizados para conservar os vouchers, prensa e sílica, respetivamente.....	7
Figura 4 - Balança de relojoeiro Kern ALJ 220-5DNM	7
Figura 5 - Posição das porções de alga na caixa de Petri.	8
Figura 6 - Procedimento de pesagem.	8
Figura 7 - Taxa de crescimento médio (\pm erro padrão) por dia para os meios enriquecidos com N.....	14
Figura 8 - Taxa de crescimento médio (\pm erro padrão) por dia. Análise às diferentes concentrações de Fosfato (0,37,1, 2, 4, 8 e 16ppm), cada uma delas sujeita a duas concentrações de Nitrato (0,3 e 1024ppm).	16

Índice de tabelas

Tabela 1 - Teste com combinação ortogonal entre 11 concentrações de Nitrato e 2 concentrações de Fosfato. Cx-caixa; P e N – Fosfato e Nitrato, respectivamente; P – significância.	14
Tabela 2 - Teste com combinação ortogonal entre 6 concentrações de Fosfato e 2 concentrações de Nitrato. Cx-caixa; P – significância.....	15
Tabela 3 - Porções de alga epifitadas.....	16
Tabela 4 - Mortalidade no teste de Nitrato. Os valores de B, VB e V correspondem ao número de porções de alga; V – verde; VB – verde/branco; B – branco (morte); Total – total de mortes em cada um dos estados de saúde da alga.	17
Tabela 5 - Teste de Chi-Quadrado para as concentrações de N quando P = 0,37. Chi_total – teste de Chi-Quadrado calculado para o total de concentrações de N; df – graus de liberdade; P – probabilidade.	18
Tabela 6 - Teste de Chi-Quadrado para as concentrações de N quando P = 2. Chi_total – teste de Chi-Quadrado calculado para o total de concentrações de N; df – graus de liberdade; P – probabilidade.	18
Tabela 7- Número de porções de alga observadas, número de porções esperadas e teste de Chi-Quadrado para as concentrações de n sujeitas a P = 0,37 para todos os estados de saúde. B – branca (morte); VB – moribunda; V – verde.	19
Tabela 8 - Número de porções de alga observadas, número de porções esperadas e teste de Chi-Quadrado para as concentrações de n sujeitas a P = 2 para todos os estados de saúde. B – branca (morte); VB – moribunda; V – verde.	20

Resumo

A utilização de *Ulva rigida* estende-se para diversas áreas, designadamente como alimento no cultivo de invertebrados e.g. *Patella* e *Haliotis*, como fertilizante, biofiltro, bem como na alimentação tradicional nos Açores.

O presente estudo visou compreender o crescimento de *Ulva rigida* quando sujeita a stress dos macronutrientes Nitrato e Fosfato, tendo como referência que um dos macronutrientes ou ambos iriam possivelmente desempenhar papel de fator limitante.

Pretendeu-se determinar valores extremos para o crescimento da alga em estudo, bem como encontrar um meio para o seu crescimento ótimo. Foram utilizadas câmaras de cultivo, onde se fixaram a intensidade luminosa (16200Lux), fotoperíodo (12:12h) e temperatura (20°C) sendo as algas submetidas a diferentes combinações dos macronutrientes em estudo. A combinação N32P2 (ppm) revelou ser o meio adequado para o crescimento *in vitro* de *Ulva rigida*, sendo o Nitrato um fator limitante do crescimento desta espécie.

Palavras-chave: *Ulva rigida*, Nitrato, Fosfato, cultivo, crescimento.

Abstract

The usability of *Ulva rigida* , extends over several areas, namely: as source of food in the breathing of invertebrates e.g. *Patella* and *Haliotis*, as fertilizer, biofilter, as well as complement ingredient in the traditional food of Azores islands. The study here presented aimed the understanding about *Ulva rigida* growth, when exposed to the stress of the macronutrients Nitrate and Phosphate, knowing that one or both macronutrients would possibly play a limiting factor role. It was intended to determine extreme values to the growth of the alga in study, as well as finding a way to its optimal growth. For the study in question we used growing chambers, in which we set the luminous intensity (16200Lux), photoperiod (12:12h) and temperature (20°C). The algae were submitted to various combinations of the macronutrients in study. The N32P2 combination (ppm) has proven to be the way to grow *Ulva rigida in vitro*, were the Nitrate is a factor constraint in the growth of this species.

Keywords: *Ulva rigida*; Nitrate; Phosphate; growing; growth

1 Introdução

1.1 Caracterização de *Ulva rigida* C. Agardh

Ulva rigida C. Agardh (Chlorophyta, Ulvophyceae, Ulvales, Ulvaceae, Guiry & Guiry, 2013), espécie cosmopolita, é uma alga de cor verde brilhante a verde-escuro, podendo exibir um tom dourado nas margens quando está em época reprodutiva ou adquirir tonalidades mais claras a branca quando está sob a influência de stress (Neto et al., 2005). A primeira descrição desta espécie foi publicada por Agardh (1823), sendo o nome ainda hoje aceite taxonomicamente. Morfologicamente *Ulva rigida* caracteriza-se por ter um talo distromático, lobuloso e irregular, cerca de três vezes mais comprido que largo, que contém dentes microscópicos nas margens inferiores. À exceção das células basais, que são retangulares, as restantes são mais altas que largas e contêm entre dois a três pirenóides (Neto et al., 2005).

Nos Açores, *Ulva rigida* é uma alga abundante na zona de marés e zona submersa adjacente, fixando-se, normalmente, diretamente à rocha (Neto et al., 2005). Como todas as algas, não possui raízes, folhas nem tecidos de transporte, não produz flores nem semente. Reproduz-se e completa o seu ciclo de vida através da libertação para a água de células sexuadas masculinas e femininas. A fecundação é normalmente externa, a partir da qual se dá a formação de um ovo que se desenvolve no novo indivíduo. É uma alga verde, anual e de crescimento rápido (Burrows, 1991, Brodie et al., 2007).

1.2 O crescimento e biorremediação

O crescimento das algas é modulado pela capacidade de sobreviverem em ambientes instáveis, com variações significativas de fatores como luz, temperatura, salinidade e nutrientes (Viaroli et al., 1996, Pereira et al., 2006).

As algas podem sobreviver numa grande amplitude de condições de poluição, mas podem crescer ativamente somente dentro de determinados níveis e reproduzir-se dentro de uma dimensão ainda mais restrita. O desempenho dos organismos nestas situações decresce rapidamente nesta ordem: primeiro a

reprodução, depois crescimento e finalmente a sobrevivência (Townsend et al., 2006).

Algumas das espécies de macroalgas possuem características que as tornam singulares como bioindicador de poluição. A maioria das macroalgas é sésbil na natureza e prontamente acumulam compostos presentes nas águas do ambiente que as rodeiam. Vários estudos estão sendo realizados utilizando bioindicadores para detetar diferentes níveis de carga orgânica em cursos de água. Os bioindicadores selecionados têm que reunir alguns requisitos, a sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, para então refletir a carga de poluição orgânica, alterações de pH da água e toxicidade, por exemplo (Rubal et al., 2011). O Nitrato é o macronutriente que mais efeito tem no ciclo de crescimento das algas (Howarth, 1988, Viaroli et al., 1996). No ciclo natural do nitrogênio, o azoto orgânico é convertido nas formas moleculares que as plantas podem assimilar. Este complexo ciclo deve-se muito em parte aos estados de oxidação que as plantas (produtoras), bactérias e fungos desencadeiam (Landau, 1992).

Têm sido efetuados estudos ao crescimento de diversas espécies de algas (*Ulva rigida*, *Pelvetiopsis limitata*, *Hypnes musciformis*, *Macrocystis pyrifera*, *Chaetomorpha linum*, *Porphyra dioica*, nomeadamente) em condições controladas de temperatura e luz, onde se manipula o meio, enriquecendo-o com macronutrientes. O enriquecimento do meio tem sido feito, predominantemente, por adição de NH_4^+ e NO_3^- , dado serem formas de N de fácil absorção para a comunidade algal (Haines & Wheeler, 1978, Fujita et al., 1989, Menéndez et al., 2002, Naldi & Wheeler, 2002, Pereira et al., 2004, Pereira et al., 2008,).

De enfatizar que a compreensão exaustiva dos fatores de temperatura e fotoperíodo irão maximizar a eficiência de cultivos algais (Pereira et al., 2004, Pereira et al., 2006).

1.3 Utilização

As algas verdes do género *Ulva* têm sido descritas como fonte potencial de proteínas para nutrição humana (Fleurence et al., 1995). O trabalho de Carvalho et al (2009) demonstrou que a utilização de *Ulva* na confeção de alimentos de baixo teor energético tem potencial aplicação para o controle do peso corporal, redução do colesterol sanguíneo total e da fração LDL-C, bem como na prevenção de doenças gastro-intestinais.

Curiosamente, *Ulva rigida*, sazonalmente abundante no arquipélago dos Açores (Wallenstein et al., 2010), é utilizada tradicionalmente em algumas das ilhas na confeção de saladas e sopas (Neto et al., 2005). Investigação recente desenvolvida no arquipélago revelou que organismos do género *Ulva* constituem uma importante fonte de ácidos gordos essenciais (Paiva et al., 2012), bem como de proteína e fibras (Rosenberg & Ramus, 1982, Hanisak, 1983, Naldi & Wheeler, 1999, Naldi & Wheeler, 2002, Patarra et al., 2011,).

É interessante o crescente uso das algas para um cada vez maior número de fins, como exemplo o de uma empresa dedicada ao cultivo de ostras na Baía de San Quintin que pediu para que aprovassem o cultivo de *Ulva* nessa mesma baía para poder ser explorada como fertilizante para a agricultura (Jorgensen et al., 2009).

Nos últimos anos *Ulva rigida* tem sido também utilizada na alimentação de invertebrados, e.g. *Patella* e *Haliotis* em experiências de aquacultura (Neto et al., 2010).

Mwandya et al. (1999) demonstra a capacidade de três espécies de algas (*Eucheuma denticulatum*, *Gracilaria crassa* e *Ulva reticulata*) como biorremediadoras em sistemas de aquacultura de pequena escala. Esta mais-valia algal, defende, apresenta-se como uma boa forma de reduzir custos em sistemas de cultivo, bem como potencial fonte de riqueza.

A utilização de macroalgas como agentes biorremediadores tem sido estudada e inserida em produções de aquacultura, usando-se, entre outras, diversas espécies de *Ulva* (Cohen & Neori, 1991, Neori et al., 1991, Neori et al., 1995, Chopin et al., 1999, Kraemer et al, 2004).

Apesar destas particularidades e do interesse que desperta, pouco se conhece sobre a fisiologia de *Ulva* em cultivo, desconhecendo-se os valores ótimos e letais dos parâmetros que mais condicionam o seu crescimento.

O presente projeto pretende investigar, em cultivo *in vitro*, o efeito no crescimento de *Ulva rigida* dos macronutrientes Nitrato e Fosfato em condições controladas de temperatura e luz.

2 Metodologia

Neste estudo foram realizadas duas experiências de modo a testar o crescimento de *Ulva rigida* em condições de stress de macronutrientes, recorrendo ao uso de três câmaras de cultura Sanyo MLR-351H (Fig.1) com capacidade de 294L e usando como contentores de cultivo caixas de Petri quadri-divididas. Estas, bem como o restante material não de vidro usado na preparação e acompanhamento dos cultivos sofreram o mesmo tratamento. Foram devidamente limpas com álcool etílico para desinfeção, eliminando qualquer tipo de impureza ou porção orgânica indesejada que pudesse comprometer a experiência. As garrafas de vidro onde a água salgada foi autoclavada e armazenada, uma vez vazias, eram deixadas em HCl durante cerca de dois dias e posteriormente lavadas com água quente corrente. Este último procedimento era repetido várias vezes de modo a eliminar qualquer resíduo do ácido lavante. Todo o restante material de vidro e metal foi autoclavado recorrendo à autoclave AJC, modelo uniclave 88 do CIRN (Centro de Investigação de Recursos Naturais).



Figura 1 - Câmara de cultivo

As amostras de *Ulva rigida* usadas neste estudo foram coletadas na zona de intertidal junto à ETAR da Pranchinha, localizada na costa sul de São Miguel, na freguesia de São Roque (Fig. 2). Após colheita foram acondicionadas em contentores contendo água salgada e transportadas para o laboratório.



Figura 2 - Local de recolha, ETAR da Pranchinha (mapa elaborado por NVÁlvaro, CIRN/CIIMAR).

Uma vez no laboratório, as algas foram colocadas em tabuleiros, com a mesma água onde foram trazidas, e triadas, selecionando-se as algas que se apresentavam limpas de epífitos, sem perfurações e uniformes. As algas selecionadas foram colocadas num outro recipiente com água salgada filtrada (recorrendo ao sistema de filtração SpeedFlow, CRAMI MILANO) e autoclavada onde permaneceram durante 10 minutos. A intensidade luminosa foi medida no exterior utilizando-se o fluxímetro Center 337 Lightmeter para, deste modo, determinar a intensidade de luz a usar nas câmaras.

Para cada experiência, prepararam-se vouchers de espécimenes da amostra em uso que foram depositados no Herbário Ruy Telles Palhinha (AZB) do Departamento de Biologia, um em prensa, outro conservado em sílica (Fig. 3).



Figura 3 - Métodos utilizados para conservar os vouchers, prensa e sílica, respetivamente.

Para o desenvolvimento experimental, procedeu-se à preparação de porções de aproximadamente 1cm² de alga, seguindo um molde em papel plastificado e usando tesouras de papel.

Cada caixa de Petri a utilizar na experiência foi etiquetada, na borda da respetiva tampa, com iniciais do investigador (MIP para designar Maria Inês Pavão), temperatura, meio, data e nº da caixa (ex: MIP, T°C, Meio, 10Nov2012, A1) e recebeu o meio de cultivo a testar. Em três das quatro células de cada caixa foram colocadas porções de algas, previamente pesadas recorrendo a uma balança de relojoeiro Kern ALJ 220-5DNM (Fig.4), uma em cada célula. A quarta célula da caixa, apesar de não ter alga, possuía meio de cultivo de modo a minimizar a evaporação (Fig. 5).



Figura 4 - Balança de relojoeiro Kern ALJ 220-5DNM

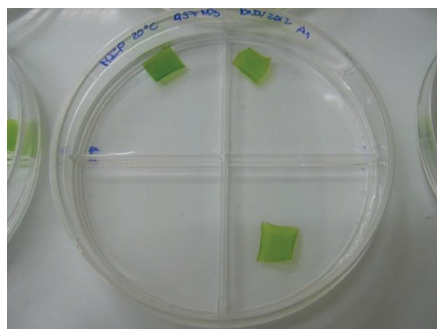


Figura 5 - Posição das porções de alga na caixa de Petri.

As algas foram manuseadas de forma cuidadosa, sendo todo o procedimento efetuado com a utilização de luvas cirúrgicas. Na remoção do excesso de água de cada porção de *Ulva*, usou-se pinças e gaze, passando-se cada um dos lados da alga 6x pela referida gaze. Este procedimento foi idêntico em todas as experiências efetuadas e cada vez que se realizavam pesagens (Fig. 6.).



Figura 6 - Procedimento de pesagem.

O meio utilizado consistiu em água salgada enriquecida com os macronutrientes a testar em diferentes concentrações. Para tal, fez-se uma combinação ortogonal entre diferentes concentrações dos nutrientes a testar. Ou seja, cada uma das concentrações de N foi testada com as condições previamente definidas de P. Posteriormente fixaram-se duas concentrações extremas de N e testaram-se todas as concentrações de P.

Realizaram-se duas experiências.

Na experiência 1, desenvolvida em duas fases, avaliaram-se onze concentrações de Nitrato para duas concentrações de Fósforo. Para a determinação das concentrações de Nitrato (N) usou-se como valor de base 0,3 ppm, correspondente ao valor ambiente, o qual foi determinado por análise bioquímica à água salgada recolhida para preparação dos meios (análise realizada pelo INOVA – Instituto Inovação e Tecnologia dos Açores). A partir desta base definiram-se os valores de N 0,3, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 ppm em combinação com duas concentrações de Fósforo (P) correspondentes ao valor ambiente de 0,37 ppm, determinado da mesma forma acima descrita, e 2 ppm. Esta última correspondente a um valor bastante acima do encontrado em condições naturais, na altura da montagem da experiência. Por uma questão logística, a experiência foi dividida em duas fases: Num primeiro teste, foram testadas as concentrações de Nitrato de 0.3 ppm, 2, 4, 8, 16, 32 ppm. No segundo testaram-se as concentrações de 0.3 ppm, 64, 128, 256, 512, 1024 ppm.

A experiência 2 consistiu em testar seis concentrações de fósforo (0,37 ppm, correspondendo à ambiente, e 1, 2, 4, 8 e 16 ppm) para duas concentrações de Nitrato, nomeadamente 0,3 ppm correspondendo ao ambiente, e 1024 ppm, dado ter sido o valor mais alto de N testado.

Todas as concentrações de N foram preparadas a partir do mesmo composto, NaNO_3^- . Para tal, calculou-se a percentagem de NO_3^- presente no composto, bem como de Na^{2+} , tendo por base o valor da Massa Molar do composto. Uma vez obtidas, 73% e 27% respetivamente, procedeu-se ao cálculo da quantidade de composto necessária, por meio da regra de 3 simples: para a quantidade de NO_3^- pretendido, qual a quantidade de Na^{2+} necessária (e.g. 2NO_3 corresponde a 73%, x Na^{2+} corresponderá a 27%), o valor obtido será o valor de Na necessário. Seguidamente, soma-se ao valor 2 ppm de NO_3^- , o respetivo valor de Na^{2+} obtido. Esse somatório será então o valor do composto necessário para a concentração de N que se pretende.

As concentrações de Fósforo foram obtidas pela mesma fórmula que as de Nitrato Para tal, utilizou-se o composto KH_2PO_4 . Por meio do valor da Massa

Molar do composto, sabe-se que 2 ppm correspondem a 22.6% do composto. Como a análise feita (INOVA) para determinar os valores ambientes tinha como marcador o composto P₂O₅, fez-se o ajuste para o composto que se tinha disponível, KH₂PO₄, referido em cima. Ou seja, calculou-se, pelo peso Molar de cada composto, a percentagem de P presente em cada um deles. A partir daqui, determinou-se adequadamente a quantidade necessária para a concentração desejada. Assim sendo, para uma concentração de 2 ppm de P, teria que se pesar cerca de 0,008 g/L do composto.

Para todos os testes as câmaras foram preparadas com a temperatura de 20°C, uma intensidade luminosa de 16200 Lux e um fotoperíodo de 12:12h. As caixas foram dispostas, nas câmaras de forma aleatória tendo o cuidado de as rodar ciclicamente.

O primeiro teste de Nitrato decorreu durante 27 dias, o segundo durante 21. O teste de Fosfato (experiência 2) decorreu durante 22 dias. As algas foram pesadas no início e final da experiência. Foi calculada a taxa de crescimento. Para tal recorreu-se à fórmula $\frac{\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})}{n} * 100(\%)$, correspondendo Ln a logaritmo natural (ou logaritmo neperiano) e *n* ao número de dias que ocorreu a experiência (Yong 2013). Os dados foram standardizados, dado a duração dos testes terem sido diferentes e de modo a poderem ser adequadamente comparados. De dois em dois dias, era examinado o estado de saúde, o qual era avaliado segundo três aspetos de referência, verde (V), moribundo (VB) e morto/branco (B). Todos os processos de avaliação e acompanhamento dos cultivos foram efetuados durante a fase luminosa da câmara para não causar estímulo luminoso às algas. A evaporação foi vigiada, mas não foi necessário repor meio. Quando se verificou a morte de uma porção de alga, sempre que possível, pesou-se e eliminou-se a referida porção.

Todos os dados foram registados em folhas de registo impressas. Daí, foram introduzidos em ficheiros Excel, organizados em metadados e tabela de dados brutos. O ficheiro dos metadados caracteriza toda a experiência: nome da experiência, data de início e de fim, autor/s da experiência, recolha de água salgada (quem efetuou), data de recolha da alga, local de recolha, coletores,

texto explicativo, nome do autor da tabela, fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura, meio, data (de cada pesagem), momento (em que se faz a pesagem e/ou verificação do estado de saúde), caixa, replicados, peso, saúde, fotos e epífitos. O ficheiro de dados brutos, apresenta a tabela onde consta fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura, meio, data (de cada pesagem), momento (em que se faz a pesagem e/ou verificação do estado de saúde), caixa, replicados, peso, saúde, fotos e epífitos. Os meios são expressos sob a forma NxPy (e.g. N2P2) quando se trata da experiência dos Nitrato e PxNy (e.g. P4N8) aquando de Fosfato.

A Análise de Variância (ANOVA, Armstrong et al., 2000) foi usada para testar se diferentes concentrações de nutrientes afectam as taxas de crescimento de *Ulva rigida*. Para tal, utilizou-se o software WinGmav5 (Underwood et al., 1997) usando um desenho misto com 3 factores: Nitrato (ortogonal), Fosfato (ortogonal) e caixa (aleatório e aninhado nos restantes). Antes da análise, procedeu-se à análise da heterogeneidade de variâncias e foram aplicadas transformações quando necessário (Underwood et al., 1997). Para a comparação a posteriori de diferenças entre níveis de factores significativos foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (SNK).

Para avaliar se os casos de morte nas culturas de algas foram influenciados pela concentração de Nitrato utilizada, recorreu-se ao teste Chi-Quadrado (Hair et al., 2007). Com este teste, comparou-se os resultados experimentais com os que seriam obtidos se o número de mortes verificado fosse uniformemente distribuído para o conjunto de concentrações de Nitrato. A hipótese testada foi (H0): a variação na concentração de Nitrato não influencia a sobrevivência das culturas de algas. Como ferramenta de cálculo utilizou-se o *Microsoft Excel* e a sua função "TESTE.CHI". Essa função devolve a probabilidade de os valores experimentais ocorrerem sob o pressuposto de independência e é indicada para determinar se os resultados em hipótese são verificados pela experiência. Os parâmetros de entrada são o conjunto com os valores observado experimentalmente e o conjunto de valores esperados ($\frac{\text{número de porções de alga mortas}}{\text{número total de amostras}}$). O teste foi aplicado para valores de Fosfato de 0,37 ppm e de 2 ppm, e para cada um desses valores de Fosfato criaram-se

séries de valores com o número de mortes para as várias concentrações testadas.

As taxas de crescimento/dia das algas foram calculadas de acordo com Yong et al. (2013) e os resultados graficados para melhor visualização.

3 Resultados

3.1 Teste de Nitrato (N)

Neste teste, os dados foram transformados (X^* constant) e optou-se por um valor de P mais conservador ($P < 0,01$), dado a heterogeneidade de variâncias registada dos valores das taxas de crescimento/dia (Underwood, 1997).

A análise de variância revelou a existência de um efeito significativo da concentração de Nitrato na taxa de crescimento de *Ulva rigida*, mas não houve qualquer efeito ($P > 0,01$) do Fosfato (Tabela1). Este resultado indica que o crescimento desta alga foi fortemente condicionado pelas concentrações de Nitrato.

A partir da análise da Figura 7 é possível constatar que o crescimento foi baixo para valores de N abaixo de 16 ppm. Acima desse valor ocorreram flutuações sendo o crescimento mais ou menos homogêneo excepto na N1024 onde houve um crescimento elevado.

Por meio do teste de SNK (Anexo 1) verificou-se, de uma forma mais clara, que a taxa de crescimento de *U. rigida* em meio enriquecido com N1024 foi significativamente maior relativamente a todas as outras concentrações de N testadas. Algas cultivadas em meio com N0,3 apresentaram taxas de crescimento significativamente inferiores quando comparada com algas cultivadas em meios com N32 e a partir da concentração N128 (portanto, N32, N128, N256, N512 e N1024). Entre meios com concentrações N32 e N512 não há diferenças significativas, tal como entre N32 e N128, não se registaram diferenças significativas nas taxas de crescimento de *U. rigida*.

Tabela 1 - Teste com combinação ortogonal entre 11 concentrações de Nitrato e 2 concentrações de Fosfato. Cx-caixa; P e N – Fosfato e Nitrato, respetivamente; P – significância.

Fonte	DF	MS	F	P	F versus
Nitrato	10	0,0242	9,06	<0,001	CX(NXP)
Fósforo	1	0,0139	5,18	0,0278	CX(NXP)
CX(NXP)	44	0,0027	0,81	0,7809	RES
NXP	10	0,0058	2,17	0,0387	CX(NXP)
RES	132	0,0033			
TOT	197				

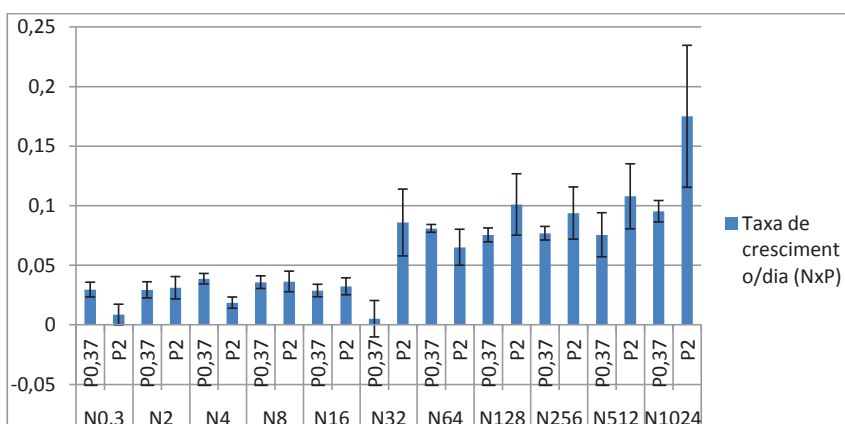


Figura 7 - Taxa de crescimento médio (± erro padrão) por dia para os meios enriquecidos com N.

3.2 Teste Fosfato (P)

A análise dos efeitos das concentrações de Nitrato e Fosfato (Tabela 2) indica, mais uma vez, que o efeito no crescimento de *Ulva rigida* foi apenas afetado pela concentração de N. Verificou-se que, independentemente da concentração de Fosfatos, registaram-se sempre maiores taxas de crescimento de *U. rigida* em meio enriquecido com N, (N1024ppm) conforme é perceptível na Figura 8. Por meio do teste SNK (Anexo 2), verificou-se que apenas existiam diferenças significativas no crescimento entre os meios enriquecidos com P2 e P 0,37, com maior crescimento em P 2, diferença significativa entre P 4 e P 0,37, com maior crescimento em P 4 e diferenças significativas também entre P4 e P 8, com maior crescimento em P 4.

Tabela 2 - Teste com combinação ortogonal entre 6 concentrações de Fosfato e 2 concentrações de Nitrato. Cx-caixa; P – significância

Fonte	DF	MS	F	P	F versus
Fósforo	5	0,0146	2,20	0,0876	CX(PXN)
Nitrato	1	0,4886	73,53	0,0000	CX(PXN)
CX(PXN)	24	0,0066	0,48	0,9771	RES
PXN	5	0,0168	2,52	0,0570	CX(PXN)
RES	72	0,0139			
TOT	107				

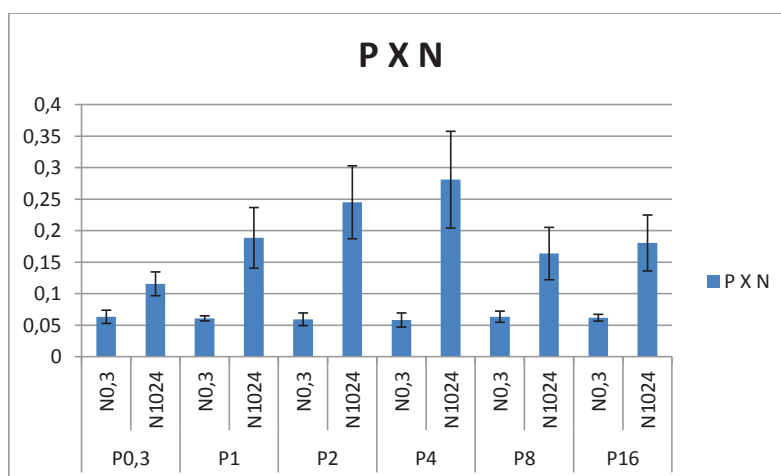


Figura 8 - Taxa de crescimento médio (\pm erro padrão) por dia. Análise às diferentes concentrações de Fosfato (0,37,1, 2, 4, 8 e 16ppm), cada uma delas sujeita a duas concentrações de Nitrato (0,3 e 1024ppm).

3.3 Epífitos

Na experiência do Nitrato não se verificou a ocorrência de quaisquer epífitos. Na experiência do Fosfato, ao invés, foi registada a ocorrência de epífitos para os meios P4N03 (11,1% - ou seja, uma em cada nove porções de alga), P4N1024 (33,3% - três em cada nove porções de alga), P16N0,3 (11,1% - uma em cada nove porções de alga) e P16N1024 (11,1% - uma em cada nove porções de alga), como apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Porções de alga epífitadas.

Meio	Percentagem de porções de <i>U. rigida</i> epífitadas (%)
P 4 N 0,3	11,1
P 4 N 1024	33,3
P 16 N 0,3	11,1
P 16 N 1024	11,1

3.4 Mortalidade

Após analisar a tabela 4, constata-se que a maior percentagem de mortalidade de *Ulva rigida* foi registada no meio N32P0,37, 33,3%, (três em cada nove porções de alga). Seguidamente, os meios N32P2 e N64P2 com 22,2% (duas em cada nove porções de alga), e os meios N512P0,37, N0,3P2 e N128P2 com 11,1% (uma em cada nove porções de alga). Verificou-se também que, ao longo do tempo houve uma diminuição no estado de saúde da maioria das porções de *U.rigida*. Foi verificada a morte desta alga apenas no teste de Nitrato.

Tabela 4 - Mortalidade no teste de Nitrato. Os valores de B, VB e V correspondem ao número de porções de alga; V – verde; VB – verde/branco; B – branco (morte); Total – total de mortes em cada um dos estados de saúde da alga.

Nitrato (ppm)	Fosfato 0,37 (ppm)			Fosfato 2 (ppm)		
	B	VB	V	B	VB	V
0,3	0	7	2	1	5	3
2	0	5	4	0	6	3
4	0	0	8	0	8	1
8	0	7	2	0	5	4
16	0	5	4	0	9	0
32	3	2	4	2	7	0
64	0	6	3	2	6	1
128	0	7	2	1	7	1
256	0	7	2	0	8	1
512	1	8	0	0	7	2
1024	0	8	1	0	9	0
Total	4	62	32	6	77	16

Por meio do teste de Chi-Quadrado (tabelas 5 e 6), verificou-se que somente nos meios enriquecidos com Fosfato é 0,37, a concentração de Nitrato influenciou a morte da alga, pois a probabilidade associada ao teste de Chi-Quadrado (P) foi inferior a 0,05. Os valores da tabela 5 foram calculados

através dos valores apresentados na tabela 7. Os valores da tabela 6 foram calculados através dos valores apresentados na tabela 8.

Tabela 5 - Teste de Chi-Quadrado para as concentrações de N quando P = 0,37.
Chi_total – teste de Chi-Quadrado calculado para o total de concentrações de N;
df – graus de liberdade; **P** – probabilidade.

NxP0,37	
chi_total	51,6124552
df	20
P	0,00012965

Tabela 6 - Teste de Chi-Quadrado para as concentrações de N quando P = 2.
Chi_total – teste de Chi-Quadrado calculado para o total de concentrações de N;
df – graus de liberdade; **P** – probabilidade.

NxP2	
chi_total	28,2641949
df	20
P	0,10329136

O teste de Chi-Quadrado (χ^2) revelou, observando-se de uma forma mais clara pela tabela 7, que o meio N 32 P0,37 foi onde se verificou maior mortalidade, sendo, portanto, a concentração N 32 a que mais influencia o crescimento de *U. rigida*, onde o valor esperado de mortes é muito inferior a χ^2 correspondente, 0,367346939 e 18,86734694 respetivamente.

Tabela 7- Número de porções de alga observadas, número de porções esperadas e teste de Chi-Quadrado para as concentrações de n sujeitas a P = 0,37 para todos os estados de saúde. B – branca (morte); VB – moribunda; V – verde.

Concentração de NxP0,37 (ppm)		B	VB	V
0,3	observado	0	7	2
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,299612318	0,299886621
2	observado	0	5	4
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,084558555	0,383219955
4	observado	0	0	8
	esperado	0,326530612	5,06122449	2,612244898
	Chi	0,326530612	5,06122449	11,1122449
8	observado	0	7	2
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,299612318	0,299886621
16	observado	0	5	4
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,084558555	0,383219955
32	observado	3	2	4
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	18,86734694	2,396386512	0,383219955
64	observado	0	6	3
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,016458196	0,00127551
128	observado	0	7	2
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,299612318	0,299886621
256	observado	0	7	2
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,299612318	0,299886621
512	observado	1	8	0
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	1,089569161	0,93402092	2,93877551
1024	observado	0	8	1
	esperado	0,367346939	5,693877551	2,93877551
	Chi	0,367346939	0,93402092	1,279053288

Tabela 8 - Número de porções de alga observadas, número de porções esperadas e teste de Chi-Quadrado para as concentrações de n sujeitas a P = 2 para todos os estados de saúde. B – branca (morte); VB – moribunda; V – verde.

Concentração de NxP2 (ppm)		B	VB	V
0,3	observado	1	5	3
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,378787879	0,571428571	1,642045455
2	observado	0	6	3
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0,142857143	1,642045455
4	observado	0	8	1
	esperado	0,489795918	6,285714286	1,306122449
	Chi	0,489795918	0,467532468	0,071747449
8	observado	0	5	4
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0,571428571	4,454545455
16	observado	0	9	0
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0,571428571	1,454545455
32	observado	2	7	0
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	3,878787879	0	1,454545455
64	observado	2	6	1
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	3,878787879	0,142857143	0,142045455
128	observado	1	7	1
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,378787879	0	0,142045455
256	observado	0	8	1
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0,142857143	0,142045455
512	observado	0	7	2
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0	0,204545455
1024	observado	0	9	0
	esperado	0,545454545	7	1,454545455
	Chi	0,545454545	0,571428571	1,454545455

4 Discussão

Os resultados revelaram que entre as concentrações N 0,3 e N 16, não existem diferenças significativas no crescimento de *U. rigida*, tal como entre N 0,3 e N 64. No entanto, houve diferenças significativas no crescimento entre as concentrações N 0,3 e N 32, sendo a concentração N 0,3 onde se verificou o crescimento mais reduzido. Deste modo, não há dúvida em eliminar N 0,3 como potencial concentração para o cultivo de *Ulva rigida*. Entre N 128 e N 512 também não há diferenças significativas no crescimento das porções de alga testadas. O crescimento mais elevado de todos registou-se na concentração N 1024, o qual foi significativamente diferente relativamente a todas as outras concentrações testadas. No entanto, com o objetivo de minimizar o custo do processo, esta hipótese foi posta de lado, pois iria elevar bastante o custo do cultivo desta alga em estudo. As concentrações N 32 e N 64 não apresentam diferenças significativas no seu crescimento. No entanto, comparando estas duas concentrações para P2 constatou-se que o crescimento em N 32 é superior. Deste modo, decidiu-se utilizar esta concentração de Nitratos.

Avaliando o teste de Fosfato, constata-se que o crescimento da *Ulva* não depende deste macronutriente, apesar do consumo de P aumentar um pouco a partir de concentrações muito elevadas de Nitrato. Não foi realizado o teste de Chi-Quadrado a P uma vez que não foram verificadas mortes em nenhuma das concentrações.

Como não existem diferenças significativas entre P 2 e as restantes concentrações de P, com exceção de P 0,37, e uma vez que na concentração P 2 é onde se verifica o segundo crescimento mais elevado de *Ulva rigida*, embora este não seja significativamente diferente em relação ao crescimento com P 4 (a concentração onde o crescimento é maior), estabeleceu-se que o valor de P 2 seria adequado para adicionar ao meio enriquecido com N 32. Esta decisão foi reforçada pelo teste de χ^2 , onde para P 2 nenhuma das concentrações de N influenciou a morte das porções de alga.

Pode-se concluir, pelos resultados acima descritos que N foi o nutriente limitante no crescimento de *U. rigida* no presente estudo. Este é um resultado

demonstrado em vários estudos (Howarth, 1988, Landau, 1992, Pedersen & Borum, 1996, Kraemer et al., 2004).

Outros estudos revelam a importância de N no crescimento de diversas algas (Haines & Wheeler, 1978, Fujita et al., 1989, Pedersen & Borum, 1996, Menéndez et al., 2002, Pereira et al., 2004, Pereira et al., 2008). O enriquecimento da água em nutrientes leva à alteração da comunidade algal. Algas de crescimento rápido são muito mais suscetíveis às alterações de concentração de N, sendo este nutriente considerado o macronutriente limitante para o crescimento destas algas em períodos de longa duração (Pedersen & Borum, 1996).

Apesar de N ser, na maioria dos contextos, o macronutriente limitante, existem casos em que isto não se verifica, como defende, Menéndez et al. (2002). Este último estudo demonstra que o enriquecimento do meio com N ou P ou com os dois nutrientes em simultâneo, resulta numa maior concentração destes mesmos nutrientes no tecido da alga *Chaetomorpha linum*. O aumento da biomassa verificou-se mais elevado quando o meio foi enriquecido com N e P simultaneamente, revelando também que, ao contrário do que seria de esperar, o macronutriente P pode também desempenhar um papel importante. Embora em alguns contextos, P possa ser o macronutriente limitante, verifica-se que N é, na maior parte dos casos, o macronutriente que apresenta maior relevância como agente limitante ao crescimento algal (Howarth, 1988, Krom et al., 1991, Ah et al., 2002).

Interessante indicar que, neste mesmo estudo (Menéndez et al., 2002), o consumo de N (sob a forma de NH_4^+) tal como P foi maior quando estes nutrientes foram adicionados separadamente. No entanto, o consumo de N, sob a forma de Nitrato, foi maior quando o meio foi enriquecido com N+P.

Dada a proximidade dos valores de crescimento/dia de *Ulva rigida* entre os dois meios onde se verificou maior crescimento P 2 N 1024 e P 4 N 1024, não havendo diferenças significativas que o consigam justificar, tendo em conta a importância de poupar recursos e a maior frequência de epífitos em algas cultivadas em meio com P 4, sugere-se a utilização de concentração P 2 como sendo a mais adequada.

No estudo da mortalidade feito através do teste de Chi-Quadrado para os meios NxP2, é de salientar que a mortalidade encontrava-se distribuída por seis meios diferentes (N 512 P 0,37, N 128 P 2, N 64 P 2, N 32 P 0,37, N 32 P 2 e N 0,3 P 2), podendo-se, assim atribuir este resultado a algum fator externo que não foi contabilizado, como a fragilidade das porções de alga ou na seleção inicial ou manuseamento destas no decorrer da experiência. Refletindo sobre o estado de saúde das algas, pôde-se constatar que houve um elevado número de porções de *Ulva rigida* moribunda. Esta situação pode ter sido causada pela escala utilizada para a avaliação do referido estado de saúde. Ou seja, as porções de alga foram consideradas verdes sempre que se apresentavam em perfeita condição, totalmente verde e viçosa sem qualquer tipo de branqueamento; eram consideradas mortas (brancas) quando se apresentavam totalmente brancas e, por último, consideradas moribundas quando apresentavam algum tipo de branqueamento. Este último estado apresentava uma elevada fase de estados, desde um branqueamento leve, moderado a bastante severo, sendo deste modo possível compreender o elevado número de porções de alga nesta estado de saúde. Após análise do teste de SNK (avaliação das diferenças significativas) e do teste de χ^2 (onde se verificou que para os meios de N enriquecidos com P 2 não houve influência de N na mortalidade ao invés do que se verificou para os meios de N enriquecidos com P 0,37) pôde-se definir a combinação N32P2 como valor ótimo de combinação de N:P para o crescimento *in vitro* de *Ulva rigida* nas condições de intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodos testados.

É bastante relevante ter-se em conta a fonte de N. Como demonstra o estudo realizado por Fujita et al. (1989), a relação entre o crescimento e a retenção interna de N pelas algas *Pelvetiopsis limitata* e *Ulva rigida* depende da origem de N e das condições de cultivo. A disponibilidade de N indica que o crescimento de *P. limitata* foi maior quando a fonte de N foi o composto NH_4^+ , apesar da maior abundância de NO_3^- . No entanto, Haines & Wheeler (1978), em experiências com as macrófitas marinhas *Hypnes musciformis* e *Macrocystis pyrifera*, e aquando de concentrações elevadas, revelou que o consumo de N aumenta tanto em meios enriquecidos com NO_3^- em simultâneo com NH_4^+ , sendo ambos consumidos. Com esta indicação sugere a

necessidade de testar, no futuro, a avaliação do crescimento de *U. rigida* também em meios enriquecidos com NH_4^+ , de maneira a comparar o crescimento desta alga nestes dois meios.

Pereira et al. (2008) testou a capacidade de absorção e acumulação de N da alga *Porphyra dioica* para as mesmas duas fontes de N referidas anteriormente, NH_4^+ e NO_3^- , onde o meio foi enriquecido com cada um dos compostos separadamente e em simultâneo. Estes autores referem também a influência do fotoperíodo, e da presença simultânea de NH_4^+ e NO_3^- , assim como os efeitos do enriquecimento em P no crescimento. A capacidade da alga *Porphyra dioica* em absorver, acumular N e P e crescer foi idêntica quando sujeita a NH_4^+ e NO_3^- separadamente. O consumo de N foi maior durante a fase clara, sendo o consumo de N sob a forma de NH_4^+ maior que sob a forma de NO_3^- . O enriquecimento em P não influenciou o crescimento desta alga, sugerindo a capacidade limitada desta alga absorver P.

Fatores como fotoperíodo e temperatura são muito relevantes para compreender o ciclo de crescimento de qualquer alga. Sendo contabilizados, podem revelar estratégias muito relevantes para a eficiência do cultivo. Pereira et al. (2004) revelou que no crescimento de *Porphyra dioica* a temperatura teve uma maior influência do que o fotoperíodo.

Note-se também que o meio escolhido para este estudo, NO_3^- , prendeu-se com o facto de este ter sido o composto detectado em maior abundância na área onde a alga foi recolhida.

Com este estudo, não foi possível encontrar valores a partir dos quais a sobrevivência desta espécie fosse posta em causa. Isto parece indicar que estamos perante uma espécie com um excelente potencial remediador.

Diversas espécies têm sido estudadas, verificando-se que espécies como as macroalgas *Eucheuma denticulatum*, *Gracilaria crassa* e *Ulva reticulata*, em sistema integrado de aquacultura, são bons candidatos a biorremediadores, revelando, no entanto, uma maior eficiência em geral no caso de algas do género *Ulva* (Mwandya et al., 1999).

O cultivo de algas é uma mais-valia tanto para a economia mundial como local.

A Região autónoma dos Açores (RRA) tem uma longa história de utilização de algas, nomeadamente, na alimentação quotidiana da população. A reintrodução de *U. rigida* na dieta alimentar traria não só um retorno económico como também da própria cultura e tradição insular.

Na RAA, a economia assenta fortemente na agricultura. É sabido que as algas possuem um elevado nível proteico (Rosenberg & Ramus, 1982, Hanisak, 1983, Naldi & Wheeler, 1999, Naldi & Wheeler, 2002, Patarra et al., 2011) o que poderia torná-las num complemento da proteína animal no fabrico de rações pecuárias, na sua generalidade.

É assim possível justificar que o cultivo de *U. rigida* seja muito vantajoso para a Região por todas as razões socioeconómicas, bem como no potencial de empregabilidade, que uma nova indústria pode propiciar. No entanto, o cultivo desta alga a nível industrial nunca foi feito, somente *in vitro*, pelo que este deva ser o próximo passo a dar.

5 Referências bibliográficas

- Ahn, C., Chung, A. & Oh, H., 2002. Diel rhythm of algal phosphate uptake rates in P-limited cyclostats and simulation of its effect on growth and completion. *Journal of Phycology* 38:695-704.
- Armstrong, R.A., Slade, S.V. & Eperjesi, F., 2000. An introduction to analysis of variance (ANOVA) with special reference to data from clinical experiments in optometry. *Ophthalmic & Physiological Optics* 20:235-241.
- Brodie, J., Maggs, C.A. & John, D.M., 2007. *The green seaweeds of Britain and Ireland*. British Phycological Society.
- Burrows, E.M., 1991. *Seaweeds of the British Isles: chlorophyta*. British museum (natural history).
- Carvalho, A.F.U., Portela, M.C.C., Sousa, M.B., Martins, F.S., Rocha, F.C., Farias, D.F. & Feitosa, J.P.A., 2009. Caracterização fisiológica e físico-química da fibra alimentar da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*. *Brazilian Journal of Biology* 3:969-977.
- Chopin, T., Yarish, C., Wilkes, R., Belyea, E., Lu, S. & Mathieson, A. 1999. Developing Porphyra/salmon integrated aquaculture for bioremediation and diversification of the aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 11:463–472.
- Cohen, I. & Neori, A. 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents I. Ammonia Uptake Kinetics and Nitrogen Content. *Botanica Marina* 34:475-482.
- Fleurencel J., Le Coeur C., Mabeau S., Maurice M. & Landrein A. 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of applied Phycology* 7:577-582.
- Fugita, R.M., Wheeler, P.A. & Edwards R.L. 1989. Assessment of macroalgal nitrogen limitation in a seasonal upwelling region. *Marine Ecology Progress Series* 53:293-303.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 14 December 2013.

Haines, K.C. & Wheeler, P.A. 1978. Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hyonea musciformis* (rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (phaeophyta). *Journal of Phycology* 14:319-324.

Hair, J.F., Black, R.E.A., Tatham, R.L. 2007. *Análise Multivariada de Dados*. Bookman.

Formatada: Inglês (Estados Unidos)

Hanisak, M.D. 1983. *The nitrogen relationships of marine macroalgae. Nitrogen in the marine Environment*.

Howarth, R.W. 1988. Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Review of Ecology and Systematic* 19:89-110.

Jorgensen, P., Silvia, E., Ibarra-Obando & Carriquiry, J.D., 2009. Management of natural *Ulva spp.* blooms in San Quintin Bay, Baja California: Is it justified? *Journal of applied Phycology* 22:549-558.

Kraemer, G.P., Carmona, R., Chopin, T., Neefus, C., Tang, X. & Yarish, C. 2004. Evaluation of the bioremediatory potential of several species of the red alga *Porphyra* using short-term measurements of nitrogen uptake as a rapid bioassay. *Journal of Applied Phycology* 16:489-49.

Krom, M.D., Kress, N. & Brenner, S., 1991. Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* 36:424-432.

Landau, M., 1992. *Introduction to Aquaculture*.

Menéndez, M., Herrera, J. & Comín, F.A., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O. F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon. *Scientia Marina* 4:355-364.

Formatada: Inglês (Estados Unidos)

Formatada: Inglês (Estados Unidos)

Mwandya, A.W., Mtolera, M.S.P., Pratap, H.B. & Jiddawi, N.S., 1999. *Macroalgae as biofilters of dissolved inorganic nutrients in an integrated mariculture tank system in Zanzibar*. ISSN 0856-7972.

- Naldi, M. & Wheeler, P.A., 1999. Changes in Nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *Journal of Phycology* 35:70–77.
- Naldi, M. & Wheeler, P.A., 2002. N measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and 15 n accumulation in algal tissue. *Journal of Phycology* 38:135–144.
- Neori, A., Cohen, I. & Gordin, H., 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. *Botanica Marina* 34:483-489.
- Neori, A., Krom, M.D., Ellner, S.P., Boyd C.E., Popper, D., Rabinovitch R., Davison, P.J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D., Gordin, H., 1995. Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture* 141:183-199.
- Neto, A.I., Prestes, A.C.L., Álvaro, N.M.V. & Xavier, E.R.N., 2010. *Estudo da viabilidade de produção de Lapa (Patella e Haliotis) em aquacultura intensiva*. Departamento de Biologia, Universidade dos Açores.
- Neto, A.I., Tittley, I & Raposeiro, P., 2005. *Flora Marinha do Litoral dos Açores* [Rocky Shore Marine Flora of the Azores]. ISBN 972-99884-0-4 Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Açores.
- Paiva, L., Lima, E., Baptista, J., Patarra, R.F. & Neto, A.I., 2012. Total lipid content, fatty acid profile and nutritional value of selected macroalgae from S. Miguel Island littoral zone. “*International Symposium FloraMac2012*”, P23. Colegio dos Jesuítas, Funchal, Madeira, 5-8 de Setembro.
- Patarra, R.F., Paiva, L., Neto, A.I., Lima, E. & Baptista, J., 2011. Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 23:205-208.
- Pedersen & Borum, 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen

stotage among ohytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 142:261-272.

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

Pereira, R., Sousa-Pinto, I. & Yarish, C., 2004. Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Phycologia* 43:756-767.

Pereira, R., Yarish, C., Sousa-Pinto, I., 2006. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture* 252:66-78. Rosenberg, G. & Ramus, J., 1982. Ecological Growth Strategies in the Seaweeds *Gracilariafoliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva Sp.* (Chlorophyceae): Soluble Nitrogen and Reserve Carbohydrates. *Marine Biology* 66:251-259.

Rubal, M., Veiga, P., Vieira, R. & Sousa-Pinto, I., 2011. Seasonal patterns of tidepool macroalgal assemblages in the North of Portugal. Consistence between species and functional group approaches. *Journal of Sea Research* 66:187–194.

Townsed, C.R., Begon, M & Harper, J.L., 2006. *Fundamentos em Ecologia*.

Underwood, A.J., Chapman, M.G., Richard, S.A. & Sage, M.B., 1997. *WinGmav5*. Institute of Marine Ecology, University of Sydney, Australia.

Viaroli, P., Naldi, M., Bondavalli, C. & Bencivelli, S., 1996. Growth of the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh in relation to biomass densities, internal nutrient pools and external nutrient supply in the Sacca di Goro lagoon (Northern Italy). *Hydrobiologia* 329:93-103.

Wallenstein, F.M., Peres, S.D., Xavier, E.D. & Neto, A.I., 2010. Phytobenthic communities of intertidal rock pools in the eastern islands of Azores and

their relation to position on shore and pool morphology. *Arquipelago. Life and Marine Sciences* 27:9-20.

Yong, Y.S., Yong, W.T.Y. & Anton, A., 2013. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-013-0022-7.

Anexos

6 Anexo 1.

Teste de SNK para os meios enriquecidos com Nitrato. Diferenças significativas.

GMAV (1997) - Licensed to Ana Cristina Costa Page 4

Rank	4 - 1	5 - 2	6 - 3	7 - 4	8 - 5	9 - 6	10 - 7
Cell	1 - 6	4 - 5	3 - 2	8 - 1	10 - 4	9 - 3	7 - 8
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rank	11 - 8						
Cell	11 - 10						
	NS						
Rank	3 - 1	4 - 2	5 - 3	6 - 4	7 - 5	8 - 6	9 - 7
Cell	2 - 6	1 - 5	4 - 2	3 - 1	8 - 4	10 - 3	9 - 8
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rank	10 - 8	11 - 9					
Cell	7 - 10	11 - 9					
	NS	NS					
Rank	2 - 1	3 - 2	4 - 3	5 - 4	6 - 5	7 - 6	8 - 7
Cell	5 - 6	2 - 5	1 - 2	4 - 1	3 - 4	8 - 3	10 - 8
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rank	9 - 8	10 - 9	11 - 10				
Cell	9 - 10	7 - 9	11 - 7				
	NS	NS	NS				

Factor : N (P) S.E. for comparison: 1
 6997
 Levels : 2

Cell :		1	2	3	4	5
Mean :		0				
8470	3					
1082	1					
8586	3					
6336	3					
2262						
S.E. :	0					
8785	0					
9390	0					
4727	0					
8671	0					
7102						
Cell :		6	7	8	9	10
Mean :		8				
5829	6					
5097	10					
0999	9					
3776	10					
7803						
S.E. :	2					
8062	1					
5082	2					
5750	2					
1895	2					
7304						
Cell :		11				
Mean :	17					
4963						

continued...

7 Anexo 2.

Teste de SNK para os meios enriquecidos com Fosfato. Diferenças significativas.

```

GMAV (1997) - Licensed to Ana Cristina Costa
Page 2

0949      5
9475      5
8330      6
3558
S.E.      :      1
0517      0
3969      1
0028      1
1135      0
8855

Cell      :      6
Mean      :      6
2007
S.E.      :      0
5311

Rank      6 - 1
Cell      5 - 4
          NS

Rank      5 - 1      6 - 2
Cell      1 - 4      5 - 3
          NS      NS

Rank      4 - 1      5 - 2      6 - 3
Cell      6 - 4      1 - 3      5 - 2
          NS      NS      NS

Rank      3 - 1      4 - 2      5 - 3      6 - 4
Cell      2 - 4      6 - 3      1 - 2      5 - 6
          NS      NS      NS      NS

Rank      2 - 1      3 - 2      4 - 3      5 - 4      6 - 5
Cell      3 - 4      2 - 3      6 - 2      1 - 6      5 - 1
          NS      NS      NS      NS      NS

Factor : P( N)      S.E. for comparison: 2
7080
Levels :      2

Cell      :
Mean      :      11      1      2      3      4      5
5748      18
8674      24
5105      28
1016      16
3738
S.E.      :      1
8842      4
8159      5
7881      7
6793      4
1605

Cell      :      6
Mean      :      18
0582
S.E.      :      4
4402

```

continued...

Rank 6 - 1
 Cell 4 - 1

Rank 5 - 1 6 - 2
 Cell 3 - 1 4 - 5
 * *

Rank 4 - 1 5 - 2 6 - 3
 Cell 2 - 1 3 - 5 4 - 6
 NS NS NS

Rank 3 - 1 4 - 2 5 - 3 6 - 4
 Cell 6 - 1 2 - 5 3 - 6 4 - 2
 NS NS NS NS

Rank 2 - 1 3 - 2 4 - 3 5 - 4 6 - 5
 Cell 5 - 1 6 - 5 2 - 6 3 - 2 4 - 3
 NS NS NS NS NS

Factor : N S.E. for comparison : 1
 1055

Levels : -
 Cell : 1 2
 Mean : 6
 1288 19
 5811
 S.E. : 0
 3403 2
 1162

Rank 2 - 1
 Cell 2 - 1

Factor : CX(P X N) S.E. for comparison: 6
 7823

Levels : 1 1
 Cell : 1 2 3
 Mean : 8
 8882 5
 5954 4
 5386
 S.E. : 2
 3514 0
 7809 1
 4099

Rank 3 - 1
 Cell 1 - 3
 NS

Rank 2 - 1 3 - 2
 Cell 2 - 3 1 - 2
 NS NS

Factor : CX(P X N) S.E. for comparison: 6

continued...