



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE OCEANOGRAFIA

Kely Paula Salvi

sistemas de tratamento de águas residuais baseados em algas

Florianópolis

2020

Kely Paula Salvi

Sistemas de tratamento de águas residuais baseados em algas

Dissertação submetida ao Programa de Oceanografia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Oceanografia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

Coorientador: Dr. Eduardo Oliveira Bastos

Florianópolis

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

SALVI, KELY PAULA
SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS BASEADOS EM
ALGAS / KELY PAULA SALVI ; orientador, LEONARDO RUI
RÖRIG, coorientador, EDUARDO DE OLIVEIRA BASTOS, 2020.
73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

I. Oceanografia. II. Tapetes Algae Biofiltrantes, Ulva
obnoi, Biorremediação, Produção de biomassa. . I. RÖRIG,
LEONARDO RUI . II. DE OLIVEIRA BASTOS, EDUARDO . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Oceanografia. IV. Título.

Kely Paula Salvi

Sistemas de tratamento de águas residuais baseados em algas

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr.(a) Kalina Manabe Brauko

Instituição UFSC

Prof.(a) Jurandir Pereira Filho, Dr.

Instituição UNIVALI

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em oceanografia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Leonardo Rubi Rörig, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2020

À saúde mental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meus professores do Laboratório Ficologia, José Bonomi Barufi, Paulo Horta e especialmente ao meu Orientador Leonardo Rubi Rorig, por me aceitar como aluna no meio ao caos dos últimos anos, por acreditar no trabalho e depositar confiança em minhas capacidades. Ao meu Coorientador Eduardo Bastos por todos os conhecimentos que em pouco tempo pude aprender e por me ensinar um pouco da sua capacidade de adaptação de qualquer coisa, vulgo gambiarras. A todos os meus colegas de LAFIC que foram e voltaram em cinco anos de laboratório, obrigada por todas as confraternizações, risadas e conhecimentos trocados durante este tempo. Em especial Thais e Luana, por todas as ajudas e amizade construída.

A minha Mãe e ao meu Pai, por tudo, tudo mesmo e por fazerem isso possível, cada um dá sua forma. Obrigada pelo suporte emocional e financeiro, por não me deixarem desistir, respeitando meus limites e sempre me incentivarem. A minha irmã e cunhado, sarninhas sempre dispostos a me animar, pelos eventuais cafés e chimas e pelo exemplo que vocês são pra mim. E aos meus avós, por sempre ajudarem como possível.

A todas as amigadas, que se fizeram presente no processo, a todas e todos que conheci e que de alguma forma esquentaram meu coração, me abraçaram e ouviram. As minha companheiras da casa da Maré, por me suportarem em vários períodos de correria e principalmente Joyjoy, por todos os abraçinhos, olhares, fofuras e sua sensibilidade encatadora, dividir a casinha com você tornou ela mais especial.

Aos meu bem Sasá, pela ajuda em absolutamente tudo desde experimentos até abraçar quando necessário, por me emprestar sua casa e especialmente por ser você todinha. E ao meu bem Didi, por construir um companheirismo comigo, por me abraçar quando precisava e me incentivar a me conhecer e reconhecer todas as ondas como fenômenos independentes de mim, por ressignificar muitas palavras, por ótimos debates e por me apresentar um caminho de liberdade e independência dentro de uma cocada.

Meu muito e eterno obrigada, a todos que fizeram isso possível. Minha admiração por cada um de vocês é enorme e engrandece o coração.

Um enorme desagrado a todos que de alguma forma foram a favor ao processo de sucateamento da educação, corte de salário dos professores, corte de bolsas e investimentos das universidades e órgãos de pesquisa. Um

desagrado ao processo cruel que se tornou a academia, à exigência desumanas de produtividade em que transforma conhecimento em mercadoria. É um desagrado à falta de reconhecimento da categoria de trabalho que são estudante/ pesquisador hoje no Brasil.

Diego não conhecia o mar. O pai, Santiago Kovadloff, levou-o para que descobrisse o mar. Viajaram para o Sul. Ele, o mar, estava do outro lado das dunas altas, esperando. Quando o menino e o pai enfim alcançaram aquelas alturas de areia, depois de muito caminhar, o mar estava na frente de seus olhos. E foi tanta a imensidão do mar, e tanto seu fulgor, que o menino ficou mudo de beleza. E quando finalmente conseguiu falar, tremendo, gaguejando, pediu ao pai: — *Me ajuda a olhar!*

O sistema:

Com uma das mãos rouba o que com a outra empresta.

Suas vítimas:

Quanto mais pagam, mais devem.

Quanto mais recebem, menos têm.

Quanto mais vendem, menos compram.

RESUMO

A poluição dos corpos d'água pela descarga de águas residuais e o crescimento urbano desordenado aumentou nos últimos anos, levando ao aumento da disponibilidade de nutrientes. A biorremediação de efluentes e águas contaminadas é uma alternativa para a recuperação ambiental através da manipulação de organismos vivos, incluindo as algas, como importantes agentes de transformação de poluentes. Dentre os sistemas de remoção de nutrientes, os *Algal Turf Scrubbers* (ATS), ou Tapetes Algais Biofiltrantes (TAP) apresentam resultados promissores. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o desempenho de sistemas de biorremediação baseados em algas. Assim, no primeiro capítulo, apresentamos um ATS em escala piloto projetado para avaliar o desenvolvimento de algas e a respectiva eficiência de biorremediação usando quatro substratos diferentes para fixação de algas, dois de origem natural (*Luffa cylindrica* e *Corchorus capsularis*) e dois sintéticos (Nylon e PVC). A partir dos resultados, é possível inferir que os substratos sintéticos são mais recomendados para o desenvolvimento da comunidade. A sucessão de espécies ocorrida em todos os experimentos foi semelhante à encontrada na literatura. A eficiência de remoção não correspondeu à encontrada na literatura, com algumas interferências nos dados de nutrientes durante os experimentos. No segundo capítulo, uma adaptação do sistema do primeiro capítulo, chamada Mini-ATS, foi desenvolvida para o cultivo de *Ulva ohnoi*, com o objetivo de utilizar o tapete algal formado para a biorremediação e produção de biomassa. Para tanto, foram testados dois substratos e dois regimes de circulação de água, visando o melhor assentamento, fixação e crescimento das células reprodutivas de *U. ohnoi*. Quatro concentrações de amônio e fosfato foram usadas para avaliar a eficiência de remoção do sistema em duas idades de desenvolvimento de turfa de algas. Como resultado, observou-se que o fluxo turbulento associado ao Nylon apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento do tapete de algas. Para o amônio, a eficiência de remoção foi de 100% para todos os tratamentos. No entanto, houve uma redução na eficiência da remoção do fosfato aos 47 dias, principalmente nos tratamentos com maiores concentrações. Sobre as velocidades de remoção, foi possível verificar uma redução significativa entre 18 e 47 dias para o fosfato. O procedimento de plântulas de *Ulva* mostrou ser uma boa opção para produzir um ATS inespecífico eficiente para a biorremediação e produção de biomassa.

Palavras-chave: Tapetes Algais Biofiltrantes, *Ulva ohnoi*, Biorremediação, Produção de biomassa.

ABSTRACT

Pollution of water bodies by the discharge of wastewater and disordered urban growth has increased in recent years, leading to increased availability of nutrients. The bioremediation of effluents and contaminated waters is an alternative for environmental recovery through the manipulation of living organisms, including algae, as important pollutant transfer agents. Among the nutrient removal systems, Algal Turf Scrubbers (ATS) present promising results. The present work had as general objective to evaluate the performance of bioremediation systems based on algae. Thus, in the first chapter we present a pilot scale ATS designed to evaluate algal development and respective bioremediation efficiency using four different substrates for algal attachment, two of natural origin (*Luffa cylindrica* and *Corchorus capsularis*) and two synthetic (Nylon and PVC). From the results it was possible to infer that synthetic substrates are most recommended for community development. The species succession occurred in all experiments was similar to that found in the literature. The removal efficiency was low and did not correspond to that found in the literature, probably due to the low nutrient concentrations of the effluent and some interferences in nutrients data during the experiments. In the second chapter, an adaptation of the system of the first chapter, called Mini-ATS, was developed for the cultivation of *Ulva ohnoi*, in order to use the turf formed for bioremediation and biomass production. For that, two substrates and two water circulation regimes were tested aiming the best settlement, attachment and growth of *U. ohnoi* reproductive cells. Four concentrations of ammonium and phosphate were used to evaluate the removal efficiency of the system at two ages of algae turf development. As a result, it was observed that the turbulent flow together with Nylon presented the best results for the development of the algae turf. For ammonium, the removal efficiency was 100% for all treatments. However, there was a reduction in the efficiency of phosphate removal at 47 days, especially in treatments with higher concentrations. About removal speeds, it was possible to verify a significant reduction between 18 and 47 days for phosphates. The *Ulva* seedling procedure showed to be a good option to produce an efficient unispecific ATS for bioremediation and biomass production.

Keywords: Algal Turf Scrubber, *Ulva ohnoi*, bioremediation, biomass production.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1. Localização da área de estudo. a) Ilha de Santa Catarina, b) Estação de Maricultura Professor Elpídio Baltrame - UFSC, e c) localização das rampas e lagoa de decantação de estudo, indicados pelas setas Fonte: Itokazu, 2018 (Google Earth).....10

Figura 2. Vista superior do Sistema Algal Turf Scrubber. O ponto a) é localizada a casa de bombas e sistema de distribuição de água; b) são as rampas onde se fixam os substratos; c) caixas de água para regime fechado. O sentido do fluxo ocorre na direção de a) para c).....12

Figura 3. Fluxograma da sequencia de trabalho e análises realizadas nos período experimental com sistema fechado..... 14

Figura 4. Composição específica (C.E.) do tapete de algas e o processo de sucessão. Imagens (a) e (b) referente ao dia 17 dos experimentos de malhas orgânicas e 19 de início dos experimentos de malhas sintéticas, diatomáceas penadas; (c) aparecimento de diatomáceas em cadeia e (d) a predominância de algas filamentosas..... 16

Figura 5. Sequência de cobertura do substrato na parte inferior da rampa para cada experimento. Imagens a, b, e, referem-se ao Nylon; b, d, f, referente ao PVC; g, i à Juta; h e j à Bucha. As linhas correspondem a idade do tapete, sendo a, b referente aos 19 dias; c, d aos 24 dias; e, f aos 32 dias; g, h aos 17 dias; i, j aos 24 dias. Os 25 dias para orgânicos não foram representados pois a Bucha foi retirada do experimento e não houve diferenças na comunidade para Juta.....18

Figura 6. Pesos para cada substrato em cada um dos experimentos em g cm⁻². A esquerda, os tratamentos de malhas sintéticas e a direita as malhas orgânicas. O peso equivale às g de algas, descontando o peso da malha. A bucha foi retirada aos 24 dias devido à perda de estrutura da malha 19

Figura 7. Evolução das concentrações de nutrientes nos TAB ao longo do período de 24 h para malhas sintéticas em cada um dos experimentos. Gráficos (a) Nylon em 19 dias; (b) PVC em 19 dias; (c) Nylon 24 dias; (d) PVC em 24 dias; (e) Nylon em 32 dias; (f) PVC em 32 dias; (g) Bucha em 17 dias; (h) Juta em 17 dias; (i) Bucha em 24 dias; (j) Juta em 24 dias e (k) Juta em 25 dias.....22

Capítulo 2:

Figure 1. Schematic drawing of the mini-ATS system. Left, top view, where “x” is 13 cm wide and “y” 60 cm long, ramp made in glass, the arrow indicating water flow. The pump (a), push the water on the resivor (b) through the hose (d), back to the beginning of ramp. Right, side view with “α” being 10% slope, and PVC structure (c) that support the sistem.....31

Figure 2. Neighbor-Joining distance map (NJ) for UPA marker sequences. Bootstrap values (1000 replicates) are represented in the branches, only values above 70 have been plotted. The strings available on GenBank and used in the analysis are followed by the access number. As an external

group, the sequence of <i>Codium cylindricum</i> was used. The scale represents the number of substitutions.....	35
Figure 3. Coverage by <i>Ulva ohnoi</i> seedling in nylon substrate and stagnant flow (A), jute substrate and stagnant flow (B), nylon substrate and continuous flow (C), and jute substrate and continuous flow (D) cultivated in the TAB system for 7 days.....	36
Figure 4. Coverage rate (%) by <i>Ulva ohnoi</i> seedling in three substrate sectors (Upper, middle and final) of two substrate (jute and nylon) and two water flow conditions (stagnant and continuous) cultivated in the ATS systems. Different letters indicate significant differences according to ANOVA and SNK post hoc test ($p < 0.05$). The data represents the means \pm SD for $n = 3$	38
Figure 5. Changes in concentrations of phosphate and ammonium in the ATS systems during 1440 min of incubation. A- 18 days of ATS maturation and B - 47 days of ATS maturation. The data represents the means \pm SD for $n = 3$	39
Figure 6. Removal efficiency (%) for each time (0, 15, 30, 60, 120, 360 and 1440 min) of incubation with P-PO ₄ -3 (1.9, 3.8, 5.8, 8.8 mg L ⁻¹) and N-NH ₄ - (0.7, 1.5, 2.2, 3.3 mg L ⁻¹) by <i>Ulva ohnoi</i> with two maturation time 18 (A and C) and 47 days (B e D) in the TAB system. The data represents the means \pm SD for $n = 3$	40
Figure 7. Growth rate (Gr % day ⁻¹) of <i>U. ohnoi</i> over time of experiment. TI-1 = 10-24 days, TI-2 = 24-31 days, TI-3 = 31-39 days, TI-4 = 39-48 days. Different letters indicate significant differences according to ANOVA and SNK post hoc test ($p < 0.05$). The data represents the means \pm SD for $n = 3$. TAB equal to ATS.....	41
Figure 8. Ulvan yield (%) extracted from <i>Ulva ohnoi</i> biomass. The data represents the means \pm SD for $n = 3$	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Eficiência de remoção de cada nutriente. Percentual de absorção de nutrientes em 24h. Foram desconsiderados os valores negativos de eficiência, equivalentes a zero.....23
- Table 2. Results of one-way and two-way ANOVA for different parameters determined in *Ulva ohnoi* cultivated in the TAB system. Significant effects ($p < 0.05$) are indicated in bold.....37
- Table 3. Uptake velocity ($\text{mg NH}_4^- / \text{PO}_4\text{-3 g (dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$) of phosphate and ammonium after 15, 30, 60, 120, 240 and 1440 minutes by *Ulva ohnoi* with two maturation time (18 and 47 days) in the ATS system. Different letters indicate significant differences according to factorial ANOVA and SNK post hoc test ($p < 0.05$). The data represents the means \pm SD for $n = 3$41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 CAPÍTULO 1.....	7
2.1 Introdução.....	8
2.2 Objetivo Geral.....	10
2.2.1Objetivos Específicos.....	10
2.3 Materiais E Métodos.....	10
2.3.1 Área de Estudo.....	10
2.3.2 Tapete Algal Biofiltrante.....	11
2.3.3 Substratos.....	13
2.3.4 Desenho experimental.....	13
2.4 Resultados e Discussão.....	15
2.4.1 Comportamento do Tapete.....	15
2.4.2 Remoção de Nutrientes e Eficiência.....	20
2.5 Conclusão.....	24
3 CAPÍTULO 2	25
3.1 Introduction.....	26
3.2 Materials and Methods.....	27
3.2.1 Algal biomass collection.....	27
.....	28
3.2.2 DNA extraction, amplification, sequencing and alignment.....	28
3.2.3 Reproduction induction.....	30
3.2.4 Algal Turf Scrubber (ATS)	30
3.2.5 Influence of substrate type and water flow conditions on the attachment of <i>U. ohnoi</i> seedlings.....	31
3.2.6 Effects of the ATS maturation time on phosphate and ammonium removal kinetics.....	32
3.3 Results.....	35
3.3.2 Coverage rate.....	36
3.3.3 Removal pattern and efficiency	38
3.3.4 Uptake velocity.....	40
3.3.6 Ulvan yield.....	42
3.4 Discussion.....	43
3.5 Conclusions.....	46

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
-----------------------------	----

1 INTRODUÇÃO GERAL

A água é essencial para a vida e para desenvolvimento humano. A preocupação com a disponibilidade deste recurso, limpo e de qualidade, é cada vez maior, tendo em vista as diversas pressões que sofre pelas atividades antrópicas. O desenvolvimento industrial é dependente de recursos naturais esgotáveis e a poluição consequente destas atividades, faz com que seja necessária a criação de formas de recuperação dos estoques naturais (FOLKE, 1991).

As águas residuais de indústrias, agricultura, pecuária, aquicultura e vindas de tratamento de efluentes municipais carregam grandes quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos, além de metais tóxicos, pesticidas, medicamentos e outros xenobióticos. A maioria dos sistemas de tratamento de efluentes não é habilitada para depurar com eficiência toda a carga destes poluentes (BAWIEC, 2019). Em consequência, esta água residual contaminada chega aos rios, lagos e mares, interagindo com as componentes do ambiente e causando severas alterações ambientais.

Os ecossistemas naturalmente são capazes de reciclar parte dos poluentes, através de absorção e transformação por organismos e sedimentos. Contudo, as grandes entradas ocasionadas pelas atividades antrópicas sobrecarregam-nos, alterando seus ciclos. O aumento da concentração de nutrientes, principalmente em formas de Nitrogênio e Fósforo, para além das condições naturais é denominado eutrofização. Esta é a poluição mais recorrente ao longo do globo nas zonas costeiras (NIXON, 1995).

Os nutrientes orgânicos e inorgânicos são essenciais para processos metabólicos dos organismos. A absorção de formas de nitrogênio (nitrito $N-NO_2$, nitrato $N-NO_3$ e amônio $N-NH_4$) está ligada a formação de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, enzimas, pigmentos além de outros componentes fundamentais das células. Da mesma forma, o fosfato ($P-PO_4^{-3}$) entra como elemento essencial na transferência de energia, durante o processo de fotossíntese, além de formar a fosfatase, ácidos nucleicos, nucleotídeos, enzimas e fosfolipídios (WHITTON et al., 2016).

O aumento de áreas eutrofizadas tem contribuído com a maior frequência de florações algais. As florações ou *blooms*, são superpopulações de uma ou poucas espécies como resultado da disponibilidade excessiva de nutrientes. Dentre as florações mais conhecidas estão as marés vermelhas, formadas por dinoflagelados e

cianobactérias, geralmente tóxicas; as verdes de *Ulva* spp., de ocorrência frequente em mares na China e Japão e as douradas de *Sargassum* spp., cada vez mais frequentes no Caribe e golfo do México. As consequências desses fenômenos englobam perdas ecológicas na diversidade e riqueza de espécies, hipoxia e anoxia, além de enormes prejuízos socioeconômicos (GAO et al., 2017a).

A crescente preocupação em relação aos problemas ambientais incentiva as buscas por alternativas mais sustentáveis e renováveis. Sabendo que alguns organismos são capazes de remover e transformar os poluentes através do seu metabolismo, aumenta o interesse nos usos em diferentes formas, de novas tecnologias para restauração ambiental com base em organismos vivos (CHUNG et al., 2002).

As técnicas de engenharia ecológica surgiram do equacionamento e controle de processos biológicos por técnicas de engenharia. Descrita inicialmente como a manipulação ambiental de energia para controlar sistemas em que a energia principal é proveniente de fontes naturais (ODUM et. al., 1963), vem ganhando espaço por trazer benefícios mútuos entre os pilares da sustentabilidade (BERGEN, BOLTON, FRIDLEY, 2001). Dentro desta área do conhecimento se encontra a Biorremediação, definida como um conjunto de técnicas e processos direcionados à imobilização e redução de substâncias nocivas através da manipulação de organismos, normalmente plantas e bactérias, até os níveis permitidos pela legislação (GAYLARDE, BELLINASSO, MANFIO, 2005).

Existem diferentes formas de utilização dos organismos na busca por ambientes mais saudáveis. Dentre os métodos mais conhecidos estão os *wetlands* construídos: sistemas que utilizam diferentes espécies de macrófitas aquáticas de forma integrada para filtrar eficientemente a água, transformando e/ou retendo poluentes. Estes sistemas apresentam desvantagens quanto a área necessária em comparação a outros, como por exemplo sistemas de biofilmes de algas (CRAGGS et al., 1996; HILLMAN, JR, CULLEY, 2012; TANNER, 1996).

Baseado nos princípios de engenharia ecológica e na eficiência de algas para remoção de poluição, Adey (1983) propôs um destes sistemas chamados então de *Algae Turf Scrubber*, traduzido livremente para Tapetes Algais Biofiltrantes (TAB). Por definição, este é um método de produção de biomassa algal a partir de dióxido de carbono, nutrientes e outros poluentes. A partir da energia solar para fotossíntese e com o controle

de parâmetros de circulação e turbulência da água do sistema, otimiza-se o crescimento de organismos e o resíduo passa a ser tratado de forma natural, com potencial de geração de rentabilidade (ADEY et al., 2013; CRAGGS, 2001).

Diversos trabalhos vêm testando a funcionalidade do TAB em suas diferentes formas para o tratamento de diferentes efluentes e condições (PAQUETTE & PAQUETTE, 2018). Além disso, propondo seu uso como parte do processo de tratamento de águas residuais, como tratamento biológico terciário ou para biorremediação de corpos de águas impactados (ADEY, KANGAS, MULBRY, 2011). A melhoria da qualidade de água pelos sistemas TAB ainda foi demonstrada no polimento de esgoto doméstico (CRAGGS, 2001; POSADAS et al., 2013), efluentes industriais (MUÑOZ, KÖLLNER, GUIEYSSE, 2009) e Maricultura, utilizando o manejo de TAB em Cultivo Multitrófico Integrado e reduzindo o potencial poluidor da atividade (RAY, TERLIZZI, KANGAS, 2015).

Como possíveis parâmetros que alteram a produtividade desses sistemas podem-se elencar: natureza do ambiente e da água residual, o delineamento do sistema, inclinação, tamanho, padrão de circulação, complexidade e material do substrato. A adaptação da inclinação de 1% para 2%, ou até mesmo o uso de um substrato com microtopografias mais complexas, interferem em fatores como a turbulência, necessária para a adesão e crescimento de algumas espécies, redução das camadas limites celulares e aumento de trocas gasosas, que podem incrementar o volume final da biomassa produzida (ADEY et al., 2013; KARDEL, BLERSCH, CARRANO, 2018).

Uma das abordagens a ser investigada é a afinidade entre organismos e substratos de diferentes materiais, orgânicos e sintéticos, por exemplo. Alguns trabalhos demonstram a afinidade maior de moléculas em aderirem em materiais orgânicos, já que as vias sinalizadoras para a fixação dos organismos ocorrem de forma mais rápida, acelerando o processo de assentamento e formação do *turf* (BARROS, GONÇALVES, SIMÕES, 2019). Contudo, para algumas espécies a fixação de esporos é favorecida em superfícies hidrofóbicas, tais como superfícies de rochas (FINLAY et al., 2002).

Proteínas, carboidratos, lipídeos e uma gama de metabólitos secundários com diversas aplicações estão entre os produtos extraídos a partir da biomassa resultante do processo de biorremediação. A busca por esta fonte de produtos tem crescido, pois representam um aumento na viabilidade econômica dos processos de biorremediação (CAMERE & KARANA, 2018; MENETREZ, 2012).

O gênero *Ulva* faz parte do filo *Chlorophyta* e compreende diversas espécies de ampla plasticidade fenotípica. A principal característica é a formação da dupla camada de células que constituem um talo folioso de cor verde, podendo ou não desenvolver ramificações e um disco basal quando fixa (BRODIE et. al, 2007). A classificação de cada espécie se dá a partir de características como formato da lâmina, tipo de talo e de margem foliar. Contudo, na maioria dos casos, é necessário o suporte molecular para determinar a espécie (MELTON, GARCIA-SOTO, LOPEZ-BAUTISTA, 2016).

Ulva é um gênero cosmopolita, com espécies encontradas em zonas tropicais, subtropicais e polares e possui grande tolerância a ambientes com salinidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes variadas. Ocupa as regiões entre marés nos costões rochosos, onde desenvolve um disco basal para se fixar ao substrato (GUIRY & GUIRY, 2019). Também podem ser encontradas flutuando, normalmente em regiões com enriquecimento de nutrientes e menor turbulência. Por isso, é adaptável a variações diárias de temperatura, salinidade, dessecação, alta irradiação e embate de ondas. Estes fatores externos têm ligação direta à fisiologia e reprodução das algas (XIAO et al., 2016).

Apesar de sua morfologia ser simples, o ciclo de vida é bastante complexo. As algas possuem alternância de gerações isomórficas entre gametófito (n) e esporófito ($2n$), partenogênese ou reprodução assexuada por fragmentação onde um organismo pode desenvolver-se através de uma única célula. O tipo de reprodução é condicionado por fatores externos ambientais que favorecem ou não a junção de gametas (LØVLIE & BRYHNI, 1978). É quase impossível diferenciar um esporófito de um gametófito, sendo as células reprodutivas um indício da natureza do talo. Os propágulos unicelulares se distinguem pela quantidade de flagelos (2 em gametas e 4 em zoósporos ($2n$)) e fitotaxia (positiva em gametas e negativa em zoósporos) (RAVEN & EVERT, 2008).

Parâmetros como temperatura, fragmentação, salinidade, disponibilidade de nutrientes e luz e dessecação, nesta ordem de importância, influenciam na indução da reprodução. A combinação entre fragmentação e choque de temperatura gera os melhores resultados na indução, podendo aumentar até 48% a reprodução. O desenvolvimento de células reprodutivas pode ocorrer em qualquer parte de um talo vegetativo, preferencialmente em regiões periféricas, por isso com a fragmentação do talo, a superfície perimetral se amplia. O aumento da disponibilidade de nutrientes

também acelera a formação de esporos e gametas (GAO et al., 2017b). Ainda assim, temperatura aparece no topo das condicionantes tanto de crescimento, quanto de reprodução e germinação (LIU et al., 2013a).

Após liberadas, a fixação das células reprodutivas necessita de uma série de interações físico-químicas com a superfície de adesão, que são viáveis em até oito dias após sua liberação. A natureza da superfície, sua microtopografia e a presença de bactérias, podem acelerar o processo (CALLOW & CALLOW, 2011). A partir da fixação e da formação da célula basal, se inicia o desenvolvimento do talo vegetativo. Talos fragmentados, através de reprodução assexuada, não desenvolvem o apressório (FJELD, 1976).

As espécies de *Ulva* são r-estrategistas, de crescimento rápido e altas taxas de absorção de nutrientes. Quando em condições favoráveis atingem taxas de crescimento de 10-37% ao dia, acarretando muitas vezes em fenômenos como de marés verdes (ZHANG et al., 2011; LIU et al., 2013). Uma das maiores florações de *Ulva* já registradas no mundo ocorreu entre 2008-2012 no *Yellow Sea* na China. A floração neste período atingiu o tamanho de 600 km² e teve crescimento de 500 para um milhão de toneladas em dois meses. A junção entre fatores antrópicos de enriquecimento nutricional e fatores climáticos como aquecimento da água e ventos, favoreceu o desenvolvimento e permanência da floração (LIU et al., 2013b).

A preferência nutricional de *Ulva* spp. é a forma amoniacal de nitrogênio, que, dependendo do pH pode ser tóxica para muitas espécies, contudo é a forma mais absorvida por organismos aquáticos devido a sua facilidade de absorção e processamento intracelular. Por ser uma molécula menor exige menos energia para transporte e metabolização (LI et al., 2015). Devido a disponibilidade de nutrientes, é comum o aparecimento de *Ulva* spp. dentre outras algas em tanques de cultivo de camarões e peixes, o que muitas vezes acarreta problemas para os produtores. Sistemas de cultivos integrados têm surgido como uma alternativa tanto para a produção de biomassa quanto para tratamento dos efluentes (SHPIGEL et al., 2019). Diversos estudos já comprovaram a eficiência de remoção de até 97% de nutrientes por *Ulva* spp., quando em cultivo integrado (GUTTMAN et al., 2018). Outros ainda, testaram a utilização de pequenos “clusters” de ulva, que ficam em suspensão entre os tanques, facilitando assim seu manejo (HIRAOKA & OKA, 2008).

Outras formas de cultivo monoespecífico de *Ulva* são desenvolvidos ao redor do mundo. Dentre os métodos mais usuais estão o sistema em corda ou artefatos flutuantes *inshore* e *offshore*, onde a alga se fixa e desenvolve na superfície desses objetos e depois é coletada (SAHOO, DINABANDHU, YARISH, 2005) Outra forma são os sistemas em terra, tais como tanques, que são mais controlados o que facilita o cultivo, contudo se tornam mais caros devido a necessidade de estruturas (HIRAOKA & OKA, 2008). Independente da escolha do cultivo, *Ulva* apresenta vantagens pelo rápido crescimento, alta densidade e facilidade de adaptação, entretanto desvantagens como a dificuldade de identificação, a incerteza do estágio de vida e a instabilidade no seu crescimento a longo prazo, dificultam a sua domesticação, exigindo um maior controle sobre os parâmetros (GAO, 2016).

Historicamente a biomassa algal é utilizada para alimentação, sendo uma importante fonte de proteína em muitas culturas. Com o desenvolvimento da tecnologia a busca e utilização de biomassa de algas e bioprospecção de moléculas tem crescido cada vez mais. As inúmeras aplicações e possibilidades de refinarias ampliam o interesse comercial e formas de aplicação para além da biorremediação (MATA et al., 2016).

O uso da biomassa como biofertilizante é uma boa alternativa pois não necessita muito processamento e seu valor comercial é grande. A composição das algas contribui como estimuladores de crescimento e proteção contra doenças em plantas e ainda, em alguns casos, aumentam o valor nutricional do cultivo (HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2014; KUMARI et al., 2014). Além disso, é utilizada como base alimentar para a indústria animal (GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2016) como fonte de lipídeos para biocombustíveis (CHEN & QIU, 2014); e como fonte de carragenanas, alginatos e ágar, (KRAAN, 2012), todos utilizados em produtos comercializados.

Ulva spp. produzem várias substâncias valiosas, tais como a ulvana, que é uma fonte de açúcares para a síntese de produtos químicos finos (LAHAYE & RAY, 1996). Uma das cadeias principais, a ramnose é usada como precursor para a síntese de compostos aromáticos. Pode ser utilizada na indústria farmacêutica como carreador de medicamentos, por facilitar a absorção de certas moléculas (LAHAYE & ROBIC, 2007) e como defensivo em plantas terrestres (BORSATO, DI PIERO, STADNIK, 2010; PAULERT et al., 2009). Além disso, a propriedade de troca iônica da ulvana favorece o uso como

bioindicadores para monitorar a poluição por metais pesados em águas costeiras (NAGAOKA et al., 1999).

Sabendo disso, o presente trabalho utiliza dos conhecimentos de engenharia ecológica unindo as vantagens fisiológicas das algas para desenvolvimento de sistemas de biorremediação unidos à produção de biomassa e biocompostos. O primeiro capítulo traz a utilização de uma unidade TAB (ATS) desenvolvido a partir de uma metodologia já aplicada em outro trabalho, avaliando diferentes substratos para crescimento e eficiência de remoção pelo tapete de algas. No capítulo dois, é apresentada uma adaptação do primeiro sistema, desta vez, com foco em produção de biomassa de *Ulva ohnoi* junto a eficiência de biorremediação.

SISTEMA DE TAPETES ALGAIS BIOFILTRANTES PARA O TRATAMENTO DE
EFLUENTES DE MARICULTURA:

Uma comparação entre diferentes substratos

2.1 Introdução

O aumento da concentração de nutrientes em corpos hídricos é um dos maiores problemas enfrentados nas zonas costeiras, levando a um desequilíbrio ecológico. Este fenômeno é denominado eutrofização e forma grandes florações de algas, o que acarreta problemas estéticos, mau cheiro, hipoxia e anoxia e condições insalubres, podendo gerar grandes perdas econômicas. Atividades como a aquicultura, aceleram o processo de enriquecimento de corpos de água, já que produzem grandes quantidades de efluentes carregados de compostos orgânicos e inorgânicos como amônio, nitrato, nitrito e fosfato (EDWARDS, 2015; OTTINGER, CLAUSS, KUENZER, 2016).

As algas são organismos capazes de absorver com eficiência os nutrientes a partir do seu metabolismo. Estes organismos são ideais em sistemas de biorremediação, pelo seu crescimento rápido e altas taxas de absorção de poluentes quando comparados às plantas, por exemplo (ABDEL-RAOUF, AL-HOMAIDAN, IBRAHEEM, 2012). Com o desenvolvimento da tecnologia, foi possível também a criação de sistemas de biorremediação baseados em biofilmes de algas, por favorecer ainda mais o crescimento dos organismos através da otimização do metabolismo por manipulação.

Os Algae Turf Scrubber, traduzido livremente para Tapetes Algais Biofiltrantes (TAB) são por definição sistemas de tratamento de água para redução e eliminação de poluição e produção de biomassa de algas, onde a água poluída flui por rampas e a adesão e crescimento algal são favorecidos (ADEY et al., 2013; ADEY, LUCKETT, SMITH, 1996; CRAGGS, 2001). Existem diferentes formas de design do sistema, para diferentes fins. Mudanças simples, como turbulência, topografia e material do substrato favorecem o desenvolvimento da assembleia de algas. Além disso, o substrato natural pode acelerar o processo de sucessão da assembleia de algas, visto que os sinais químicos de interação entre organismo e substratos são da mesma natureza orgânica (EKONGA, 2019).

Mesmo com múltiplos estudos desenvolvidos neste meio, abordando perspectivas diferentes sobre um sistema TAB, cada qual se comporta de maneira distinta, devido ao efluente tratado e às particularidades de cada sistema (BERNER, HEIMANN, SHEEHAN, 2015). O ecossistema em que é inserido, suas variações bióticas e abióticas, influenciam na otimização do tratamento em questão, exigindo acompanhamento dos parâmetros, para então entender e aprimorar seus usos. Sabendo disso, o presente trabalho visa aumentar o conhecimento sobre os tapetes biofiltrantes testando a eficiência de remoção

de nutrientes por tapetes algais crescidos sobre substratos artificiais de baixo custo (nylon e PVC expandido) e substratos orgânicos biodegradáveis (bucha e juta). A versatilidade do sistema assim como o barateamento dos custos de instalação, pode ser um incentivo para a expansão do uso do sistema em pequenas empresas ou o uso doméstico. A hipótese de trabalho foi que os substratos orgânicos favorecem um crescimento mais rápido e uma maior eficiência de remoção de nutrientes pelo tapete formado.

2.2 Objetivo Geral

Avaliar um sistema TAB em rampas de fluxo contínuo, quanto a sua capacidade de biorremediação com uso de substratos de material e estrutura distinta.

2.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho de diferentes tipos de malhas, artificiais de baixo custo e orgânicas biodegradáveis como substratos para formação do tapete de algas;
- Avaliar a capacidade de remoção de nutrientes em diferentes períodos de maturação do tapete para cada um dos substratos;
- Determinar a eficiência de remoção de nutrientes do biofilme no TAB;

2.3 Materiais E Métodos

2.3.1 Área de Estudo

O trabalho foi desenvolvido em uma lagoa de decantação da Estação de Maricultura Professor Elpídio Beltrame - UFSC (27°35'03.1"S; 48°26'31.8"W). Estas lagoas recebem águas ricas em matéria orgânica e nutrientes oriundas de cultivos dos laboratórios da unidade, sendo eles: Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR), Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) e Laboratório de Cultivo de Algas (LCA).

A lagoa da qual se retirou o efluente para tratamento (Figura 1) tem variações médias de salinidade entre 18 e 25. Possui área de aproximadamente 2.500 m² e um volume total aproximado de 2.000 m³ (Earth 2018), com variações ao longo do ano devido

a flutuações da Lagoa da Conceição adjacente, e ao despejo de efluentes nos períodos de cultivo.

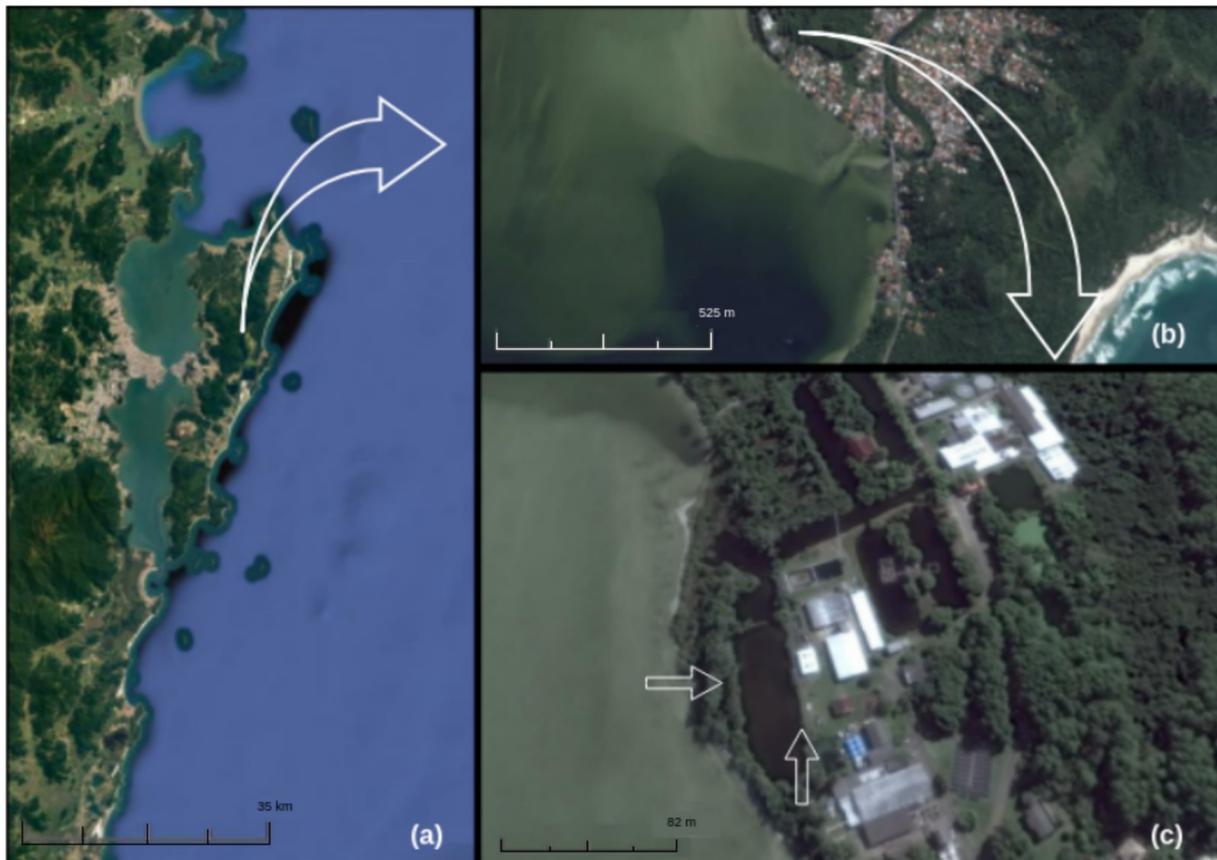


Figura 1. Localização da área de estudo. a) Ilha de Santa Catarina, b) Estação de Maricultura Professor Elpídio Baltrame - UFSC, e c) localização das rampas e lagoa de decantação de estudo, indicados pelas setas Fonte: Itokazu, 2018 (Google Earth).

2.3.2 Tapete Algal Biofiltrante

O sistema de estudo foi desenvolvido por Itokazu (2018), baseado na tecnologia de *Algal Turf Scrubbers* em rampas inclinadas. A estrutura conta com um sistema de duas rampas de 4 m de comprimento e 0,4 m de largura, fabricadas em fibra de vidro com bases de madeira posicionadas para atingir inclinação de 1% ao longo do seu comprimento. No início das rampas se encontra a casa de bombas, com adaptação para uma e duas bombas, onde é feita a distribuição de água e ao final existe uma calha para captação e destinação.



Figura 2. Vista superior do Sistema Algal Turf Scrubber. O ponto a) é localizada a casa de bombas e sistema de distribuição de água; b) são as rampas onde se fixam os substratos; c) caixas de água para regime fechado. O sentido do fluxo ocorre na direção de a) para c).

O sistema opera em dois regimes: aberto e fechado. No regime aberto, a água é sugada diretamente da lagoa através de um cano PVC com ponteira e filtro, distribuída igualmente entre as duas rampas, passando pelos substratos e retornando para a lagoa. A utilização deste regime é essencialmente para processo de maturação dos substratos, onde a comunidade de organismos da lagoa é transferida e naturalmente selecionada para a formação do tapete algal. No sistema fechado ou recirculação, a água da lagoa é transferida para duas caixas de água de 100 L, localizadas ao final de cada uma das rampas, que passam a circular de forma independente. É sob este regime que são realizados os experimentos de remoção de nutrientes.

Na operação em regime aberto foi utilizada uma bomba periférica de 1 CV que sugava a água diretamente da lagoa distribuindo-a equitativamente sobre as duas rampas. Na operação em regime fechado foram utilizadas duas bombas periféricas de 0,5 CV, uma para cada rampa. Os modelos utilizados foram Motobomba Periférica Eletroplas, modelo ICS50 de 1 e $\frac{1}{2}$ CV, bivolt, fabricada em ferro e aço inox, com vazão máxima de $1,8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ e 7 m de declive.

2.3.3 Substratos

Os substratos utilizados no presente trabalho foram:

- *Luffa cylindrica*, popularmente conhecida como bucha vegetal, orgânica e sem qualquer tratamento químico. Este material tem uma disposição bastante complexa de fibras denotando caráter 3D ao substrato com elevada superfície de contato e considerável porosidade;
- *Corchorus capsularis*, comercializada como malha de Juta. Este material possui trama de 3 x 3 mm, com ranhuras naturais que acarretam alta porosidade;
- Nylon, comercializado como “rede de mosquito”. Este material possui trama de 1 a 2 mm e ausência de porosidade;
- PVC expandido (policloreto de vinila), encontrada no mercado como “tapete antiderrapante”. Este material apresenta trama de 2mm e por ser expandido possui conformação tridimensional. Detém uma alta porosidade interna, mas baixa porosidade externa;

2.3.4 Desenho experimental

Os experimentos de substratos sintéticos foram conduzidos entre novembro e dezembro de 2018, em um período de 32 dias de maturação com temperatura média do ar entre 23 a 27 °C. Para as malhas orgânicas, entre abril e maio de 2019, com 25 dias de maturação e temperatura média entre 22 a 25 °C. Em cada período foram realizados três experimentos de remoção de nutrientes. O sistema foi configurado com inclinação de 1%, com rampas em regime aberto para maturação do tapete de algas. Na água, parâmetros de clorofila *a in vivo*, ficocianina *in vivo*, pH e temperatura, além de coletas da malha para análise de composição específica, foram acompanhados durante este período. Abaixo é apresentado o fluxograma do desenvolvimento do trabalho (Figura 3).

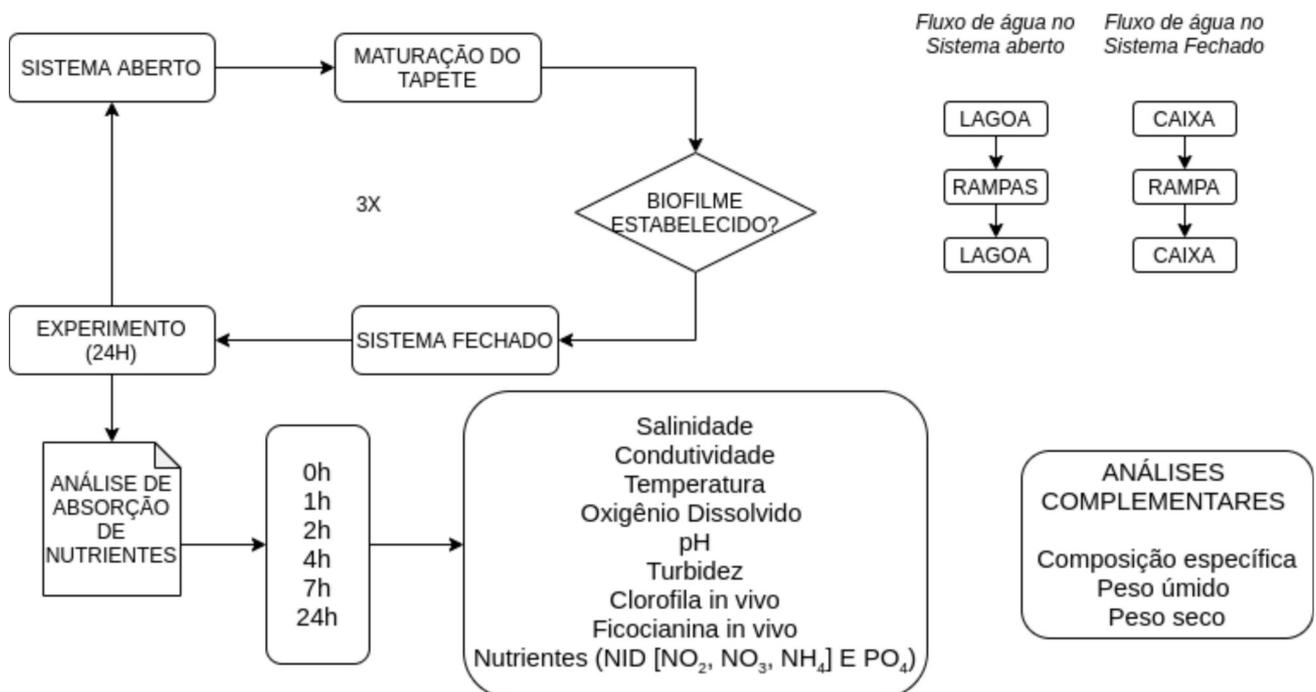


Figura 3. Fluxograma da sequência de trabalho e análises realizadas nos período experimental com sistema fechado.

Uma vez estabelecido o tapete algal, os experimentos de remoção de nutrientes aconteceram com o sistema fechado, recirculando ao longo de 24h um volume de 100 L de água da lagoa de decantação a partir das caixas de água. Foram também acompanhados temperatura, clorofila e ficocianina *in vivo* (Fluorímetro manual Turner), oxigênio dissolvido (Oxímetro YSI 5500), salinidade (Refratômetro), pH e turbidez, juntamente com coletas de água ao longo do período, nos tempos 0h (Zero), 1h, 2h, 4h, 7h e 24h.

As amostras de água foram filtradas e separadas em alíquotas em tubos falcon estéreis com volume exato para determinação das concentrações de Fósforo ($P-PO_4^{3-}$) e NID resultante da soma das formas nitrogenadas (Nitrato ($N-NO_3^-$), Nitrito ($N-NO_2^-$) e Amônio ($N-NH_4^+$)) utilizando o método colorimétrico conforme Grasshoff (1983). Todas as amostras foram mantidas congeladas em freezer à $-4\text{ }^\circ\text{C}$ até a análise no Laboratório de Oceanografia Química na Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e no Núcleo de Estudos do Mar (NEMAR) da UFSC. A eficiência de absorção foi calculada utilizando a

fórmula: $E.A.(%) = 100 - [(C_f \times 100) \div C_i]$, onde C_i representa a concentração inicial de nutrientes e C_f representa a concentração ao fim das 24h.

Ao final de cada experimento foram retirados dois quadrados de 2 x 2 de malha no início, meio e final da rampa, um para análise da composição específica (C.E.) e outro para massa seca e úmida. Para análise de composição, as porções de substratos foram raspadas, retirando todos os organismos aderidos com auxílio de espátula e água salgada, e o conteúdo final depositado em falcons com formol 4% para fixação. As amostras foram então analisadas em microscopia de luz (Olympus BX43) para identificação das espécies predominantes em cada idade do tapete. A segunda porção de malha foi destinada para peso úmido e peso seco (60 °C por 48h). Nesta análise foram descontados os pesos dos substratos.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Comportamento do Tapete

Independente do substrato e época do ano, os experimentos seguiram as etapas de colonização observadas para este sistema (ITOKAZU, 2018). O início da colonização foi dominado por diatomáceas penadas, com diversidade de espécies deste grupo. O segundo estágio é o aparecimento de algumas diatomáceas coloniais, para este trabalho em menor expressão, mas ainda sim presentes. E por fim, a determinação de maturação do tapete com o estabelecimento de algas filamentosas verdes e foliáceas (Figura 4). A diferença entre as comunidades estabelecidas entre substratos foi a presença de grandes quantidades de diatomáceas do gênero *Nitzschia* na colonização inicial para substratos sintéticos no mês de novembro.

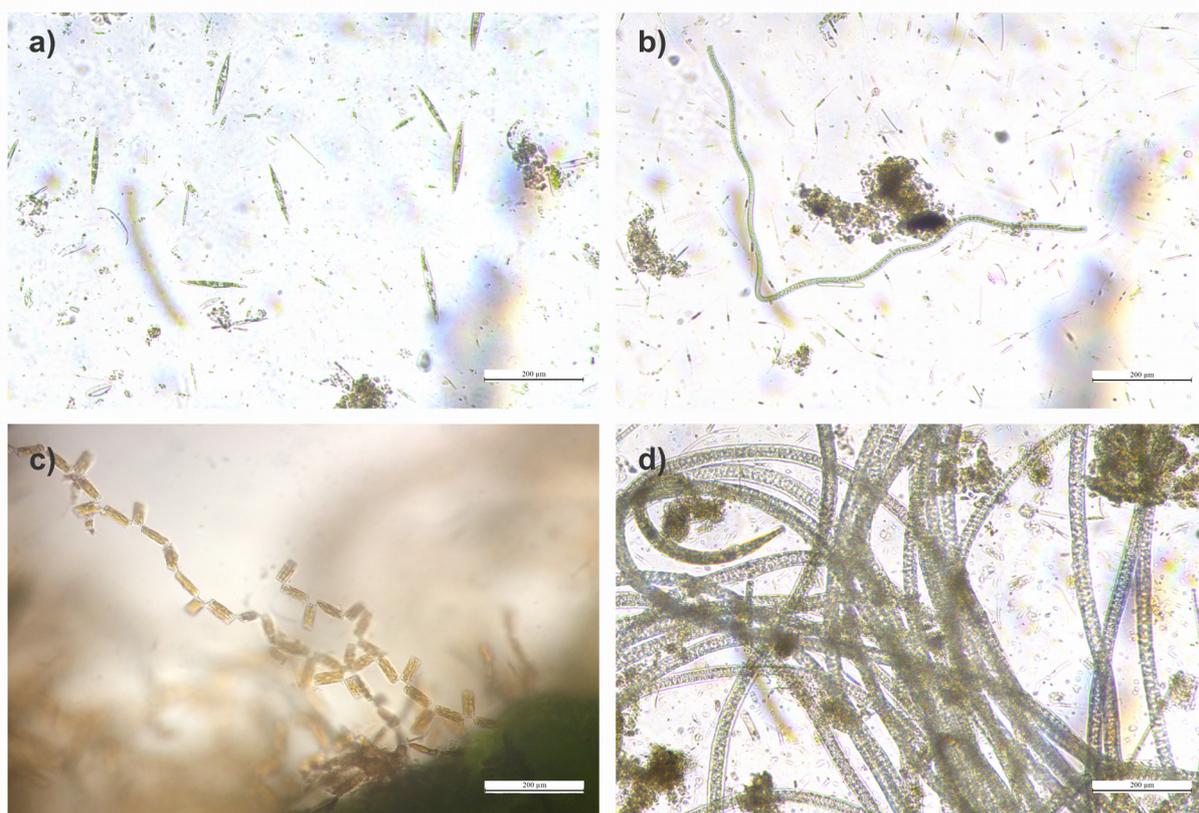


Figura 4. Composição específica (C.E.) do tapete de algas e o processo de sucessão. Imagens (a) e (b) referente ao dia 17 dos experimentos de malhas orgânicas e 19 de início dos experimentos de malhas sintéticas, diatomáceas penadas; (c) aparecimento de diatomáceas em cadeia e (d) a predominância de algas filamentosas.

Todos os substratos testados foram colonizados durante o período de experimento. Não houve diferenças nítidas de comunidade entre substratos de mesma natureza, apenas a predominância de algumas espécies distintas entre os experimentos de substratos sintéticos e orgânicos. O desenvolvimento de espécies de algas verdes, foi superior em malhas sintéticas onde cresceram e dominaram ambos os substratos durante os 32 dias de maturação. Para malhas orgânicas a presença destes organismos foi menor, predominando a comunidade de diatomáceas (Figura 5).



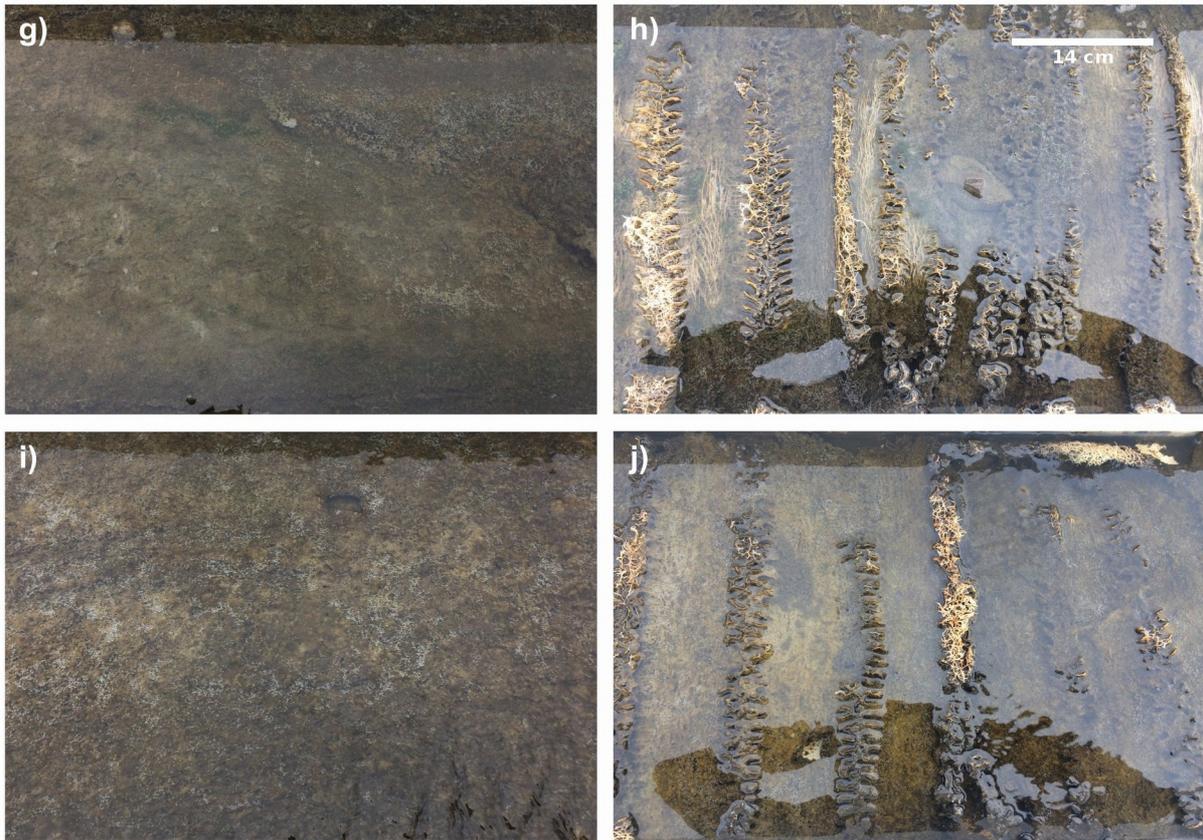


Figura 5. Sequência de cobertura do substrato na parte inferior da rampa para cada experimento. Imagens a, b, e, referem-se ao Nylon; b, d, f, referente ao PVC; g, i à Juta; h e j à Bucha. As linhas correspondem a idade do tapete, sendo a, b referente aos 19 dias; c, d aos 24 dias; e, f aos 32 dias; g, h aos 17 dias; i, j aos 24 dias. Os 25 dias para orgânicos não foram representados pois a Bucha foi retirada do experimento e não houve diferenças na comunidade para Juta.

A durabilidade das malhas orgânicas, especialmente da bucha, foi menor, com perda drástica da sua estrutura, resultando em uma dificuldade de desenvolvimento do tapete. Além disso, os substratos orgânicos retiveram maior umidade além de atuar como filtros para o material particulado presente na água. Esta característica teve influência no peso do material, agregando materiais da comunidade de algas. A colheita da biomassa se deu de forma mais prática em malhas sintéticas, visto que a trama permaneceu intacta ao longo dos experimentos, sendo possível um maior resgate de biomassa que malhas orgânicas, que se desfazem com facilidade ao serem manuseadas após permanecerem úmidas e com algas.

Considerando a usabilidade e desenvolvimento do tapete os substratos sintéticos demonstraram-se mais vantajosos. Os substratos orgânicos, apesar de serem materiais

mais interessantes do ponto de vista da sustentabilidade, apresentaram uma velocidade de decomposição superior em relação a velocidade de sucessão do tapete. Em especial a bucha, que teve a menor duração de todos os substratos, se desintegrando e impossibilitando seu uso aos 24 dias. A Juta apesar de mais resistente que a Bucha, também perdeu qualidade ao longo do experimento, além de liberar fibras facilmente quando manuseada e dificultar a colheita de biomassa.

As malhas orgânicas obtiveram um ganho maior de massa, principalmente até os 24 dias com rendimento de 1,2 g cm⁻² para bucha e 0,9 g cm⁻² para juta (Figura 6). As malhas sintéticas apresentaram um crescimento contínuo da biomassa atingindo rendimento de aproximadamente 1 g cm⁻², tanto para Nylon quanto PVC aos 32 dias. Os experimentos desenvolvidos por (ITOKAZU, 2018) que corresponderam ao período de inverno atingiram maiores biomassas, chegando a 3 g cm⁻² em 14 dias.

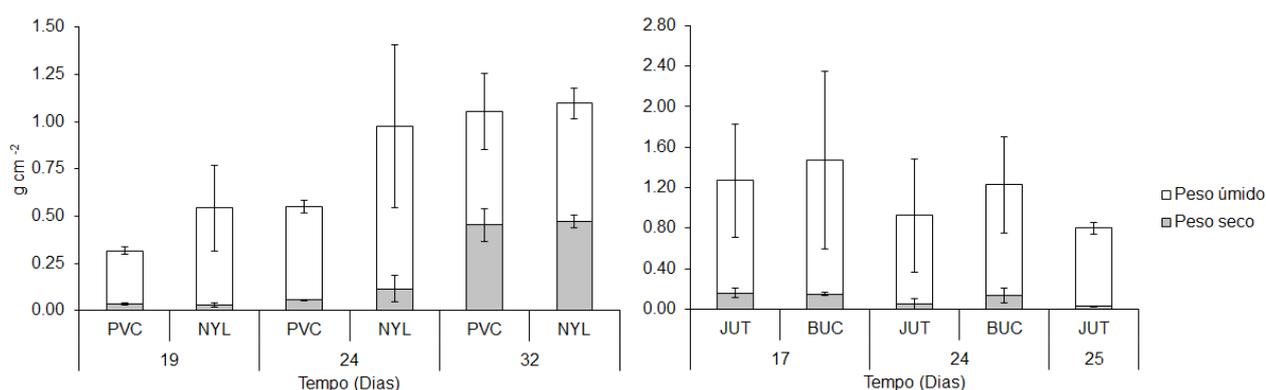


Figura 6. Pesos para cada substrato em cada um dos experimentos em g cm⁻². A esquerda, os tratamentos de malhas sintéticas e a direita as malhas orgânicas. O peso equivale às g de algas, descontando o peso da malha. A bucha foi retirada aos 24 dias devido à perda de estrutura da malha

A utilização de substratos orgânicos, apesar de um menor crescimento de biomassa algal, ainda se mostra uma alternativa do ponto de vista da sustentabilidade do sistema. Os materiais sintéticos (Nylon e PVC) podem se tornar fontes de poluição de microplásticos, uma vez que se rompem ao longo do uso. Além disso, não são reutilizáveis por muito tempo, sendo necessário a substituição da malha a cada experimento. À vista disso, a Bucha e a Juta não necessitam ser descartadas após o uso,

e sim ser incorporadas junto a biomassa de algas aderida e destinada a uso como biofertilizantes, bioestimulantes, dentre outros usos indicados na literatura.

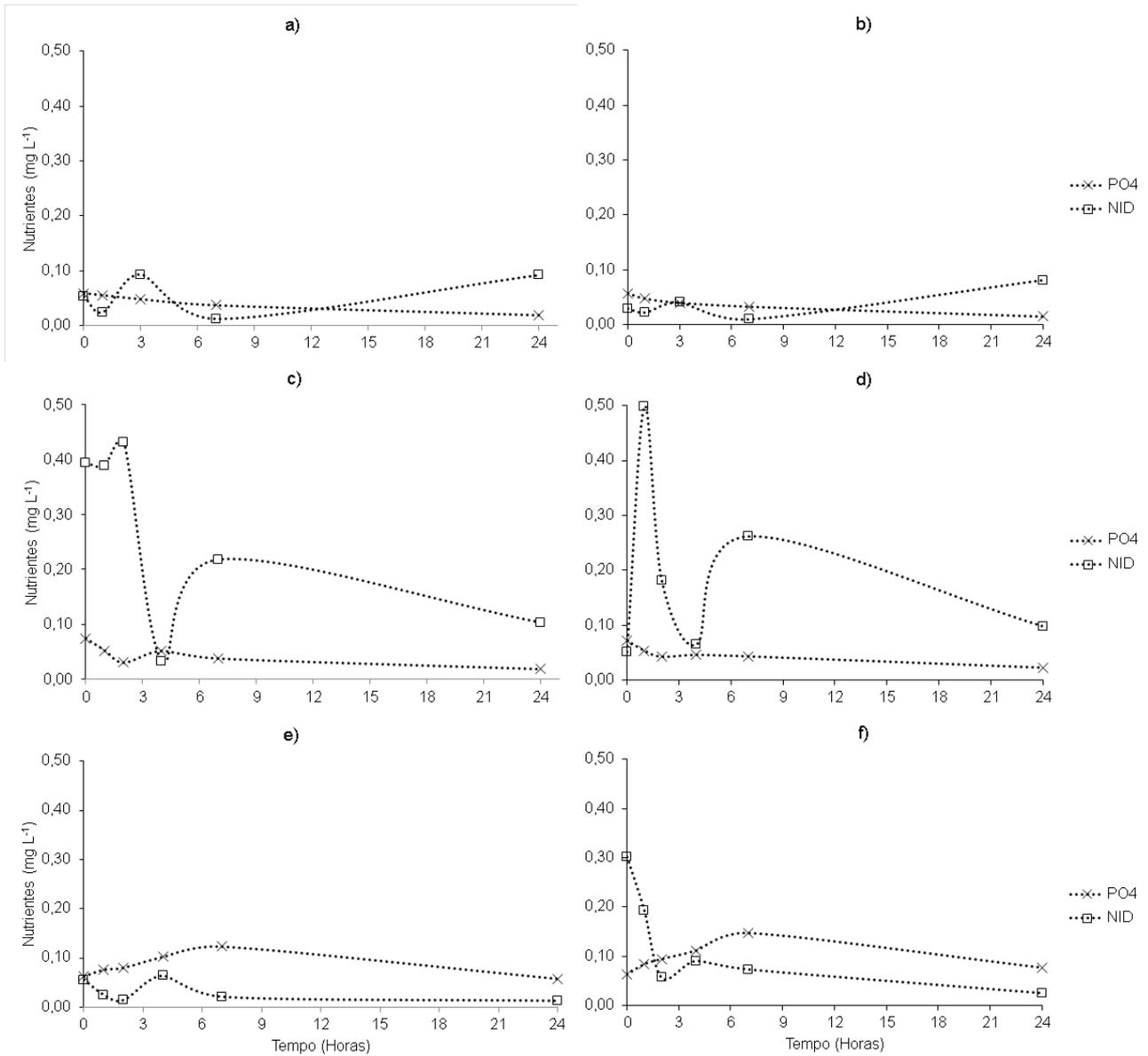
2.4.2 Remoção de Nutrientes e Eficiência

O efluente apresentou concentrações iniciais flutuantes entre os experimentos. Os resultados de remoção demonstram uma heterogeneidade de respostas em relação a idade do substrato e os nutrientes (Figura 6 e 7), ou seja, o tempo de maturação teve influência aparente na remoção. O Ortofosfato obteve considerável redução com substratos sintéticos aos 19 dias chegando à remoção de 68% para nylon e 75% para PVC, e 75% para nylon e 68% para PVC aos 24 dias (Tabela 1). Os 32 dias, para ambas as malhas a remoção não passou de 10%. Para as malhas orgânicas, a remoção não superou 58%, valor obtido pra a bucha aos 17 dias de maturação e com as concentrações iniciais superiores ao encontrado nos experimentos de malhas sintéticas.

As curvas de NID para todos os experimentos apresentaram flutuações como picos e reduções bastante intensas. Mesmo assim, foi possível verificar a remoção de nutrientes, sendo que os melhores resultados foram com PVC e nylon aos 32 dias, chegando a uma remoção de 91%. As diferenças de concentrações iniciais, encontradas em NID podem derivar de contaminações na leitura das amostras, especialmente para amônio, cuja análise é muito sensível e passível de contaminações. Eventuais picos também podem ter sido relacionados a presença de animais (microcrustáceos, nematodas, poliquetos) e microrganismos nos sistemas, que aparecem oportunisticamente nos tapetes se alimentando dos mesmos e excretando causando interferências nas concentrações medidas.

Quanto às eficiências de remoção, não houve padrão entre malha ou idade do tapete. Em cada experimento os substratos apresentaram comportamentos diferentes, com eficiências pontuais. Contudo, a remoção de fosfato foi superior em malhas sintéticas. Os valores de remoção foram padronizados por horas de experimento. Entende-se por eficiência esperada, a manutenção e o aumento da eficiência com o desenvolvimento do tapete com estabelecimento de *Ulva* spp. Dados reportados por outros trabalhos obtiveram resultados mais satisfatórios onde a eficiência permaneceu positiva, além disso a capacidade de absorção em outros trabalhos foi maior chegando a

1,4 g m⁻² dia⁻¹ para Fósforo e a 0,75 g m⁻² dia⁻¹ para Nitrogênio em TABs de pequena escala (KEBEDE-WESTHEAD, PIZARRO, MULBRY, 2004; MULBRY & WILKIE, 2001; PIZARRO, KEBEDE-WESTHEAD, MULBRY, 2003). No presente trabalho a capacidade de absorção não ultrapassou 0,03 mg m⁻² dia⁻¹ para Fósforo e 0,16 mg m⁻² dia⁻¹ para Nitrogênio.



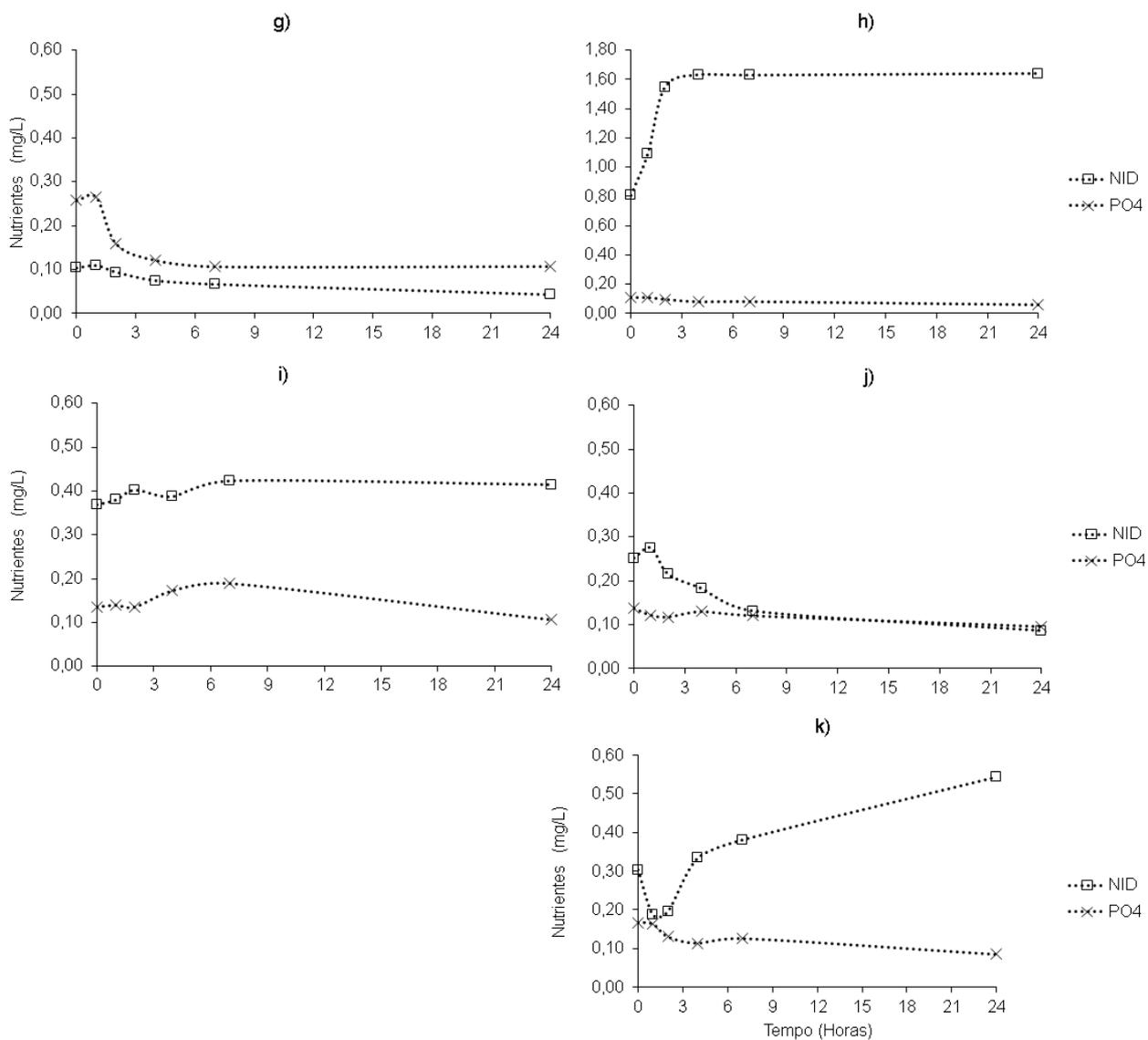


Figura 7. Evolução das concentrações de nutrientes nos TAB ao longo do período de 24 h para malhas sintéticas em cada um dos experimentos. Gráficos (a) Nylon em 19 dias; (b) PVC em 19 dias; (c) Nylon 24 dias; (d) PVC em 24 dias; (e) Nylon em 32 dias; (f) PVC em 32 dias; (g) Bucha em 17 dias; (h) Juta em 17 dias; (i) Bucha em 24 dias; (j) Juta em 24 dias e (k) Juta em 25 dias.

Tabela 1. Eficiência de remoção de cada nutriente. Percentual de absorção de nutrientes em 24h. Foram desconsiderados os valores negativos de eficiência, equivalentes a zero.

	19 Dias		24 Dias		32 Dias	
Nutriente	NYL (%)	PVC (%)	NYL (%)	PVC (%)	NYL (%)	PVC (%)
Fosfato ($P - PO_4^{-3}$)	68,00	74,00	75,00	68,00	8,18	0,00
NID ($N-NH_4^- + NO_2^- + NO_3^-$)	0,00	0,00	73,67	0,00	76,73	91,75

	17 Dias		24 Dias		25 Dias
Nutriente	BUC (%)	JUT (%)	BUC (%)	JUT (%)	JUT (%)
Fosfato ($P - PO_4^{-3}$)	58,51	45,33	21,46	30,09	49,44
NID ($N-NH_4^- + NO_2^- + NO_3^-$)	58,40	0,00	0,00	65,65	0,00

As concentrações de nutrientes observadas nestes experimentos foram ainda menores que os apresentados por ITOKAZU (2018). O efluente faz parte de um sistema de lagoas de decantação, sendo que a lagoa testada é a última da sequência. Além disso, há uma flutuação na concentração de nutrientes ao longo do ano na lagoa, associada aos períodos de cultivos de maricultura dos laboratórios adjacentes, que não corresponderam ao experimentos no TAB. Baixas concentrações de nutrientes desestimulam a atividade metabólica e consequente absorção e crescimento das algas do tapete, sendo uma possível causa da baixa eficiência do sistema nos experimentos aqui reportados. Este fato, pode ter influenciado uma maior mortalidade de algas e atividade heterotrófica, incorrendo em liberação de nutrientes pela biomassa ao invés de remoção (ADEY & LOVELAND, 1998; DAVIS, HOFFMANN, COOK, 1990; SLADECKOVA, MARVAN, VYMAZAL, 1983). Por fim, não se verificou razões N:P próximas de 16, ideal para o crescimento algal, sendo este um fator adicional na baixa eficiência das algas.

Por ser em local aberto, sujeito a intempéries, parâmetros tais como temperatura, salinidade, pluviosidade interagem e influenciam o padrão de remoção, sendo difícil separar a influência de cada um. No presente trabalho a análise destes parâmetros não aparentou influenciar diretamente no padrão de remoção (SIVILLE & BOEING, 2020).

2.5 Conclusão

Os materiais sintéticos apresentaram melhor desempenho e praticidade de uso do que os materiais orgânicos, principalmente em relação ao desenvolvimento do tapete. A bucha, mesmo com resultados interessantes de remoção, teve uma duração máxima de 24 dias de uso, já estando em estado de decomposição de suas fibras ao final do experimento. Isso dificulta a colheita da biomassa, resultando também em possível liberação de nutrientes. Mesmo assim, as malhas orgânicas apresentaram boas eficiências de remoção e são mais indicadas do ponto de vista da sustentabilidade.

Não houve diferenças na absorção dos nutrientes entre diferentes idades do tapete. O sistema apresentou eficiência de remoção em certos momentos, mas não foi possível o estabelecimento do melhor padrão de utilização.

Indica-se para trabalhos futuros a investigação das possibilidades de uso da biomassa, com e sem os substratos orgânicos. A inoculação de espécies para acelerar o processo de maturação, principalmente para substratos orgânicos.

A new method of cultivating *Ulva ohnoi* for biomass production and bioremediation

3.1 Introduction

Expansion of urbanization in coastal zones, as well as the increased use of fertilizers in coastal watersheds have accelerated the process of nutrient enrichment in coastal waters. As a result, there is a progressive loss of water quality, creating ecological and sanitary problems and limiting economic uses such as fishing, mariculture and tourism (HOWARTH et al., 2000).

The process of nutrient enrichment in an aquatic environment is known as eutrophication (SMITH, TILMAN, NEKOLA, 1999). Among other symptoms, the unbalanced increase in nutrients, especially N and P, leads to the exponential growth of opportunistic algae, generating blooms formed by one or a few species. The large amounts of algal biomass formed result in aesthetic problems, as well as bad smell, disruption of food chains and hypoxia or anoxia events. However, these algae play an important role as part of the solution to the problem, as they recover and incorporate the nutrients in their growth (CHRISTOPHER et al., 2016).

Algae from genus *Ulva* are cosmopolitan species, found in different environments and having great adaptability to environmental variations (RICCARDI; SOLIDORO, 1996). *Ulva spp.* are known to have high growth rates and nutrient absorption, which enable them to be used for bioremediation and biomass production (NEORI et al., 2003). However, cultivating *Ulva* still has some complications related to its life cycle, reproduction control and identification, being difficult to establish (GAO, 2016; GAO et al., 2017c; PAULERT et al., 2009).

Even so, *Ulva* among other algae has been used as biofilter in wastewater treatment systems. By combining knowledge about algae cultivation and metabolism, it is possible to promote optimal growth to efficiently remove nutrients from contaminated waters at the same time as producing biomass (NIELSEN et al., 2012). Designs like the Algal Turf Scrubbers (ATS), constructed wetlands and suspended biomass systems have demonstrated the effectiveness of the so-called phycoremediation systems for removing pollutants from different types of wastewater or even from polluted environments (ADEY, KANGAS, MULBRY, 2011).

The Algal Turf Scrubbers (ATS) system is a technology that uses attached algae to remove pollutants from contaminated waters. The operation consists of pouring polluted

water through an algal mat grown on a screen lying on a gently sloping ramp. The turbulent flow provides accelerated growth and high rate of pollutant removal by breaking the boundary layer. At the same time, generates biomass rich in secondary compounds (HESS et al., 2019; MULBRY et al., 2008; SIVILLE & BOEING, 2020).

The resulting algal biomass can be used to extract several high valued products such as polysaccharides, proteins, lipids, pigments and other molecules with a variety of applications. In the case of *Ulva* spp. the high yield polysaccharides stands out (DOMINGUEZ & LORET, 2019). Ulvan is the main structural polysaccharide that compose *Ulva* cell walls, giving it its flexibility and preventing desiccation for tides. Interest in ulvan has grown a lot, mainly for its pharmaceutical, biomedical, agricultural and food applications (BORSATO, DI PIERO, STADNIK, 2010; LAHAYE & ROBIC, 2007; NAGAOKA et al., 1999). *U. ohnoi* is one of the species that has shown great potential to produce this polysaccharide, in addition to presenting rapid growth, tolerance to environmental changes and high pollutant absorption (MAGNUSSON et al., 2019; MELTON, GARCIA-SOTO, LOPEZ-BAUTISTA, 2016; PRABHU et al., 2019).

Although there is a lot of knowledge about *Ulva* spp., there are still many gaps regarding its cultivation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficiency of nutrient removal (N and P), production of biomass and Ulvan by an *Ulva ohnoi* strain using an adaptation of an ATS. The difference to a conventional ATS is that instead of letting a mixed algal community settle naturally on the ramp, *Ulva* reproductive cells were sown in a controlled manner inducing the formation of an unialgal turf. Different kinds of substrates (natural and synthetic) were tested and the effects of different water circulation regimes on the attachment of reproductive cells of *U. ohnoi* and the efficiency of nutrient removal during the system maturation were also assessed.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Algal biomass collection

The algal biomass used to obtain reproductive cells was collected from an aquaculture facility (27° 35' 4,64" S; 48° 26' 31,10" W) in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. The samples were transported in thermal shelters protected from light within 1h to the Laboratory of Phycology of the Federal University of Santa Catarina (LAFIC – UFSC),

where they were washed with sterile (UV-C sterilized) seawater and brushed to remove epiphytes, invertebrates and sediment. Distilled water and sodium hypochlorite (0,025%) baths were also performed for 20 seconds to eliminate microorganisms.

3.2.2 DNA extraction, amplification, sequencing and alignment

To determine the species worked, since morphological analysis is not reliable, a molecular analysis was performed. For DNA extraction, small segments of approximately 100 mg of seaweed were frozen by adding liquid nitrogen and macerated with the aid of a mortar and pistil until obtaining a fine powder. DNA extraction was performed with the NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to supplier's protocol.

The molecular marker was amplified from PCR. For a final volume of 50 µL, were used: 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM each dNTP, 0,2 µM of each primer (Forward and Reverse), 5-10 ng of DNA total and 1,25 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The conditions for performing PCR were: Denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute of denaturation, 45°C for 1 minute e 30 seconds for primer's ringing, 72°C for 2 minutes to extension, followed by 72°C for 5 minutes of final extension. The marker *tufA* was assigned and followed as proposed by *Saunders and Kucera (2010)*.

Gene	Direction	Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>tufA</i>	Forward	turfGF4	GCNGCNGCNCAAATGGAYGG	Sauders & Kucera, 2010
	Reverse	GtufAR	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC	Sauders & Kucera, 2010

Table 1. Molecular markers and their sequences used for *u. ohnoi* identification (SAUDERS & KUCERA, 2010).

PCR was performed in a thermocycler (2720 Thermo Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, California USA) and after the reaction, the DNA fragments were verified by

electrophoresis in agarose gel 0,7%. The amplified products were purified with the kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the supplier's protocol. The DNA concentration obtained was important to measure the amount of purified PCR product to be used in the sequencing reaction. Sequencing reactions were performed with kit BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California USA), according to the supplier's protocol, using the specific primers for the molecular marker and the same PCR thermocycler. The process had as protocol 40 cycles at 96°C for 10 seconds, 54°C for 20 seconds and 60°C for 4 minutes. After the sequencing reaction, the DNA fragments were precipitated with 1 µL of EDTA 125 mM, 1µL of sodium acetate 3M, 25 µL of ethanol 100% and washed in 35 µL of ethanol 70%. The samples were analysed in the automatic sequencer ABI 3730 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, California USA). All the processes and equipment that were used were carried out at the Multi-User Laboratory LAMEB/UFSC.

The strings were aligned and edited in the BioEdit version 5.0.6 (Hall, 1999), ambiguous nucleotide validation was carried out and then a consensus sequence was generated. Multiple alignments were generated for the specific marker (excluding the regions of the external primers, as they represent artificial sequences) using Clustal W (THOMPSON et al., 1994) available on BioEdit. For the tufa, a matrix with 28 sequences was constructed from the sequences generated in the present study and others available in the GenBank database, including (KP685875) *Codium_cylindricum*, as an external group, a total of 480 nucleotides were analysed.

For Tufa, cluster trees were built using the distance method (Neighbor-Joining - NJ) in the MEGA7 program (TAMURA et al., 2011) with 1000 bootstrap replications. For phylogenetic analysis, evolutionary models were selected using jModeltest 2.1.4 (DARRIBA et al., 2011) and analysed using Maximum Likelihood (MV) and Bayesian Analysis (MB). The MV was estimated in MEGA 7, using the bootstrap method (1000 replicates) and an appropriate evolutionary model. Only values equal to or greater than 70% for the bootstrap were plotted and the following arbitrary scale was considered to describe the percentages of support: 70 to 89% - moderate support and, 90 to 100% - high support.

3.2.3 Reproduction induction

For induction of reproduction, thalli of *U. ohnoi* were crushed into fragments smaller than 1 cm², washed with sterile seawater and exposed to air at 25 °C for approximately 20 min. Then, 20 g L⁻¹ of fragments were immersed in culture medium and kept at constant aeration, temperature of 25 °C, irradiance of 90 ± 10 μmol photons m⁻²s⁻¹ and photoperiod of 12 h. The procedure of washing the fragments with sterile seawater and changing the culture medium were performed daily until the release of reproductive cells occurred. The culture medium consisted of sterile seawater (salinity 35) with von Stosch solution (8 mL L⁻¹) replacing nitrate with ammonium. This modification was made due to the preference of *Ulva* spp. by ammonium as nitrogen source (ALE et al. 2011). After 4 days, release of reproductive cells was observed, and the solution was sieved to remove thalli fragments. Reproductive cell density was estimated using a Neubauer chamber (volume 0,009 mL).

3.2.4 Algal Turf Scrubber (ATS)

A laboratory scale ATS (mini-ATS) with dimensions of 60 cm in length and 13 cm in width was used. The system consisted of glass ramps over a structure resulting in a 10% slope. A reservoir, also built in glass with a capacity of 3 L, was positioned at the end of the ramp. The water stored in the reservoir was pumped up to the beginning of the ramp where, by gravity, it returned to the reservoir generating a closed circulation. Two types of substrates for algae attachment were tested, one of natural origin (jute fiber - *Corchorus capsularis*) and one synthetic (Nylon). The jute fiber is composed of a lot of entangled microfilaments with a high adhesion surface. The nylon screen is formed by a smooth monofilament mesh with a 1 mm opening (Figure 1). Twelve identical mini-ATS units were assembled to allow replication and parameter variation.

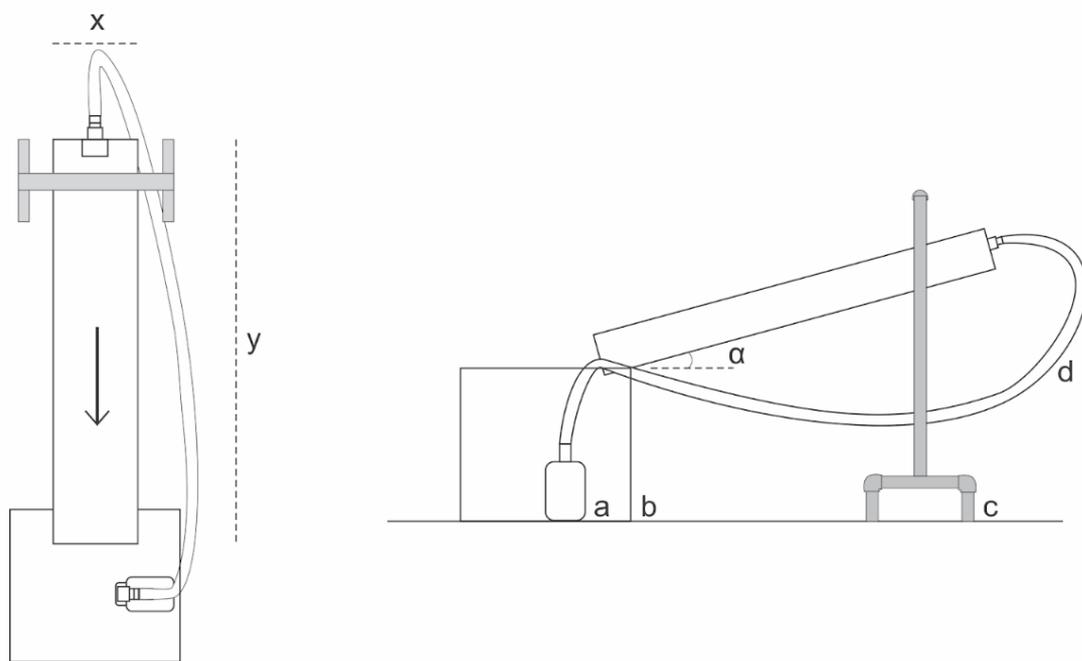


Figure 1. Schematic drawing of the mini-ATS system. Left, top view, where “x” is 13 cm wide and “y” 60 cm long, ramp made in glass, the arrow indicating water flow. The pump (a), push the water on the reservoir (b) through the hose (d), back to the beginning of ramp. Right, side view with “α” being 10% slope, and PVC structure (c) that support the system.

3.2.5 Influence of substrate type and water flow conditions on the attachment of *U. ohnoi* seedlings

A bifactorial experimental design was performed to evaluate the effects of substrate type and water flow on the attachment of *U. ohnoi* seedlings. Both substrates, jute and nylon, were left submerged in water for 24h, washed in running water and fixed on the ramps. Two water flow regimes were evaluated by varying the slope of the ramps: (a) without slope, generating a stagnant condition with 10 cm of water column, and (b) 10% slope, generating a continuous turbulent flow of 20 L min⁻¹. In both treatments 2,5 L of culture medium was added and 500 mL aliquots of the solution with 1.8 x 10³ reproductive cells mL⁻¹. Each treatment was tested in triplicate.

After inoculation of the reproductive cells, the ATS system was kept for two days under the same temperature, light and photoperiod conditions described for reproduction induction, to promote attachment. After this period, the ATS with stagnant regime were

changed to the same condition as continuous flow and von Stosch medium (8 mL L^{-1}) was added every 2 days in all treatments. All treatments were then kept in these conditions for 7 days. Salinity was monitored daily and, when necessary, corrected by using distilled water.

The substrate coverage rate by *U. ohnoi* seedlings was estimated through photographs taken longitudinally in the three regions (superior, middle and inferior) of the screens (substrate + *Ulva* thalli). For each region, 10 photographs with $1,28 \text{ cm}^2$ were taken, and analysed using ImageJ 1.51p. Data were expressed as coverage rate (%).

3.2.6 Effects of the ATS maturation time on phosphate and ammonium removal kinetics

To evaluate the effects of the maturation time of *U. ohnoi* seedlings cultivated in the mini-ATS systems on the removal kinetics of phosphate and ammonium, the same procedure for obtaining reproductive cells and settlement previously described was performed. In view of the results obtained in the previous experiment, in this experiment we used the synthetic substrate and continuous flow conditions for the settlement of *U. ohnoi* reproductive cells. Mini-ATS units were inoculated with 300 mL aliquots containing 3.2×10^5 reproductive cells per mL, along with 2.7 L of culture medium. Each treatment was conducted in triplicate.

The total maturation time of the mini-ATS system was 49 days, where on days 18 and 47 the removal kinetics of ammonia and phosphate was evaluated. During the experiment period, salinity was monitored daily and, when necessary, corrected with the use of distilled water. Von Stosch solution (8 mL L^{-1}) was added every two days and the culture medium was changed every seven days, when the screens were weighed to estimate the biomass. In the 7 days before evaluating removal kinetics, von Stosch solution was not added every two days. This method was used to reduce algal internal reserves of nitrogen and phosphate (Smit et al. 1996).

Before evaluating removal kinetics of phosphate and ammonium, culture medium was replaced with sterile seawater and von Stosch solution (8 mL L^{-1}) without ammonium and phosphate. The seawater used had low levels of ammonia/ammonium ($< 0.01 \text{ mg L}^{-1}$), nitrate ($< 0.01 \text{ mg L}^{-1}$) and phosphate (undetectable). Four concentrations of phosphate P-

PO_4^{3-} (1.9, 3.8, 5.8, 8.8 mg L^{-1}) and ammonium N-NH_4^+ (0.7, 1.5, 2.2, 3.3 mg L^{-1}) were used, based on von Stosch increasing concentrations. These concentrations were obtained by diluting concentrated solutions of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ as phosphate source and NH_4Cl as ammonium source in the seawater used. A 10 mL sample of each mini-ATS unit was taken after 15, 30, 60, 120, 240 and 1440 minutes to monitor the concentrations of phosphate and ammonium, and to evaluate removal kinetics over time. Phosphate was determined by molybdenum blue method according to (STRICKLAND & PARSONS, 1972) and ammonium by indophenol method according to Grasshoff (1983).

The removal efficiencies were calculated by assessing the variation in phosphate and ammonium concentrations in the medium after 15, 30, 60, 120, 240 and 1440 minutes of exposure by according to the equation (1):

$$\text{RemovalEfficiency}(\%) = 100 - \left[\frac{(C_{t+1} \times 100)}{C_t} \right] \quad (1)$$

where, C_t is the initial concentration of nutrients and C_{t+1} is the concentration after $t+1$.

The removal rate was calculated from the changes in phosphate and ammonium concentrations during each sampled time interval according to the equation (2):

$$\text{RemovalRate} = \frac{[(C_t \times V_t) - (C_{t+1} \times V_{t+1})]}{(B \times \Delta_t)} \quad (2)$$

where, C_t is the initial concentration; V_t is the initial water volume; C_{t+1} is the concentration after $t+1$; V_{t+1} is the volume after $t+1$; B is the dry biomass used; and Δ_t is the time interval between t and $t+1$. The values were expressed in $\text{mg g dw}^{-1} \text{h}^{-1}$.

3.2.7 Growth Rate

The growth rates were determined from the increase in biomass over time. For that, the screens (substrate + algae) of each ATS unit were removed and weighed (Maruri Digital Fish Scale) on days 10, 24, 31, 39 and 48 after inoculation. Growth rates were calculated according to the equation (3):

$$GrowthRate(day^{-1}) = \left[\left(\frac{W_f}{W_i} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right] \times 100 \quad (3)$$

where, W_i is the initial wet biomass, W_f is the final wet biomass, and t is the elapsed time in days.

3.2.8 Ulvan yield

The biomass produced in each ATS unit was collected at the end of the experiment and dried separately at 60 °C for 24h. Two grams of each sample were macerated with liquid nitrogen and autoclaved for 40 min at 110 °C in 20 mL of distilled water. The resulting solution was centrifuged at 3.500 x g for 15 min, the supernatant separated, added three volumes of ethanol (98° GL) and cooled at -20 °C for 48h, allowing the precipitation of polysaccharides. The solution was centrifuged again allowing separation of the precipitate. The polysaccharide mass was then dried at 40 °C for 24h and weighed. Ulvan yield was calculated according to the equation (4):

$$UlvanYield(%) = \frac{(M_p \times 100)}{M_a} \quad (4)$$

where, M_p is the precipitated dry mass and M_a is the dry mass of algae used for extraction.

3.2.9 Statistical analysis

The influence of substrate type and water flow conditions in the coverage rate of *U. ohnoi* seedlings, TABs maturation time on ammonium and phosphorus uptake kinetics and efficiency, and growth rate were analysed by two-way ANOVA. Ulvan yield was analysed by one-way ANOVA. Analysis of normality and homogeneity of variances (Cochran's test) were performed to verify that the premises were met. When significant differences were observed ($p < 0.05$), the Student-Newman-Keuls (SNK) multiple post hoc comparison test was applied. Statistical analyses were performed using the STATISTICA 12 software (StatSoft, Inc. 2011).

3.3 Results

3.3.1 Phylogenetic analysis

Alignment of *tufA* DNA sequences obtained from the experiment samples, demonstrated matching sequences found in GenBank for *Ulva ohnoi* (Figure 2). This eliminates doubts of the species worked.

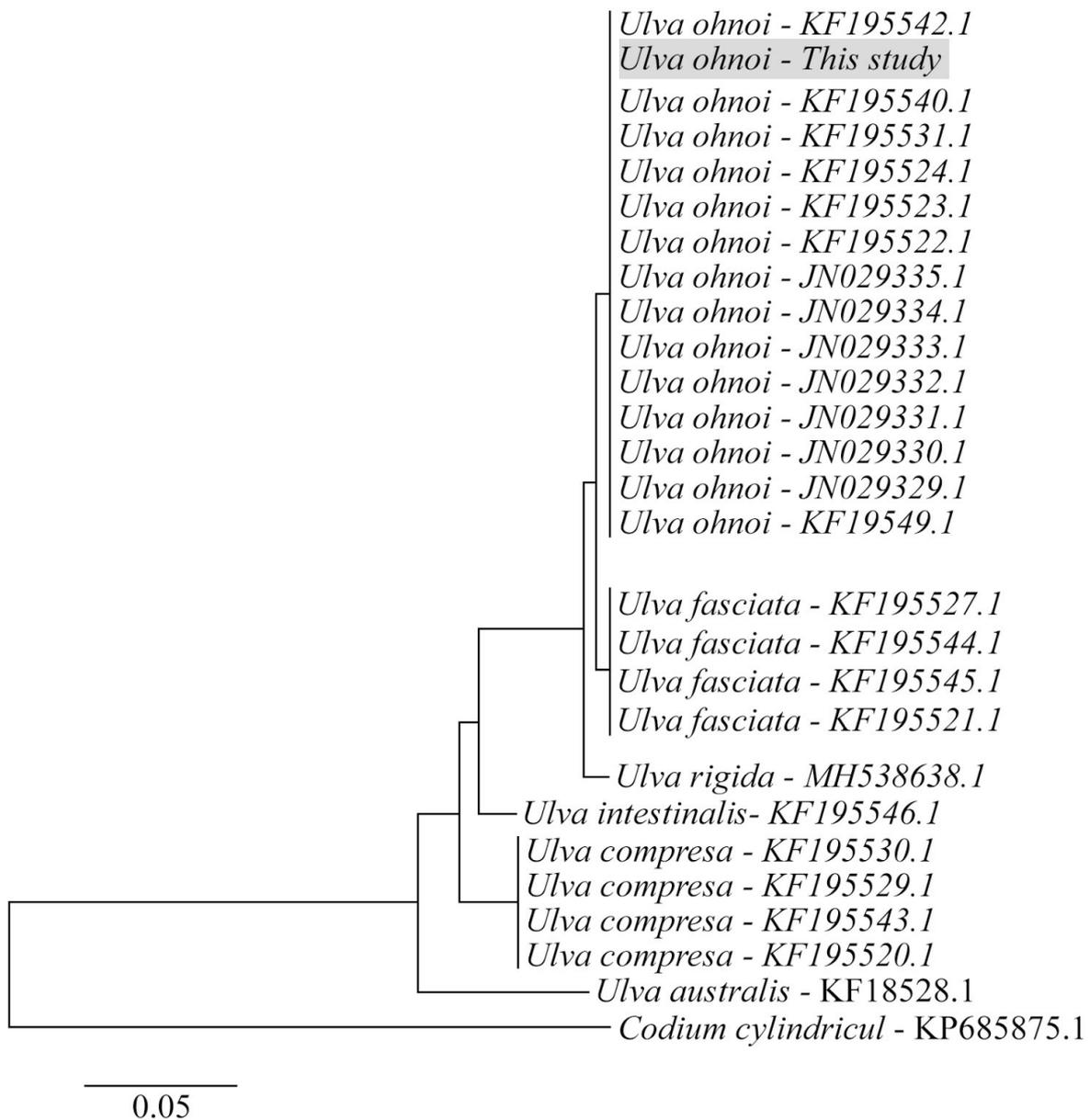


Figure 2. Neighbor-Joining distance map (NJ) for UPA marker sequences. Bootstrap values (1000 replicates) are represented in the branches, only values above 70 have been plotted. The strings available on GenBank and used in the analysis are followed by the access number. As an external group, the sequence of *Codium cylindricum* was used. The scale represents the number of substitutions.

3.3.2 Coverage rate

The coverage rate (%) of *U. ohnoi* seedlings was significantly ($p < 0.05$) influenced by substrate type and water flow condition (Figure 3). However, longitudinally, coverage rate was not significantly influenced (Table 1). The coverage rate by *U. ohnoi* seedlings was higher when nylon was used as substrate, with continuous flow condition (74.41%), followed by nylon as substrate and stagnant flow (57.49%). The organic substrate (jute) showed lower coverage rate results, with 11.27% when in continuous flow condition and 7.21% in stagnant flow (Figure 4).

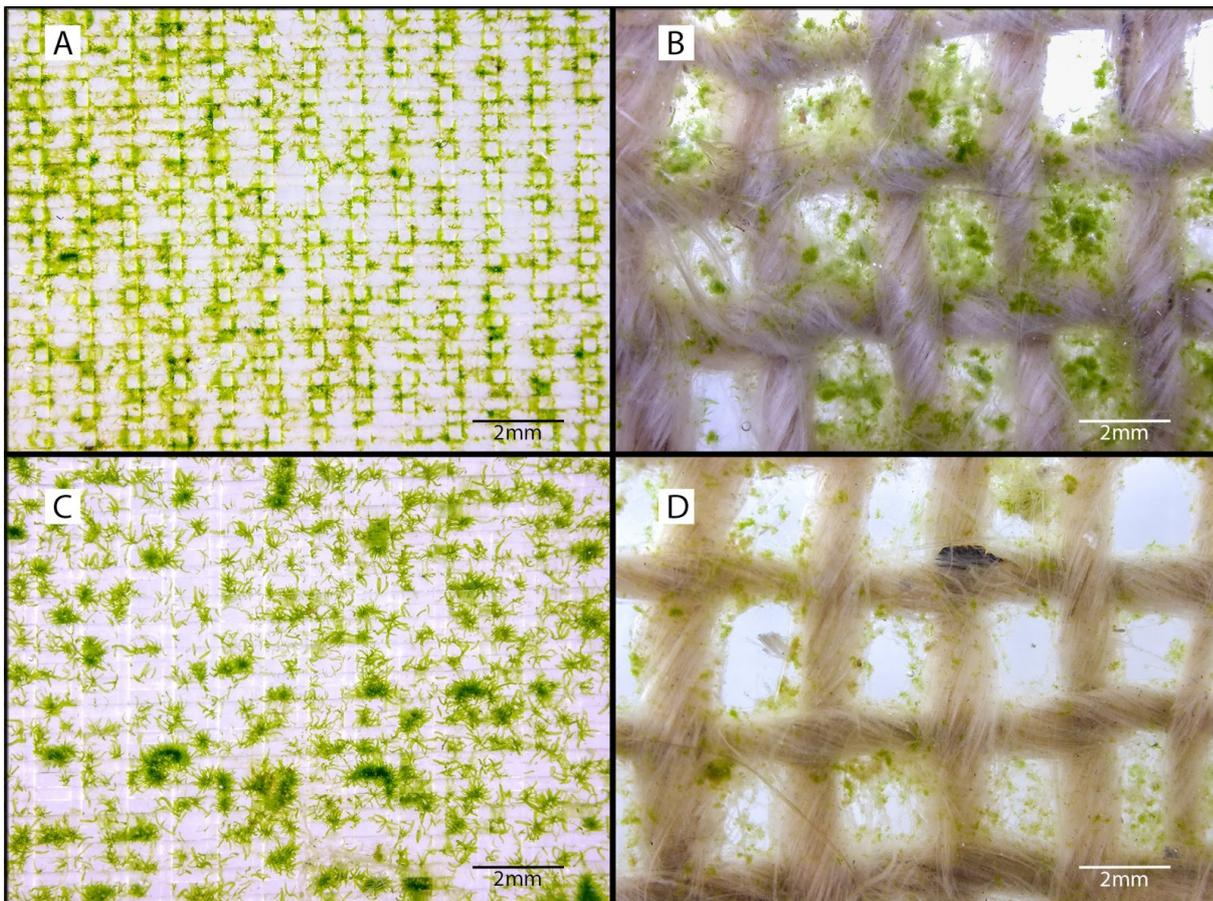


Figure 3. Coverage by *Ulva ohnoi* seedling in nylon substrate and stagnant flow (A), jute substrate and stagnant flow (B), nylon substrate and continuous flow (C), and jute substrate and continuous flow (D) cultivated in the TAB system for 7 days.

Table 2. Results of one-way and two-way ANOVA for different parameters determined in *Ulva ohnoi* cultivated in the TAB system. Significant effects ($p < 0.05$) are indicated in bold.

Coverage Rate		<u>F</u>	<u>p</u>
Substrate type		1085,83	0,000
Flow conditions		36,34	0,000
Substrate region		0,92	0,413
Substrate type X Substrate region		0,16	0,854
Substrate type X Flow conditions		13,47	0,001
Flow conditions X Substrate region		0,17	0,848
Substrate type X Flow conditions X Substrate region		1,13	0,340

	<u>Phosphate</u>		<u>Ammonia</u>	
	<u>F</u>	<u>p</u>	<u>F</u>	<u>p</u>
Concentration	46,91	0,00	2,42	0,104
Maturation time (18 days X 47 days)	246,94	0,00	60,15	0,000
Concentration X Maturation time	46,91	0,00	4,30	0,021

	<u>Phosphate</u>		<u>Ammonia</u>	
	<u>F</u>	<u>p</u>	<u>F</u>	<u>p</u>
Maturation time (18 days X 47 days)	306,86	0,000	64,95	0,000
Exposure time	484,71	0,000	638,75	0,000
Concentration	94,07	0,000	88,16	0,000
Maturation time X Exposure time	87,20	0,000	20,00	0,000
Maturation time X Concentration	15,15	0,000	18,16	0,000
Exposure time X Concentration	65,46	0,000	74,57	0,000
Maturation time X Exposure time X Concentration	30,08	0,000	45,28	0,000

Growth Rate		<u>F</u>	<u>p</u>
TABs		7,74	0,001
Time interval		109,02	0,000
TABs X Time interval		7,56	0,000

Ulvan rate		<u>F</u>	<u>p</u>
TABs		1,59	0,267

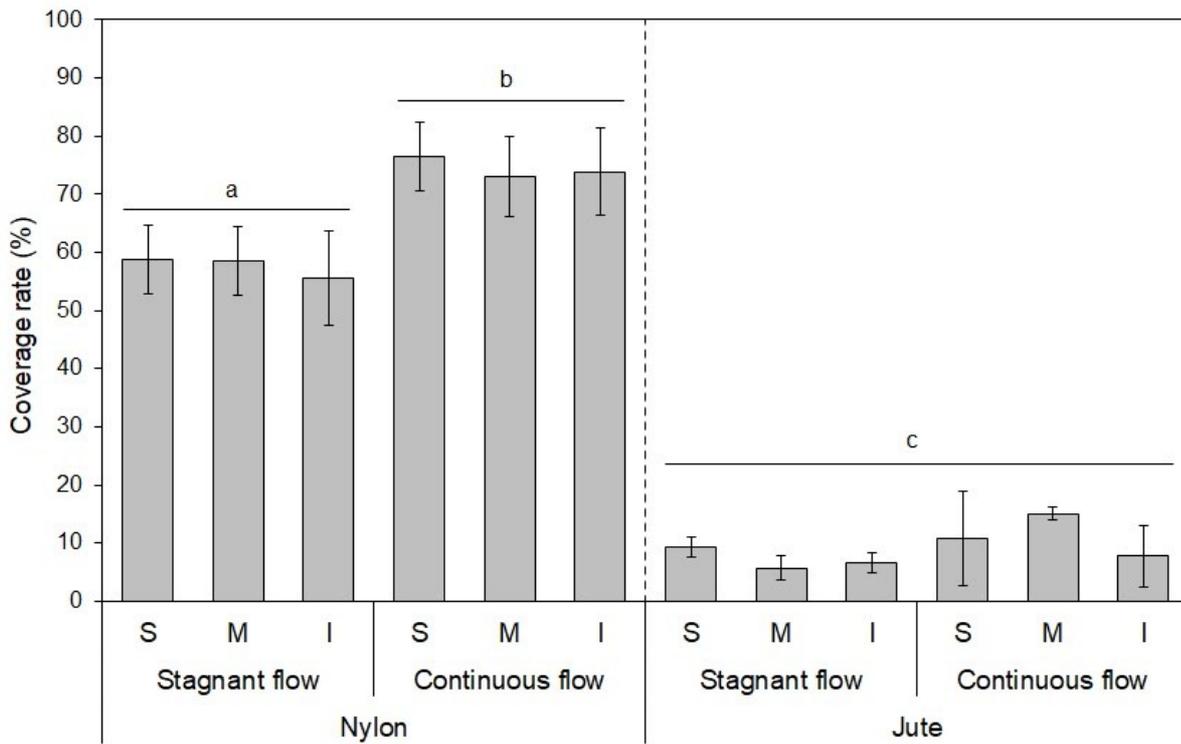


Figure 4. Coverage rate (%) by *Ulva ohnoi* seedling in three substrate sectors (Upper, middle and final) of two substrate (jute and nylon) and two water flow conditions (stagnant and continuous) cultivated in the ATS systems. Different letters indicate significant differences according to ANOVA and SNK post hoc test ($p < 0.05$). The data represents the means \pm SD for $n = 3$.

3.3.3 Removal pattern and efficiency

The results of the removal pattern (Figure 5) and removal efficiency (Figure 6) demonstrated a heterogeneity of responses between the initial concentrations of phosphate and ammonium used, as well as, with maturation time of seedlings in the substrates. In all conditions tested, a dose-dependent relationship was observed with greater uptake at lower concentrations of ammonium in the medium. For phosphate, homogeneity was observed for removal among the concentrations used and incubation time analysed. For 18 days of maturation, phosphate removal in the first 15 min was the greatest with uptake of 25.30% at the maximum concentration ($8.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$), followed by 24.25% and 23.32% for the lowest ($1.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) and second lowest ($3.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) concentrations used, respectively. The removal was lower for maturation time of 47 days, with 15.63% at the maximum concentration used ($8.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$), followed by 14.28% and 11.95% for the second lowest ($3.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) and lowest ($1.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) concentrations used, respectively. For ammonium, greatest removal occurred with 47 days of maturation time,

varying from 81.93% at the concentration 0.7 mg L⁻¹ N and 28.41% for the concentrations of 3.3 mg L⁻¹ N and 1.5 mg L⁻¹ N. For the evaluation at 18 days of maturation time, ammonium removal varied from 46.13% at 0.7 mg L⁻¹ N, followed by 33.55% and 20.86% for the 1.5 mg L⁻¹ N and 3.3 mg L⁻¹ N, respectively.

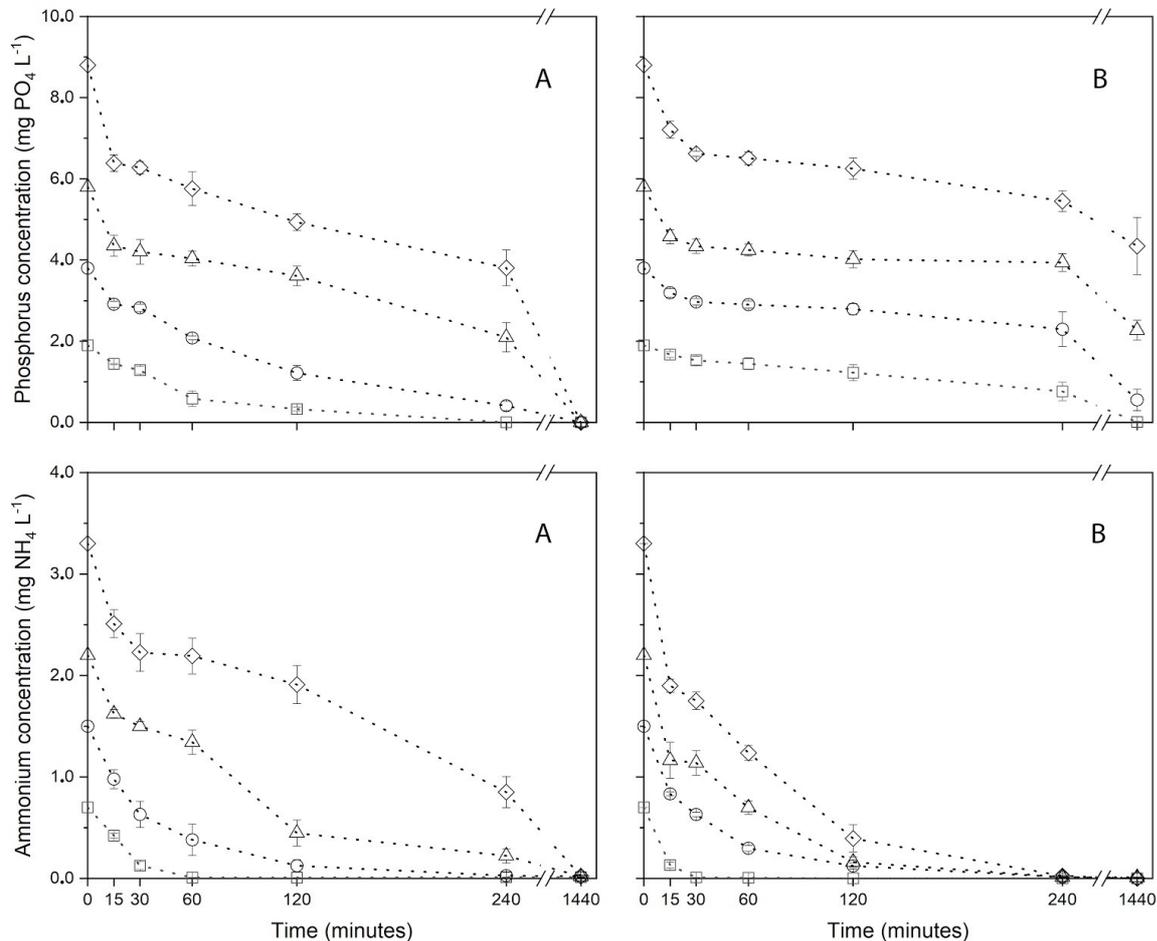


Figure 5. Changes in concentrations of phosphate and ammonium in the ATS systems during 1440 min of incubation. **A**- 18 days of ATS maturation and **B** - 47 days of ATS maturation. The data represents the means \pm SD for n = 3.

The removal efficiency was significantly ($p < 0.05$) influenced by phosphate or ammonium concentrations used and maturation time of *U. ohnoi* seedlings in the ATS systems (Table 1). For the ATS with 18 days of maturation, 100% of the phosphate was absorbed after 1440 min in all the initial concentrations tested. However, for 47 days of maturation, phosphate removal efficiency reduced with increasing concentrations (Figure 6). For ammonium, removal efficiency remained between 98 and 100% in both maturation times. For most samples the efficiency increased after 30 min.

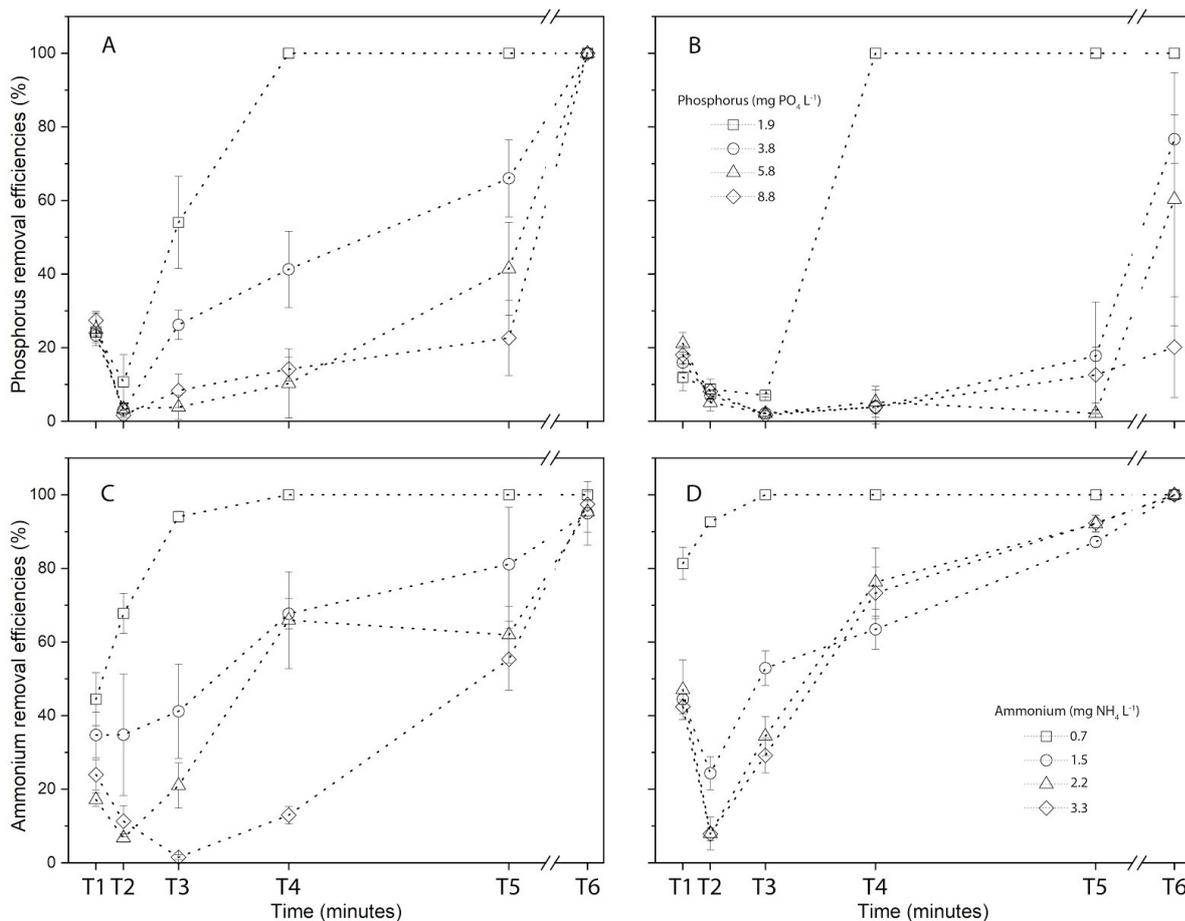


Figure 6. Removal efficiency (%) for each time (0, 15, 30, 60, 120, 360 and 1440 min) of incubation with P-PO₄⁻³ (1.9, 3.8, 5.8, 8.8 mg L⁻¹) and N-NH₄⁻ (0.7, 1.5, 2.2, 3.3 mg L⁻¹) by *Ulva ohnoi* with two maturation time 18 (A and C) and 47 days (B e D) in the TAB system. The data represents the means \pm SD for n = 3.

3.3.4 Uptake velocity

The absorption rates of phosphate and ammonium were significantly ($p < 0.05$) affected by the concentrations used, exposure time and maturation time of *U. ohnoi* seedling in the ATS units (Table 2). For both phosphate and ammonium concentration, the highest uptake velocity values were observed between 0 and 15 min of exposure with a significant ($p < 0.05$) gradual reduction in the following times (Table 1 and 2). In phosphate concentrations, on average, the values obtained for uptake velocity between 0 and 15 min of exposure were 55% higher when the ATS units had 18 days of maturation, reaching 1.47 mg P-PO₄⁻³ g (dry weight)⁻¹ h⁻¹ at initial concentration of 2.79 mg L⁻¹ (Table 2). On the other hand, for ammonium, on average, the values obtained for uptake velocity between 0

and 15 min of exposure were 25% higher when the units had 47 days of maturation, reaching 1.5 mgI N-NH₄⁺ g (dry weight)⁻¹ h⁻¹ at initial concentration of 3.3 mg L⁻¹.

Table 3. Uptake velocity (mg NH₄⁻ / PO₄⁻³ g (dry weight)⁻¹ h⁻¹) of phosphate and ammonium after 15, 30, 60, 120, 240 and 1440 minutes by *Ulva ohnoi* with two maturation time (18 and 47 days) in the ATS system. Different letters indicate significant differences according to factorial ANOVA and SNK post hoc test (p <0.05). The data represents the means ± SD for n = 3.

Maturation time (days)	Phosphate (mg L ⁻¹)	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
18	1.9	10,12 ± 0,36	g	3,40 ± 2,38	abcd	7,69 ± 1,42	efg	1,40 ± 0,94	abc	0,90 ± 0,13	abc	0,00 ± 0,00	a
	3.8	19,47 ± 1,63	j	1,97 ± 1,27	abcd	8,16 ± 1,52	eg	4,74 ± 1,27	cdf	2,22 ± 0,55	abcd	0,11 ± 0,03	a
	5.8	13,50 ± 1,11	h	2,49 ± 0,01	abcd	9,53 ± 0,34	g	2,71 ± 1,72	abcd	4,16 ± 1,45	abcd	0,58 ± 0,10	ab
	8.8	47,52 ± 4,55	k	2,37 ± 1,85	abcd	5,70 ± 2,98	def	4,54 ± 1,30	bcd	3,09 ± 1,50	abcd	1,05 ± 0,12	abc
47	1.9	2,84 ± 0,85	abcd	1,83 ± 0,49	abc	0,50 ± 0,26	ab	0,69 ± 0,29	abc	0,72 ± 0,56	ab	0,12 ± 0,04	a
	3.8	7,58 ± 1,31	eg	2,81 ± 0,47	abcd	0,41 ± 0,13	a	0,35 ± 0,15	a	0,78 ± 0,64	ab	0,27 ± 0,03	a
	5.8	14,06 ± 2,22	h	2,95 ± 1,39	abcd	0,58 ± 0,21	ab	0,71 ± 0,55	ab	0,13 ± 0,01	a	0,26 ± 0,02	a
	8.8	16,72 ± 2,64	i	7,40 ± 1,89	eg	0,69 ± 0,65	ab	0,80 ± 0,96	ab	1,25 ± 0,80	abc	0,17 ± 0,12	a

Maturation time (days)	Ammonia (mg L ⁻¹)	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
18	0.7	21,92 ± 3,31	g	17,23 ± 0,77	abcd	3,91 ± 1,31	eg	0,01 ± 0,01	abc	0,00 ± 0,00	abc	0,00 ± 0,00	a
	1.5	35,85 ± 3,26	j	17,67 ± 5,90	abcd	8,24 ± 1,28	g	4,20 ± 1,59	cdf	0,81 ± 0,30	abcd	0,02 ± 0,03	a
	2.2	22,56 ± 2,61	h	8,14 ± 1,40	abcd	11,74 ± 3,30	def	14,74 ± 4,03	bcd	1,85 ± 1,53	abcd	0,17 ± 0,07	ab
	3.3	48,57 ± 9,06	k	18,63 ± 6,52	abcd	1,13 ± 0,55	efg	4,66 ± 0,80	abcd	8,72 ± 1,70	abcd	0,68 ± 0,13	abc
47	0.7	38,94 ± 2,03	h	7,97 ± 1,99	abc	0,13 ± 0,09	a	0,09 ± 0,04	a	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	1.5	27,00 ± 1,36	eg	26,58 ± 2,78	abcd	10,98 ± 1,16	ab	2,85 ± 0,92	abc	0,90 ± 0,25	ab	0,01 ± 0,00	a
	2.2	17,57 ± 1,87	abcd	49,97 ± 6,45	eg	14,56 ± 3,27	ab	8,80 ± 1,70	ab	1,23 ± 0,36	ab	0,00 ± 0,01	a
	3.3	89,66 ± 5,46	i	8,94 ± 2,42	abcd	16,87 ± 3,17	ab	13,89 ± 2,64	ab	3,04 ± 1,04	abc	0,02 ± 0,01	a

3.3.6 Growth Rate

Although growth rates (GR) have been significantly influenced by time and the nutrients concentrations used in uptake kinetics (Table 1 and Figure 8). The highest GR values were observed in TI-1 with maximum for ATS-3 (9.3 ± 0.9% day⁻¹), followed by ATS-2 and ATS-4 (7.1 ± 1.0% day⁻¹ and 6.7 ± 0.7% day⁻¹, respectively). After TI-1, a gradual reduction in GRs was observed with stabilization between TI-3 and TI-4 with 1.5 ± 0.7% day⁻¹ on average.

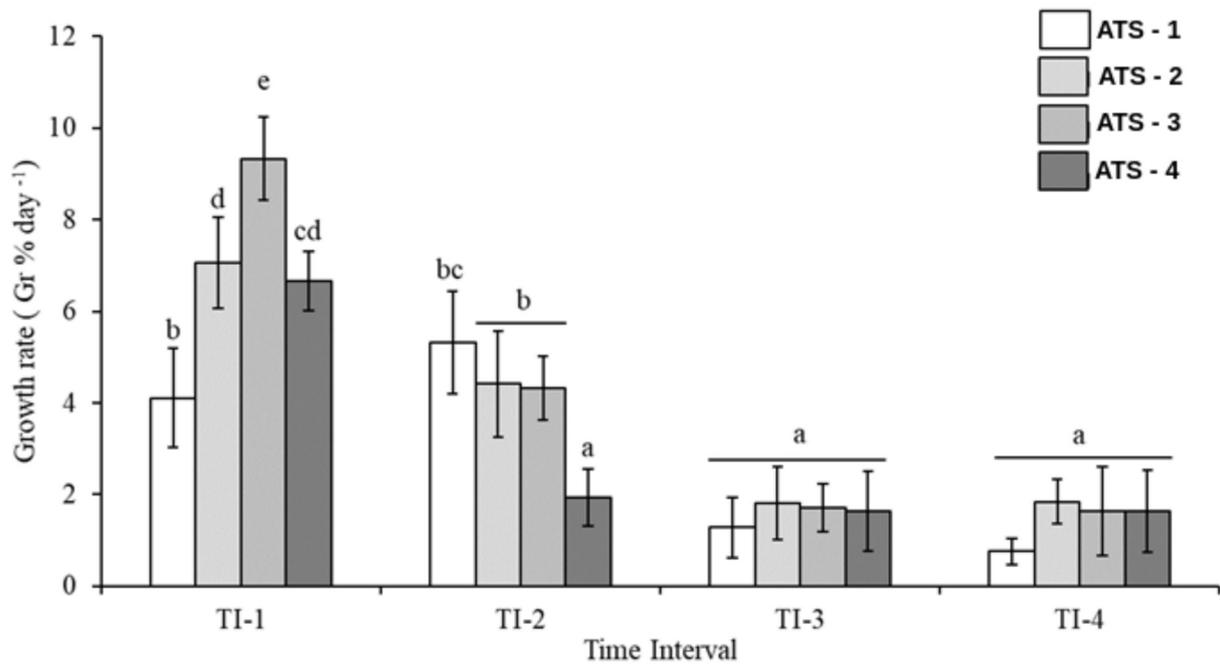


Figure 7. Growth rate (Gr % day⁻¹) of *U. ohnoi* over time of experiment. TI-1 = 10-24 days, TI-2 = 24-31 days, TI-3 = 31-39 days, TI-4 = 39-48 days. Different letters indicate significant differences according to ANOVA and SNK post hoc test ($p < 0.05$). The data represents the means \pm SD for $n = 3$. TAB equal to ATS.

3.3.6 Ulvan yield

Ulvan yield showed no significant differences in relation to the concentrations of phosphate and ammonium used in removal pattern (Table 1 and Figure 9). The average ulvan yield reached was $18.54 \pm 3.13\%$, with a maximum value of $20.02 \pm 2.04\%$ for ATS-1.

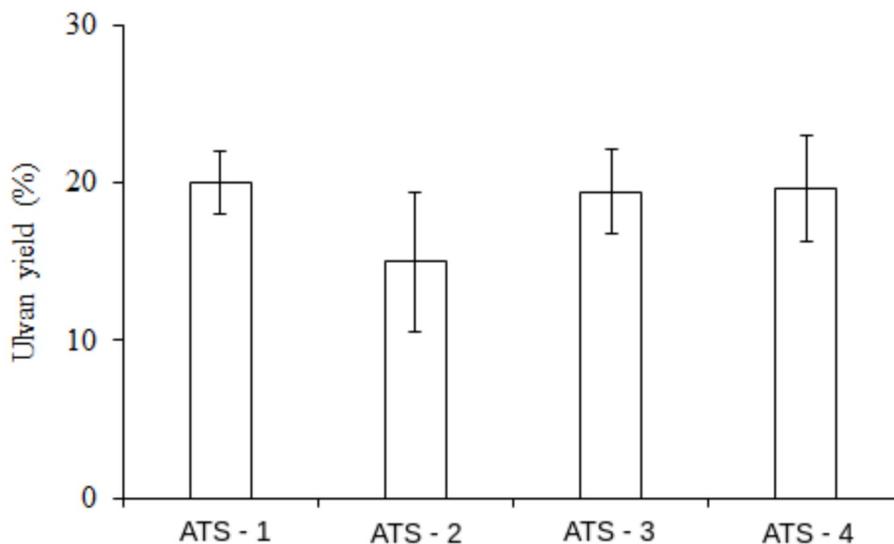


Figure 8. Ulvan yield (%) extracted from *Ulva ohnoi* biomass. The data represents the means \pm SD for n = 3.

3.4 Discussion

Several studies have investigated different cultivation methods and the ability to remove nutrients by the genus *Ulva*, on a laboratory scale (GAO et al., 2017a; HIRAOKA & OKA, 2008; PRAEGER & DE NYS, 2017; SUN et al., 2015) and on larger scales (GUTTMAN et al., 2018; SHAHAR et al., 2020). All studies addressed the potential of *Ulva* species for bioremediation, in addition to the production of biomass for the extraction of bioproducts. In the present study, the union of *Ulva* cultivation techniques through seeding with the Algal Turf Scrubber concept proved to be a new option, both for obtaining biomass and for bioremediation. The miniature system (mini-ATS) proved to be productive and practical to test different operating configurations, generating fast and reliable results.

The seeding of reproductive cells of *Ulva* was already tested before as a culturing procedure, but never on an ATS system (PRAEGER & DE NYS, 2017). Also, the density of reproductive cells inoculated was higher than those found in the literature for other culturing systems. To make the system more efficient and economical for a future upscale it is necessary to test different densities of reproductive cells to verify which one best adapts to the substrate, area and flow regime of the ATS. In addition, longer settlement times can generate higher growth rates, leading to greater biomass production (CARL, DE NYS, PAUL, 2014).

Attachment of the reproductive cells occurred differently in the two types of screens tested nylon yielding the best results. Although some studies indicate jute as a good substrate for *Ulva* adhesion and culture (GENG et al., 2015), the present study did not obtain positive results for this material. The biochemical affinity initially considered as preferential algae settlement and attachment seemed to be not suitable. Plastic materials, especially those dumped into the oceans by human activities, were the best substrates for the germination of *U. prolifera* (GENG et al., 2015). The hydrophobic nature of the substrate influences the fixation of reproductive cells; the lower the capacity of the substrate to absorb water, the greater the number of settled cells (CALLOW et al., 2000), which corroborates the results obtained in the present study.

The continuous flow of water favoured the attachment and growth of algae. For the attachment, the current generated by the inclination of the ramps practically did not affect the flagellar movement of the reproductive cells, because the viscosity of the boundary layer determines a reduction in the speed of the water, allowing the small *Ulva* cells to settle (LAZIER & MANN, 1989). Once fixed and larger in size due to growth, the turbulence of the water flow decreases the boundary layer thickness and consequently the nutrient depletion zone around the seedlings, favouring nutrient absorption (KARDEL, BLERSCH, CARRANO, 2018).

The uptake velocity of both nutrients was directly proportional to the concentration. However, removal efficiency showed an interesting pattern where, after a rapid initial absorption for both nutrients and at the two maturation times (Table 2), there was a decrease in values between 15 to 60 min (Figure 6). After that, there was, in general, an increase in efficiency. This fact is probably associated with the process of adapting the algal cells to the new nutritional condition, where, initially, there is a saturation of the absorption capacity, requiring some time for the synthesis of enzymes and other biochemical processes related to the absorption and assimilation of nutrients. This phenomenon was not verified only for the lowest concentration of ammonium, which showed a progressive increase in removal efficiency since the initial 15 min. In this case, because they are low concentrations, the cells were probably already biochemically structured for rapid absorption.

Other studies showed that higher nutrient concentrations lead to increased removal (ABOLHASANI et al., 2018; POSADAS et al., 2013; YEOMAN et al., 1988). The starvation

period also contributes to accelerate this process (SCHNURR, ESPIE, ALLEN, 2013; WU et al., 2012). However, it is necessary to understand the limits of the system, since there is a maximum physiological removal. Even so, it was possible to verify complete absorption after 24 h for most treatments, which indicates that even with the highest nutrient concentrations the system still operated at optimal capacity.

It is difficult to compare values of uptake velocity and removal efficiency from the literature, as they usually vary among themselves, especially regarding the species, methodology, salinity, type of effluent and concentration. Even so, the results obtained here demonstrated a higher efficiency of the mini-ATS system compared to that developed by SHPIGEL et al.(2019) where ammonium removal varied from 3.48 ± 2.1 to 124.03 ± 4.69 μmol s within 28 h. The same study found a positive correlation between biomass and removal rate, which means that the increase in density resulted in increased absorption velocity. Another study demonstrated that nitrogen absorption by *U. lactuca* was not influenced by carbon availability and light limitation (SHPIGEL et al., 2019). Both nutrients were efficiently absorbed, however ammonium obtained higher values in relation to phosphate, as observed by Gil; Torres and Esteves (2005). This is possibly because ammonium is more easily absorbed, from the energetic point of view, by *Ulva* (HAGLUND & LINDSTROM, 1995; VARELA & HARRISON, 1999).

As observed by Robic et al., (2009), the availability of nutrients did not influence the yield of ulvan. According to the same author, the maximum extraction efficiency corresponds to the initial growth period of the algae. This fact corroborates with the present study, since the *Ulva* biomass used corresponded to a seedling phase. As shown in Table 3, the cultivation in the mini-ATS resulted in good ulvan yield for *U. ohnoi* when compared to other studies. The present study obtained an average yield close to that found in the literature for the same extraction methodology (Table 3). The higher value obtained by Yaich et al. (2013) is probably related to difference in the extraction procedure. Yield differences may be due to species, post-collection treatment and extraction protocol (LAHAYE & ROBIC, 2007), however lower concentrations of ulvan was associated with a high protein content, especially in *U. ohnoi* (LAHAYE & RAY, 1996).

Table 3. Ulvan yields in different cultivation methods.

Species	System	Cultivation Time (Days)	Ulvan Yield	Reference
<i>U. ohnoi</i>	Mini-ATS	48	18.54 ± 3.13%	This work
<i>U. flexuosa</i>	sea	30	15.6 ± 5.2 %	CASTELAR, REIS, DOS SANTOS CALHEIROS, 2014
<i>U. flexuosa</i>	tanks	30	20.2 ± 3.9 %	CASTELAR, REIS, DOS SANTOS CALHEIROS, 2014
<i>U. ohnoi</i>	Land-based cultivation	180	12%	MATA et al., 2016
<i>U. ohnoi</i>	wild	-	31.37%	YAICH et al., 2013

3.5 Conclusions

The present work demonstrated the phytoremediation capacity and biomass production of *U. ohnoi* a process that combines a new cultivation technique, with seeding of reproductive cells in ATS-type systems. The experiments carried out with different kinds of substrates indicated a greater algal coverage for synthetic (nylon) compared to natural (jute). In addition, the continuous flow favoured the settlement, possibly due to the breakage of the boundary layer due to the turbulence of the running water. The use of *Ulva ohnoi* showed excellent results in terms of removal efficiency and removal velocity, especially for ammonium. Ulvan yield also showed competitive levels as an alternative to the use of biomass produced in the system. Improvements in the system are necessary, such as evaluating different density of reproductive cells in the seeding process, following photosynthetic parameters, testing different N/P ratios and possibly using other species. Thus, the system can have its efficiency and viability confirmed and larger scale units can be built and tested.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Ambos os sistemas apresentaram resultados positivos para biorremediação e cultivo de biomassa.
- Capítulo 1
 - É necessária uma reforma do sistema, com melhoramento das bombas e reparo nos encanamentos.
 - A utilização de outro efluentes, com maior carga nutricional, também é interessante para melhor desenvolvimento das algas e da remoção.
 - Para melhor entendimento do processo de remoção de nutrientes, a análise da biomassa é recomendada, seja para avaliar a qualidade da biomassa como para averiguar a efetiva fixação dos nutrientes.
 - A inoculação de espécies pode ser uma alternativa para o TAB, já que diminuiria o tempo de sucessão de uma comunidade clímax de alta eficiência de remoção, representada por *Ulva spp.*
 - Análise de fatores como temperatura do ar e da água e luz, devem ser acompanhados detalhadamente para entendimento dos fatores que influenciam a absorção de nutrientes.
 - Embora amônio seja o nutriente nitrogenado preferencial para algas como *Ulva spp.*, como analito ele apresenta alguns problemas devido a fácil contaminação e sensível influência de processos de decomposição e atividade heterotrófica relacionada a bactérias e pequenos animais que acabam se proliferando no sistema.
- Capítulo 2
 - São necessárias algumas adequações para melhoria do sistema, tal como entrada de água, fixação de malhas e adaptação para alta evaporação.
 - Testes com quantidades diferentes de esporos também são necessários para adequar a área da malha às plântulas.
 - Em trabalhos futuros, é interessante um teste de crescimento total de *Ulva ohnoi*, avaliando remoção e crescimento máximo suportado pelo sistema.
 - Teste de absorção e crescimento também são interessantes para outras espécies, comerciais e não.

- Por fim, testes de aumento de escala do sistema são fundamentais para confirmar a sua viabilidade como sistema de produção de biomassa e biorremediação.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.

ABOLHASANI, M. H. et al. Nutrient removal from municipal wastewater using mixture of two algae , *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Aquatic Science**, v. 9, n. 1, p. 44–50, 2018.

ADEY, W. H. The microcosm: A new tool for reef research. **Coral Reefs**, 1983.

ADEY, W. H. et al. Algal turf scrubber (ATS) flowways on the Great Wicomico River, Chesapeake Bay: Productivity, algal community structure, substrate and chemistry1. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 489–501, 2013.

ADEY, W. H.; KANGAS, P. C.; MULBRY, W. Algal Turf Scrubbing: Cleaning Surface Waters with Solar Energy while Producing a Biofuel. **BioScience**, v. 61, n. 6, p. 434–441, 2011.

ADEY, W. H.; LUCKETT, C.; SMITH, M. Purification of industrially contaminated groundwaters using controlled ecosystems. **Ecological Engineering**, 1996.

ADEY, W.H., LOVELAND, K. **Dynamic Aquaria: Building Living Ecosystems**. [s.l: s.n.]. v. 2nd ed

BARROS, A. C.; GONÇALVES, A. L.; SIMÕES, M. Microalgal/cyanobacterial biofilm formation on selected surfaces: the effects of surface physicochemical properties and culture media composition. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 375–387, 2019.

BAWIEC, A. Efficiency of nitrogen and phosphorus compounds removal in hydroponic wastewater treatment plant. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 16, p. 2062–2072, 2019.

BERGEN, S. D.; BOLTON, S. M.; FRIDLEY, J. L. Design principles for ecological engineering. **Ecological Engineering**, v. 18, n. 2, p. 201–210, 2001.

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa eliciados por *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 318–322, 2010.

BRODIE, JULIET AND MAGGS, CHRISTINE A AND JOHN, DAVID M AND BLOMSTER, J. **Green seaweeds of Britain and Ireland**. [s.l: s.n.].

CALLOW, J. A.; CALLOW, M. E. Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

CALLOW, M. E. et al. Use of self-assembled monolayers of different wettabilities to study surface selection and primary adhesion processes of green algal (Enteromorpha) zoospores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3249–3254, 2000.

CAMERE, S.; KARANA, E. Fabricating materials from living organisms: An emerging design practice. **Journal of Cleaner Production**, v. 186, p. 570–584, 2018.

CARL, C.; DE NYS, R.; PAUL, N. A. The seeding and cultivation of a tropical species of filamentous *Ulva* for algal biomass production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

CASTELAR, B.; REIS, R. P.; DOS SANTOS CALHEIROS, A. C. *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: Recruitment, growth, and ulvan yield. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 1989–1999, 2014.

CHEN, C. L.; QIU, G. H. The long and bumpy journey: Taiwan's aquaculture development and management. **Marine Policy**, v. 48, p. 152–161, 2014.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. **Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts** *Biotechnology Advances*, 2011.

CHRISTOPHER, M. J. B. et al. **Fitoremediation 2**. [s.l: s.n.]. v. 2

CHUNG, I.-K. et al. Application of Seaweed Cultivation to the Bioremediation of Nutrient-Rich Effluent. **Algae**, v. 17, n. 3, p. 187–194, 2002.

CRAGGS, R. J. et al. **ECOLOGICAL ENGINEERING A controlled stream mesocosm for tertiary treatment of sewage** *Ecological Engineering*. [s.l: s.n.].

CRAGGS, R. J. **Wastewater treatment by algal turf scrubbing**. Water Science and Technology. **Anais...**2001

DAVIS, L. S.; HOFFMANN, J. P.; COOK, P. W. **Production and Nutrient Accumulation By Periphyton in a Wastewater Treatment Facility** *Journal of Phycology*, 1990.

EDWARDS, P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. **Aquaculture**, v. 447, p. 2–14, 2015.

FINLAY, J. A. et al. Adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha*. **Biofouling**, v. 18, n. 4, p. 251–256, 2002.

FJELD A, L. A. Genetics of multicellular marine algae. **Lewin RA (ed) The Genetics of Algae**, n. Oxford: Blackwell Scientific, p. 219–235, 1976.

FOLKE, Carl; KÅBERGER, Tomas (Ed.). **Linking the natural environment and the economy: essays from the Eco-Eco Group**. Springer Science & Business Media, 2013.

GAO, G. Developing systems for the commercial culture of *Ulva* species in the UK. n. May, p. 1–191, 2016.

GAO, G. et al. Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios. **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, n. 1, p. 439–447, 2017a.

GAO, G. et al. Reproductive sterility increases the capacity to exploit the green seaweed *Ulva rigida* for commercial applications. **Algal Research**, v. 24, p. 64–71, 2017b.

GAO, G. et al. Intrinsic and extrinsic control of reproduction in the green tide-forming alga, *Ulva rigida*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 139, p. 14–22, 2017c.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, 2016.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspéctos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 36–43, 2005.

GENG, H. et al. Comparative study of the germination of *Ulva prolifera* gametes on various substrates. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 163, p. 89–95, 2015.

GRASSHOFF, P. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie. **FRG**, v. 419, p. 61-72, 1983.

- GUTTMAN, L. et al. Combinations of Ulva and periphyton as biofilters for both ammonia and nitrate in mariculture fishpond effluents. **Algal Research**, v. 34, n. August, p. 235–243, 2018.
- HAGLUND, K.; LINDSTROM, J. The potential use of macroalgae for removal of nutrients from sewage water in East Africa. **Ambio**, v. 24, n. 7–8, p. 510–512, 1995.
- HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M. et al. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 619–628, 2014.
- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, n. March, p. 149–158, 2019.
- HILLMAN, W. S.; JR, D. D. C.; CULLEY, D. D. efficient farming The Uses of Duckweed. 2012.
- HIRAOKA, M.; OKA, N. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new “germling cluster” method. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 1, p. 97–102, 2008.
- HOWARTH, R. W. et al. Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. **Issues in Ecology**, n. 7, p. 1–16, 2000.
- ITOKAZU, A. G. Implantação e avaliação de um Algal Turf Scrubber para remoção de nutrientes. PPG Biotecnologia, 2018. Não publicado.
- KARDEL, K.; BLERSCH, D. M.; CARRANO, A. L. Custom Design of Substratum Topography Increases Biomass Yield in Algal Turf Scrubbers. **Environmental Engineering Science**, v. 35, n. 8, p. 856–863, 2018.
- KEBEDE-WESTHEAD, E.; PIZARRO, C.; MULBRY, W. W. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Elemental composition of algal biomass at different manure loading rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004.
- KRAAN, S. Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. **School of Environmental Sciences**, 2012.

- KUMARI, P. et al. Nitrate and phosphate regimes induced lipidomic and biochemical changes in the intertidal macroalga *Ulva lactuca* (ulvophyceae, chlorophyta). **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 1, p. 52–63, 2014.
- LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green. **Carbohydrate Research** **283**, v. 283, p. 161–173, 1996.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007.
- LAZIER, J. R. N.; MANN, K. H. Turbulence and the diffusive layers around small organisms. **Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers**, v. 36, n. 11, p. 1721–1733, 1989.
- LI, J. et al. Comparison of four aquatic plant treatment systems for nutrient removal from eutrophied water. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 1–7, 2015.
- LIU, D. et al. The world's largest macroalgal bloom in the Yellow Sea, China: Formation and implications. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 129, p. 2–10, 2013a.
- LIU, D. et al. The world's largest macroalgal bloom in the Yellow Sea, China: Formation and implications. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 129, p. 2–10, 2013b.
- LØVLIE, A.; BRYHNI, E. On the Relation Between Sexual and Parthenogenetic Reproduction in Haplo-Diplontic Algae. **Botanica Marina**, v. 21, n. 3, p. 155–164, 1978.
- MAGNUSSON, M. et al. Enrichment processes for the production of high-protein feed from the green seaweed *Ulva ohnoi*. **Algal Research**, v. 41, n. May, p. 101555, 2019.
- MATA, L. et al. The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 365–375, 2016.
- MELTON, J.; GARCIA-SOTO, G. C.; LOPEZ-BAUTISTA, J. M. A new record of the bloom-forming green algal species *Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) in the Caribbean Sea. **Algas**, v. 51, n. July, p. 62–64, 2016.
- MENETREZ, M. Y. **An overview of algae biofuel production and potential environmental impact** **Environmental Science and Technology**, 2012.

MULBRY, W. et al. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource Technology**, 2008.

MULBRY, W. W.; WILKIE, A. C. **Growth of benthic freshwater algae on dairy manures**. Journal of Applied Phycology. **Anais...**2001

MUÑOZ, R.; KÖLLNER, C.; GUIEYSSE, B. Biofilm photobioreactors for the treatment of industrial wastewaters. **Journal of Hazardous Materials**, 2009.

NAGAOKA, M. et al. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 1, p. 19–26, 1999.

NEORI, A. et al. A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 6, p. 543–553, 2003.

NIELSEN, M. M. et al. Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 449–458, 2012.

NIXON, S. W. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. **Ophelia**, v. 41, n. 1, p. 199–219, 1995.

NOEMÍ GIL, M.; IADRAN TORRES, A.; LUIS ESTEVES, J. Uptake of sewage derived nitrogen by *Ulva rigida* (Chlorophyceae) in Bahía Nueva (Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina). **Hydrobiologia**, v. 532, n. 1–3, p. 39–43, 2005.

ODUM, HOWARD T AND SILER, WALTER L AND BEYERS, ROBERT J AND ARMSTRONG, N. Experiments with engineering of marine ecosystems. **Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas**, v. 9, p. 374--403, 1963.

OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review. **Ocean and Coastal Management**, v. 119, n. 2016, p. 244–266, 2016.

PAQUETTE, Alexandre J. **Microbial Community Structure and Dynamics of Artificial, Engineered Microalgal Biofilms**. 2018. Tese de Doutorado.

PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Die Wirkung von sulfonierten Polysacchariden und alkoholischen Extrakten aus der Grünalge *U. Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 116, n. 6, p. 263–270, 2009.

PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E.; MULBRY, W. **Nitrogen and phosphorus removal rates using small algal turfs grown with dairy manure.** [s.l: s.n.].

POSADAS, E. et al. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. **Bioresource Technology**, 2013.

PRABHU, M. et al. Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. **Algal Research**, v. 37, n. December 2018, p. 215–227, 2019.

PRAEGER, C.; DE NYS, R. Seeding filamentous *Ulva tepida* on free-floating surfaces: A novel cultivation method. **Algal Research**, v. 24, p. 81–88, 2017.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray Franklin; EICHHORN, Susan E. **Biología de las plantas.** Reverté, 1992.

RAY, N. E.; TERLIZZI, D. E.; KANGAS, P. C. Nitrogen and phosphorus removal by the Algal Turf Scrubber at an oyster aquaculture facility. **Ecological Engineering**, 2015.

RICCARDI, N.; SOLIDORO, C. The influence of environmental variables on *Ulva rigida* C. Ag. growth and production. **Botanica Marina**, v. 39, n. 1, p. 27–32, 1996.

ROBIC, A. et al. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *ulva* species (chlorophyta) from the Brittany coast¹. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 4, p. 962–973, 2009.

SAUNDERS, G. W.; KUCERA, H. An evaluation of *rbcl*, *tufA*. **UPA, LSU and ITS as DNA barcode**, 2010.

SAHOO, DINABANDHU; YARISH, CHARLES. **Mariculture of seaweeds. Phycological Methods: Algal Culturing Techniques.** [s.l: s.n.].

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 337–344, 2013.

SHAHAR, B. et al. Changes in metabolism, growth and nutrient uptake of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to nitrogen source. **Algal Research**, v. 46, n. December 2019, p. 101781, 2020.

SHPIGEL, M. et al. Is *Ulva* sp. able to be an efficient biofilter for mariculture effluents? **Journal of Applied Phycology**, n. August 2018, p. 2449–2459, 2019.

SIVILLE, B.; BOEING, W. J. Optimization of algal turf scrubber (ATS) technology through targeted harvest rate. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, n. December 2019, p. 100360, 2020.

SLADECKOVA, A., MARVAN, P., VYMAZAL, J. **The utilization of periphyton in waterworks pre-treatment for nutrient removal from enriched influents**. In: Wetzel ed. [s.l.: s.n.].

SMITH, V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication : impacts of excess nutrient inputs on freshwater , marine , and terrestrial ecosystems. v. 100, 1999.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. Determination of reactive silicate. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**, v. 167, p. 65–70, 1972.

SUN, K. M. et al. Responses of *Ulva prolifera* to short-term nutrient enrichment under light and dark conditions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 163, p. 56–62, 2015.

TANNER, C. C. Plants for constructed wetland treatment systems - A comparison of the growth and nutrient uptake of eight emergent species. **Ecological Engineering**, v. 7, n. 1, p. 59–83, 1996.

THOMAS, T. E.; HARRISON, P. J. 1-S2.0-0022098187901183-Main. v. 107, 1987.

VARELA, D. E.; HARRISON, P. J. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliania huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. **Marine Ecology Progress Series**, v. 186, n. 1990, p. 67–74, 1999.

- WHEELER, W. N. Effect of boundary layer transport on the fixation of carbon by the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. **Marine Biology**, v. 56, n. 2, p. 103-110, 1980.
- WHITTON, R. et al. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. **Water Research**, v. 91, p. 371–378, 2016.
- WU, Y. H. et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 193–198, 2012.
- XIAO, J. et al. Effect of temperature, salinity and irradiance on growth and photosynthesis of *Ulva prolifera*. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 35, n. 10, p. 114–121, 2016.
- YAICH, H. et al. Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 375–382, 2013.
- YEOMAN, S. et al. The removal of phosphorus during wastewater treatment: A review. **Environmental Pollution**, v. 49, n. 3, p. 183–233, 1988.
- EKONG, Joseph et al. Influence of three-dimensional features of a woven-fabric substrate on benthic algal biomass production. **Algal Research**, v. 44, p. 101661, 2019.

Anexo I

1.1 Tabela de vazão

Vazão de água para cada rampa com malha nos experimentos realizados.

	NYL	PVC
23.11.18	0.45	0.42
28.11.18	0.44	0.40
06.12.18	0.41	0.38

	BUC	JUT
24.04.19	0.36	0.36
01.05.19	0.26	0.26
02.05.19	-	0.31