



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Ana Paula Mariane de Moraes

Cultivo multitrófico integrado de camarão, tilápia e macroalga (*Ulva ohnoi*) em sistema de bioflocos: efeito da salinidade e densidade de cultivo das macroalgas

Florianópolis
2024

Ana Paula Mariane de Moraes

Cultivo multitrófico integrado de camarão, tilápia e macroalga (*Ulva ohnoi*) em sistema de bioflocos: efeito da salinidade e densidade de cultivo das macroalgas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Coorientador: Marco Antonio de Lorenzo, Dr.

Florianópolis

2024

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

Morais, Ana Paula Mariane de

Cultivo multitrófico integrado de camarão, tilápia e macroalga (*Ulva ohnoi*) em sistema de bioflocos: efeito da salinidade e densidade de cultivo das macroalgas / Ana Paula Mariane de Moraes ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, coorientador, Marco Antonio de Lorenzo, 2024.

56 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Biomassa. 3. Clorofila a. 4. Retenção de nutrientes. I. Vieira, Felipe do Nascimento . II. Lorenzo, Marco Antonio de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Ana Paula Mariane de Moraes

Cultivo multitrófico integrado de camarão, tilápia e macroalga (*Ulva ohnoi*) em sistema de bioflocos: efeito da salinidade e densidade de cultivo das macroalgas

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 15 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Gabriele Rodrigues de Lara, Dra.
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Prof. Luís Henrique da Silva Poersch, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande

Bruno Corrêa da Silva, Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Minha família, mãe Dione, ao meu pai João Bosco, ao meu irmão Philipe, por todo o apoio, carinho e amor de sempre;

Ao meu orientador Felipe pela orientação, paciência e ensinamentos;

Ao meu coorientador Marco Antonio;

Ao programa de pós-graduação em aquicultura;

A CAPES, pela bolsa de doutorado;

A FAPESC e CNPq pelo financiamento;

Ao laboratório de camarões marinhos LCM aos amigos de laboratório e funcionários que ajudaram na execução dos experimentos.

RESUMO

O objetivo da tese foi determinar a viabilidade do uso da macroalga *Ulva ohnoi* em sistema integrado com peixes e camarões cultivados em sistema BFT utilizando a tilápia (*Oreochromis niloticus*) como consumidores orgânicos e a macroalga (*Ulva ohnoi*) como consumidor inorgânico. Foram realizados dois experimentos onde o primeiro teve como objetivo determinar os limites suportados de salinidade da macroalga *Ulva ohnoi* em um sistema de bioflocos. O experimento constituiu de cinco tratamentos e três repetições cada, totalizando 15 unidades experimentais denominados: 1) salinidade 10 ‰, 2) salinidade 15 ‰, 3) salinidade 20 ‰, 4) salinidade 25 ‰ e 5) salinidade 30 ‰. As unidades experimentais tinham 40 litros volume útil, aeração, aquecedores e as macroalgas foram estocadas a uma densidade de 2 g L⁻¹ e o estudo teve a duração de 30 dias. Anterior ao início do experimento foi realizada a aclimação das macroalgas para atingir a salinidade referente a cada tratamento. Semanalmente a água dos tanques das algas era renovada. Foram analisados amônia, nitrito, nitrato, ortofosfato, alcalinidade, pH, clorofila e carotenoides e compostos fenólicos. Através desse trabalho conclui-se que na salinidade 15 ‰ diminuiu o crescimento e que é possível produzir macroalgas sem afetar seu crescimento e absorção de nutrientes nas salinidades 20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰. Assim, levando em consideração o objetivo de integrar essa espécie, recomendamos a utilização da salinidade entre 20 ‰ e 30 ‰. Os demais parâmetros de qualidade de água não foram alterados em decorrência da salinidade, entretanto, toda biomassa de macroalga do tratamento 10 ‰ morreu nos primeiros dias experimentais. O segundo trabalho teve como objetivo avaliar o sistema de aquicultura do IMTA em diferentes densidades de macroalgas (*U. ohnoi*). O camarão (*P. vannamei*) foi utilizado como espécie principal e a tilápia (*O. niloticus*) como consumidor orgânico. As densidades testadas foram de sem macroalga, macroalga 1 g L⁻¹ e macroalga 2 g L⁻¹ de macroalgas em sistema de bioflocos. O delineamento experimental construiu de três tratamentos e quatro repetições denominados: sem macroalgas, macroalgas 1 g L⁻¹ e macroalgas 2 g L⁻¹. Cada unidade experimental constituía de um tanque de 800 L para os camarões, um tanque de 90 L para os peixes e um tanque de 50 L para as macroalgas onde apresentava uma bomba que fazia a troca de água entre o tanque dos camarões e peixes e uma vez por semana realizava a troca de água das macroalgas. A salinidade foi mantida em 20 ‰ para as macroalgas e 18 ‰ para camarões e peixes. Os resultados obtidos no presente estudo comprovam que a presença de *U. ohnoi* no sistema IMTA com *P. vannamei* e *O. niloticus* beneficiou o desempenho de todas as espécies através da recuperação de nitrogênio e fósforo e aumento da produtividade total, gerando um ganho ecológico. Considerando que a biomassa final de *U. ohnoi* foi semelhante, recomenda-se a utilização de densidade de 2 g L⁻¹ em sistema multitrófico com camarão e tilápia, uma vez que a recuperação de nutrientes por peixes foi maior nesta densidade e para os camarões uma maior recuperação para fósforo.

Palavras-chave: Aquicultura; Biomassa; Clorofila a; Retenção de nutrientes.

ABSTRACT

This thesis aimed to determine the viability of using seaweed *Ulva ohnoi* in an integrated system with fish and shrimp cultured in a biofloc system, adopting tilapia (*Oreochromis niloticus*) as an organic consumer and seaweed (*Ulva ohnoi*) as an inorganic consumer. The study consisted of two experiments. The first aimed to determine the salinity tolerance seaweed *U. ohnoi* can support in a biofloc system. The experiment was carried out for 30 days and consisted of five treatments and three replicates each, a total of 15 experimental units: 1) Salinity 10 ‰; 2) Salinity 15 ‰; 3) Salinity 20 ‰; 4) Salinity 25 ‰; and 5) Salinity 30 ‰. The experimental units had 40 liters, aeration, heaters, and seaweed were stocked at a density of 2 g L⁻¹. Before the beginning of the experiment, *U. ohnoi* was acclimatized to reach the salinity corresponding to each treatment. The water in seaweed tanks was renewed weekly. Ammonia, nitrite, nitrate, orthophosphate, alkalinity, pH, chlorophyll, carotenoids, and phenolic compounds were analyzed. Through this work, it was concluded at salinity 15 ‰ *U. ohnoi* decreased its growth, and it is possible to cultivate this seaweed without affecting its growth and nutrient absorption at salinities 20 ‰, 25 ‰, and 30 ‰. Therefore, for integration of this species, it is recommended to use salinity from 20 ‰ to 30 ‰. The salinities did not change the other water quality parameters, however, at the salinity 10 ‰, all seaweed biomass died in the first experimental days. The second experiment evaluated the IMTA system in different densities of seaweed (*U. ohnoi*). Shrimp (*P. vannamei*) was the main species, and tilapia (*O. niloticus*) was an organic consumer. The densities tested were 0, 1, and 2 g L⁻¹ of seaweed in a biofloc system. The experimental design consisted of three groups with four replicates each: 1) No seaweed; 2) Seaweed 1 g L⁻¹; and 3) Seaweed 2 g L⁻¹. Each experimental unit consisted of an 800 L tank for shrimp, 90 L for tilapia, and 50 L for seaweed, with a submerged pump to exchange water between the shrimp and fish tank, and once a week, water from the seaweed tank was exchanged. Salinity was maintained at 20 ‰ for seaweed and 18 ‰ for shrimp and fish. The results obtained in the present study prove that the presence of *U. ohnoi* in the IMTA system with *P. vannamei* and *O. niloticus* benefited the performance of all species through nitrogen and phosphorus recovery and an increase in total productivity, generating an ecological gain. Considering that *U. ohnoi* final biomass was similar, it is recommended to use a density of 2 g L⁻¹ in a multitrophic system with shrimp and tilapia since the nutrient recovery by fish was higher at this density and shrimp had a higher phosphorus recovery.

Keywords: Aquaculture; Biomass; Chlorophyll a; Nutrient recovery.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	CULTIVO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS	9
1.2	AQUICULTURA MULTITRÓFICA INTEGRADA (AMTI).....	10
1.3	CAMARÃO	11
1.4	TILÁPIA	12
1.5	MACROALGAS	12
1.6	OBJETIVOS	13
1.6.1	Objetivo geral	13
1.6.2	Objetivos específicos	13
1.7	ESTRUTURA DO TRABALHO	14
2	ARTIGOS CIENTÍFICOS	15
2.1	CAPÍTULO I: CULTIVO DE MACROALGA <i>ULVA OHNOI</i> EM DIFERENTES SALINIDADES COM BIOFLOCOS.....	15
2.1.1	Introdução	17
2.1.2	Material e métodos	19
2.1.2.1	<i>Localização</i>	19
2.1.2.2	<i>Material biológico</i>	19
2.1.2.3	<i>Delineamento experimental</i>	19
2.1.2.4	<i>Inoculo de bioflocos</i>	20
2.1.2.5	<i>Manejo de qualidade de água</i>	20
2.1.2.6	<i>Clorofila e carotenoides</i>	20
2.1.2.7	<i>Compostos fenólicos</i>	21
2.1.2.8	<i>Análise estatística</i>	21
2.1.3	Resultados	22
2.1.3.1	<i>Qualidade de água</i>	22
2.1.3.2	<i>Desempenho algal</i>	23
2.1.3.3	<i>Clorofila, carotenoides e compostos fenólicos na <i>Ulva ohnoi</i></i>	24
2.1.4	Discussão	24
2.1.5	Conclusão	26
2.1.6	Referências bibliográficas	27

2.2	CAPÍTULO II: INTEGRATED MULTITROPHIC AQUACULTURE SYSTEM APPLIED TO SHRIMP, TILAPIA, AND SEAWEED (<i>ULVA OHNOI</i>) USING BIOFLOC TECHNOLOGY	31
2.2.1	Introduction	33
2.2.1.1	<i>Material and methods</i>	34
2.2.1.1.1	Study site.....	34
2.2.1.1.2	Biological material	35
2.2.1.1.3	Experimental design.....	35
2.2.1.1.4	Stocking.....	36
2.2.1.1.5	Feeding	36
2.2.1.1.6	Water quality and total suspended solids	37
2.2.1.1.7	Shrimp, tilapia, and seaweed performance	37
2.2.1.1.8	Nitrogen and phosphorus recovery	38
2.2.1.1.9	Mass balance	38
2.2.1.1.10	Statistical analysis	39
2.2.1.2	<i>Results</i>	39
2.2.1.2.1	Water quality parameters	39
2.2.1.2.2	Animal and seaweed performance	40
2.2.1.2.3	Nitrogen and phosphorus recovery	41
2.2.1.2.4	Mass balance	42
2.2.1.3	<i>Discussion</i>	44
2.2.1.4	<i>Conclusion</i>	47
2.2.1.5	<i>Formatting of funding sources</i>	47
2.2.1.6	<i>Declaration of Competing Interest</i>	47
2.2.1.7	<i>References</i>	48
3	CONCLUSÃO GERAL.....	52
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CULTIVO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

O sistema de bioflocos (Biofloc Technology System – BFT) usa uma tecnologia com baixa ou nenhuma troca de água, com a finalidade de favorecer a proliferação de microrganismos através de fertilização de carbono na forma orgânica ou inorgânica (Crab et al., 2010). Isso resulta no aumento da produtividade, diminuição dos impactos ambientais, reúso da água por diversos ciclos, manutenção da qualidade de água e redução dos efluentes gerados (Avnimelech, 1999; Ballester et al., 2010; Wasielesky et al., 2006).

Os microrganismos atuam metabolizando o nitrogênio proveniente da excreção, alimentos não consumidos e resíduos orgânicos (Timmons & Ebeling, 2010). Através deste processo, o nitrogênio na forma de amônia é removido e os resíduos são reciclados servindo como fonte suplementar de alimentos para as espécies cultivadas (Browdy et al., 2012).

Dois principais grupos de bactérias atuam na remoção deste composto através das vias heterotrófica e quimioautotrófica. Na via heterotrófica, a adição de uma fonte de carbono orgânico (C:N = 15-20:1) é realizada para estimular a proliferação de bactérias heterotróficas. Essas atuam na assimilação de amônia e consequente formação da biomassa bacteriana (De Schryver et al., 2008; Serra et al., 2015). Na via quimioautotrófica, ocorre a transformação completa da amônia em nitrato mediante a ação de bactérias nitrificantes pertencentes a dois grupos. O primeiro grupo é responsável pela oxidação da amônia a nitrito, já o segundo grupo realiza a oxidação do nitrito a nitrato. Para isso é necessário a adição de uma fonte de carbono inorgânico (Ebeling et al., 2006).

Além do nitrogênio, o fósforo e os sólidos suspensos totais tendem a se acumular no sistema devido reúso de água por diversos ciclos produtivos. O nitrato é o resultado do processo de nitrificação e apresenta toxicidade quando ultrapassa concentrações 150 mg L^{-1} (Furtado et al., 2015), afetando a sobrevivência dos organismos devido ao seu efeito sobre a osmorregulação impedindo o transporte de oxigênio para os tecidos e indisponibilizando oxigênio para o metabolismo (Tahon et al., 1988). Resultando em mortalidades, bem como inviabilizando a utilização da água por diversos ciclos de produção (Kuhn et al., 2010).

Apesar de diminuir a quantidade de efluentes, o sistema produz uma elevada quantidade de sólidos suspensos totais (SST). Esses em excesso podem afetar o desempenho zootécnico dos camarões, sendo necessária a sua remoção do ambiente de produção. É recomendado, portanto, mantê-los abaixo de 600 mg L^{-1} (Gaona et al., 2011; Schweitzer et al., 2013). O excesso de sólidos é removido com auxílio de decantadores, entretanto o efluente resultante é rico em nutrientes, especialmente nitrogênio (N) e fósforo (P), que tem suas concentrações aumentadas ao longo do ciclo de produção. No entanto, quando descartado de maneira inadequada, esse efluente pode contaminar o ambiente.

Nesse contexto, o desafio do sistema BFT é torná-lo mais sustentável, com o aproveitamento dos efluentes gerados durante o ciclo produtivo. Uma alternativa seria a utilização do conceito de aquicultura multitrófica integrada (AMTI), no intuito de diminuir a alta carga de nutrientes orgânicos e inorgânicos gerados no sistema BFT. Isso é possível, uma vez que o modelo utiliza animais de diferentes níveis tróficos compartilhando da mesma água e, conseqüentemente, os nutrientes em um mesmo sistema produzindo uma ou duas espécies a mais sem gastos extras.

1.2 AQUICULTURA MULTITRÓFICA INTEGRADA (AMTI)

O conceito de AMTI surgiu de observações no ambiente natural e foram aplicados na aquicultura, onde os rejeitos orgânicos e inorgânicos da espécie principal são utilizados por outras espécies de nível trófico inferior (Chopin et al., 2001). Os primeiros sistemas AMTI foram desenvolvidos no mar, com o cultivo de salmão em gaiolas flutuantes, integrado com mexilhões (consumidor orgânico) e macroalgas (consumidor inorgânico). Os peixes são alimentados e os rejeitos desse cultivo que é formado por produtos orgânicos e inorgânicos, sendo as partes orgânicas carregadas pelas correntes marinhas e consumidas pelos mexilhões e a parte inorgânica consumida pelas macroalgas.

É uma abordagem inovadora na criação de organismos aquáticos, que visa aproveitar os benefícios das interações ecológicas entre diferentes espécies em um sistema integrado. Nesse sistema, várias espécies são cultivadas em conjunto, formando uma cadeia trófica em que os subprodutos de uma espécie são aproveitados como nutrientes por outras, criando um ciclo fechado e sustentável.

Diversos estudos têm explorado diferentes combinações de animais no sistema de aquicultura multitrófica integrada (AMTI). Por exemplo, Troel et al. (2003) investigaram a integração de peixes, crustáceos, moluscos e macroalgas e comprovaram que o sistema AMTI pode ser uma alternativa para a absorção de compostos inorgânicos nos sistemas de cultivo convencionais. Costa et al. (2021) adicionaram camarões e *Crassostrea gasar* ao sistema BFT com intuito de reduzir os SST, entretanto, a *C. gasar* não foi uma ferramenta eficaz para absorção dos nutrientes orgânicos. Legarda et al. (2021) implementaram a combinação de camarões, tainhas (*Mugil liza*) e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos e observaram que a integração da macroalga é factível como também o incremento da produtividade, maior retenção de nitrogênio e fósforo e maior concentração de clorofila e carotenoides da *U. fasciata*. Poli et al. (2019) integraram camarões, tilápias e planta halófito (*Sarcocornia ambigua*) e constataram uma maior produtividade no sistema AMTI e menor concentração de nitrato.

O sistema integrado de aquicultura multitrófica (AMTI) surge como uma alternativa para lidar com os excedentes gerados no sistema de Bioflocos (BFT). Nesse contexto, é fundamental escolher cuidadosamente as espécies a serem integradas, levando em consideração a maximização do aproveitamento dos efluentes gerados. A salinidade é um fator limitante nesse processo, em que o desafio para utilização do AMTI é selecionar espécies que apresentam crescimento ótimo em salinidades diferentes, integrando um mesmo sistema sem afetar seu desempenho e utilizando os resíduos da espécie principal. No entanto, algumas espécies de camarão, tilápia e macroalga com tolerância a variação de salinidade mostram-se promissoras para o sistema AMTI.

1.3 CAMARÃO

O camarão *Penaeus vannamei* é a principal espécie do sistema, e amplamente produzida em o todo mundo (FAO, 2022). A faixa de salinidade suportada para a espécie 0 a 50 ‰ (PILLAY 1990), todavia a faixa ideal de salinidade para a espécie varia entre 15 e 25 (VINATEA, 1997) A espécie destaca-se devido sua rusticidade, pois pode ser cultivada nas mais diversas densidades de estocagens, adaptar-se rapidamente ao ambiente, além de apresentar altas taxas de crescimento, sobrevivência e grande aceitação no mercado, possibilitando sua produção em

sistemas como monocultivo, policultivo e cultivos integrados (Barbieri Jr.; Ostrensky, 2002; Neori et al., 2004).

1.4 TILÁPIA

A tilápia *Oreochromis niloticus* é uma espécie de peixe cultivada mundialmente devido a sua rusticidade e bom desempenho zootécnico, além de se adaptar às variações ambientais e salinidades (Souza et al., 2005), podendo suportar até 36 ‰ quando aclimatadas de forma adequada e gradual, sendo a faixa ótima de salinidade para espécie variando entre 5 e 10 ‰ (Al-Amoudi, 1987; El Sayed, 2006). Flutuações nas concentrações de salinidade podem causar estresse nos animais, alterando seu estado homeostático (Baldisserotto 2009). Além disso, é uma espécie já cultivada em sistema de bioflocos devido a sua adaptabilidade e capacidade de utilizar os flocos como fonte de alimento (Crab et al., 2009; Poli et al., 2019a) demonstrando seu potencial para utilizar os excedentes orgânicos do sistema.

1.5 MACROALGAS

As macroalgas são consideradas biofiltros eficientes devido sua capacidade de absorver nutrientes dissolvidos na água, em especial nitrogênio e fósforo (Troell et al., 2009). Esses nutrientes absorvidos são assimilados, armazenados e convertidos em biomassa (Hanisak & Samuel, 1983). No gênero *Ulva*, podemos encontrar a espécie *Ulva ohnoi*, que possui distribuição global. Essa espécie é conhecida por ser invasora e oportunista. Destaca-se devido sua capacidade de atingir altas biomassas com elevado teor de proteínas (Pedersen, 1995; Rivers E Peckol, 1995; Robertson-Andersson 2003).

Diversos fatores ambientais podem afetar o crescimento e a absorção de nutrientes da *Ulva*. Dentre eles, a salinidade é considerada a mais importante, devido à sua redução afetar negativamente o crescimento e a absorção de nutrientes (Fong et al., 1996, Martins et al., 2001). Logo, as espécies do gênero *Ulva* apresentam uma tolerância a salinidades variando entre 20 e 40 ‰ (Wu et al., 2018). Deste modo, é possível que as macroalgas tolerem altas concentrações de salinidade e tenham estratégias diferentes para crescimento e absorção de nutrientes. As algas verdes apresentam a capacidade de suportar variações de salinidade e apresentam

crescimento oportunista, logo são capazes de rápida colonização e crescimento quando as condições são favoráveis (Littler, 1980; Msuya; Neori, 2008).

As macroalgas do gênero *Ulva* estão sujeitas a variações ambientais, como chuvas, exposição solar e mudanças nas marés, que podem afetar a salinidade do ambiente em que estão presentes. Devido a essas condições, as macroalgas desenvolveram mecanismos de adaptação para lidar com as constantes flutuações na salinidade. Como resultado, elas possuem uma capacidade notável de se aclimatar a diferentes níveis de salinidade, seja baixa ou alta (Lobban e Harrison, 1994). Taylor et al. (2001) conduziram um estudo, utilizando quatro variedades de *Ulva* (*U. curvata*, *U. rígida*, *U. compressa* e *U. linza*), sobre a tolerância das macroalgas às variações de salinidade, expondo-as a uma faixa de salinidade de 3 a 34 ‰. Inicialmente, as macroalgas estavam em uma salinidade de 32,3 e 34,7 ‰. Surpreendentemente, as espécies demonstraram uma notável capacidade de tolerar as diferentes concentrações de salinidade e continuaram a crescer. Estudos realizados comprovaram que a *Ulva* tem uma tolerância à salinidade mais ampla do que algas estritamente marinhas (Choi, 2010). Além disso, as espécies *Ulva prolifera* e *U. compressa* apresentaram maiores taxas de crescimento em salinidade 20 ‰ (Wu et al., 2018).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Determinar a viabilidade do uso da macroalga *Ulva ohnoi* em sistema integrado com peixes e camarões cultivados em sistema BFT.

1.6.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros de qualidade de água e produtivos da macroalga *U. ohnoi* cultivados em bioflocos em diferentes salinidades (10, 15, 20, 25 e 30 ‰).

Comparar as diferentes densidades da macroalga *U. ohnoi* (1 e 2 g L⁻¹) no cultivo integrado do camarão-branco-do-pacífico, tilápia-do-Nilo sobre os parâmetros de qualidade de água, produtivos e retenção de nitrogênio e fósforo.

1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO

A tese está dividida em dois capítulos referentes aos artigos científicos. O primeiro capítulo tem como título “Cultivo de macroalga *Ulva ohnoi* com diferentes salinidades em bioflocos” está formatado nas normas da revista Boletim do Instituto de Pesca. O segundo capítulo tem como título “Integrated multitrophic aquaculture system applied to shrimp, tilapia, and seaweed (*Ulva ohnoi*) using biofloc technology” está publicado na revista Aquaculture.

2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1 CAPÍTULO I: CULTIVO DE MACROALGA *ULVA OHNOI* EM DIFERENTES SALINIDADES COM BIOFLOCOS

Artigo formatado com as normas da revista Boletim do Instituto de Pesca, fator de impacto 0.8.

Resumo

O crescimento acelerado das macroalgas está relacionado às altas taxas de fotossíntese e capacidade de absorção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo dissolvido na água, fazendo com que elas sejam visadas para integrar cultivos multitróficos com o intuito de absorver nutrientes dissolvidos. O objetivo deste trabalho foi determinar os limites suportados de salinidade da macroalga *Ulva ohnoi* em um sistema de bioflocos. O delineamento experimental constituiu de cinco tratamentos e três repetições cada, totalizando 15 unidades experimentais denominados: 10 ‰: salinidade 10 ‰, 15 ‰: salinidade 15 ‰; 20 ‰: salinidade 20 ‰; 25 ‰: salinidade 25 ‰ e 30 ‰: salinidade 30 ‰. Tanques com 40 litros volume útil, foram alocados em estufa e o estudo teve a duração de 30 dias. Previamente ao início do experimento foi realizada a aclimação das macroalgas para atingir a salinidade referente a cada tratamento. Inicialmente foi adicionado 60 % de água de bioflocos filtrado (filtro Bag) e o restante preenchido com água do mar, a fim de atingir a salinidade inicial de 30 ‰ para todos os tratamentos e diariamente diminuída duas partes da salinidade. As macroalgas foram estocadas a uma densidade de 2 g L⁻¹ e semanalmente a água dos tanques das algas era renovada. Foram analisados amônia, nitrito, nitrato, ortofosfato, alcalinidade, pH, clorofila e carotenoides e compostos fenólicos. Os parâmetros de qualidade de água não foram afetados em decorrência das salinidades, entretanto, o tratamento 10 ‰ teve mortalidade total das macroalgas, enquanto o tratamento 15 ‰ obteve um desempenho inferior para o ganho de biomassa e taxa de crescimento para em relação aos demais tratamentos testados (20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰). Com esse estudo observamos que é possível produzir macroalgas sem afetar seu crescimento e absorção de nutrientes em salinidades 20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰.

Palavras-chave: Biomassa; Compostos antioxidantes; Nitrogênio.

2.1.1 Introdução

O gênero *Ulva*, é reportado como um dos gêneros marinhos e estuarinos mais numerosos (Kraft et al., 2010). É considerado cosmopolita por ser encontrado no ambiente marinho, regiões entremarés, estuarinas e salobras. Apresenta crescimento oportunista, ou seja, consegue crescer nas mais diversas condições climáticas e ecológicas, fazendo com que seja adequado para cultivo em praticamente todos os lugares (Msuya e Neori, 2002; Bem-ari et al., 2014).

As macroalgas marinhas são relatadas como fonte de biomassa para a produção de alimentos, ração animal, ingredientes bioativos, produtos farmacêuticos e cosméticos (Bobin-Dubigeon et al., 1997; Cumashi et al., 2007; Legarda et al., 2021). Além disso, a espécie *Ulva ohnoi* foi descrita no Japão e é considerada invasora em várias partes do mundo, apresentando em sua composição proteínas, vitaminas, sais minerais, aminoácidos e ácidos graxos poliinsaturados (Angell et al., 2015; Moustafa e Eladel 2016).

Algumas espécies de macroalgas conseguem adaptar-se a condições adversas, podendo resistir a privação de luz por longos períodos (Santelices et al., 2002), diferentes concentrações de salinidade (0,5 a 49 ‰) (Rybak 2015) ou nutrientes (Luo et al., 2012).

Em áreas influenciadas por estuários ou marés, as macroalgas do gênero *Ulva* estão sujeitas a variações ambientais, como chuvas, exposição solar e flutuações das marés, que afetam a salinidade do ambiente em que estão inseridas. Como resultado, essas macroalgas desenvolveram mecanismos de adaptação para lidar com as constantes mudanças na salinidade, o que lhes confere uma notável capacidade de aclimatação a salinidades baixas ou altas (Lobban e Harrison, 1994). Em um estudo realizado por Taylor et al. (2001), foram examinadas quatro variedades de *Ulva* (*U. curvata*, *U. rigida*, *U. compressa* e *U. linza*) em relação à tolerância a variações de salinidade. Todas as espécies foram capazes de tolerar salinidades entre 3 e 34 ‰, todavia as maiores taxas de crescimento foram registradas para algas cultivadas na faixa de 6,8 a 27 ‰.

O rápido crescimento das macroalgas é atrelado as altas taxas de fotossíntese e capacidade de absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo dissolvido (Naldi e Wheeler, 2002). Estudos mostram a preferência da *Ulva* pelo nitrogênio na forma de amônia e nitrato. Ale et al. (2011) avaliaram a preferência de *U. lactuca* por amônia e

nitrato e verificaram um maior crescimento nos indivíduos cultivados com amônia $16,4 \pm 0,18 \text{ \% dia}^{-1}$ em comparação ao nitrato $9,4 \pm 0,72 \text{ \% dia}^{-1}$. Para o fósforo, as macroalgas absorvem principalmente o ortofosfato, podendo ter seu crescimento limitado pelo fósforo principalmente em ambientes onde as concentrações de nitrogênio são baixas (Lobban e Harrison, 1994). Por outro lado, nos sistemas aquícolas o nitrogênio é o nutriente mais abundante podendo ser utilizado para produção de macroalgas.

Todavia, o sistema BFT tende ao acúmulo de nitrato no ambiente de produção devido a preferência de utilizar a via quimioautotrófica, o excesso de nitrato resulta em mortalidades ou perda de desempenho dos organismos cultivados neste sistema quando em elevadas concentrações, bem como na inviabilidade da água por diversos ciclos de produção (Kuhn et al., 2010). Além disso, o sistema de bioflocos também é rico em fósforo, quando liberados no meio ambiente sem prévio tratamento podem causar eutrofização do meio adjacente e gerando impactos negativos.

Assim, utilizando os conceitos de aquicultura multitrófica (AMTI) para diminuir os excedentes produzidos no sistema BFT, podemos torná-lo um sistema ainda mais sustentável. Para isso, o modelo de cultivo deverá integrar animais de diferentes níveis tróficos compartilhando da mesma água de produção, e conseqüentemente os nutrientes em um mesmo sistema. Desta forma, os resíduos orgânicos e inorgânicos gerados tornam-se recursos (alimento ou fertilizante) para outras espécies de nível trófico inferior que podem ser incluídas no sistema (Chopin et al., 2001).

Logo, as macroalgas desempenham um papel crucial em sistemas AMTI devido sua capacidade de absorver compostos nitrogenados e fosfato (Troell et al., 2009), além de alcançar altas biomassas com elevado teor de proteínas (Robertson-Andersson 2003). *Ulva ohnoi* é uma espécie de macroalga que tem despertado interesse no cultivo devido a sua capacidade de se adaptar a uma ampla faixa de salinidade. Além disso, vem despertando interesse para integrar com outras espécies como o cultivo de camarões em baixa salinidade. É essencial, portanto, compreender os limites de salinidade suportados pelas macroalgas cultivadas em sistemas BFT.

Com base nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar os limites suportados de salinidade da macroalga *Ulva ohnoi* cultivadas em um sistema de bioflocos.

2.1.2 Material e métodos

2.1.2.1 Localização

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos – LCM, pertencente ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, localizado em Florianópolis – SC, Brasil, (longitude e latitude - 27.58207, -48.43958), realizado em março de 2021 com duração de 30 dias.

2.1.2.2 Material biológico

As macroalgas da espécie *U. ohnoi* foram coletadas na lagoa de sedimentação do Laboratório de Moluscos Marinhos (Florianópolis, Santa Catarina – Brasil), foram limpas manualmente com água do mar para retirar epífitas e animais aderidos.

2.1.2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental constituiu de cinco tratamentos e três repetições cada, totalizando 15 unidades experimentais denominados: 10 ‰: salinidade 10 ‰, 15 ‰: salinidade 15 ‰; 20 ‰: salinidade 20 ‰; 25 ‰: salinidade 25 ‰ e 30 ‰: salinidade 30 ‰. As unidades experimentais consistiram em tanques quadrados brancos com 40 litros de volume útil que foram alocados em uma estufa para produção de macroalga.

Para a aclimação das macroalgas nas unidades, foi inserido 60 % de água de bioflocos filtrado (filtro Bag – 300 micras) e preenchida com água do mar para atingir a salinidade inicial de 30 ‰ para todos os tratamentos e diariamente duas partes da salinidade foi diminuída até atingir a salinidade referente a cada tratamentos (10,15, 20, 25 e 30 ‰).

As macroalgas foram estocadas a uma densidade de 2 g L⁻¹ com sistema de aeração e aquecimento individuais, os nutrientes foram provenientes do cultivo de camarões em bioflocos, considerando um fotoperíodo e irradiância natural. Semanalmente a água dos tanques das algas foi renovada, assim, um volume de 60

% de inóculo de bioflocos e água salgada e/ou doce foi adicionada para atingir as salinidades dos respectivos tratamentos.

As macroalgas foram pesadas a cada semana para acompanhar o aumento de biomassa, e ao final do experimento, foi considerado a biomassa final (kg), produção (kg m⁻²) e a taxa de crescimento da macroalga segundo Lignell e Perdesén (1989).

$$\left[\left(\frac{M_f}{M_i} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100$$

Sendo: M_f – biomassa final (g); M_i – biomassa inicial (g); t – tempo de cultivo.

2.1.2.4 Inoculo de bioflocos

Caracterização do bioflocos (amônia, nitrito, alcalinidade, pH e salinidade) utilizado como inoculo para encher as unidades experimentais.

Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos da água de bioflocos utilizada como inoculo.

Amônia mg L ⁻¹	Nitrito mg L ⁻¹	Alcalinidade mg L ⁻¹	pH	Salinidade
0,13	0,04	154	8,18	23,9

2.1.2.5 Manejo de qualidade de água

O oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade foram monitorados diariamente com um oxímetro digital (YSI Pro2030) e ajustados quando necessário com a salinidade determinada inicialmente em cada tratamento. A concentração de amônia (N-AT) (Unesco, 1983), nitrito (N-NO₂) (Strickland and Parsons, 1972), o nitrato (N-NO₃) e ortofosfato (P-PO₄) APHA (2012), alcalinidade (CaCO₃) (APHA, 2012), pH (pHmetro Tecnal[®]) foram mensurados duas vezes por semana, um dia antes e depois da troca de água.

2.1.2.6 Clorofila e carotenoides

Para determinar carotenoides e clorofila foram usados 100 µg de massa liofilizada, ao final do experimento. A macroalga foi macerada com 2 ml de metanol.

Após 60 minutos incubadas a 4 °C no escuro, foram medidas as absorvâncias 665 e 652 nm para calcular a clorofila-a ($Chla = 16,51 \times A_{665} - 8,0962 \times A_{652}$); também foi medida a absorvância 450 nm para calcular β -caroteno ($= [A_{450}/2,704 (\mu g)]$ volume/peso, $r^2 = 0,999$), seguindo a metodologia descrita por Porra et al. (1989) e Ritchie (2006).

2.1.2.7 Compostos fenólicos

Ao final do experimento, as amostras de macroalgas foram coletadas, congeladas e posteriormente liofilizadas a -50 °C e 200 μ Hg (liofilizador L101, LIOBRAS). Para o preparo dos extratos 0,15 g de cada amostra liofilizada foram macerados com 3,75 ml de metanol 80 % (v/v), depois foram incubadas por uma hora no escuro, centrifugadas (12.000 g x 10 minutos), após esse processo, o sobrenadante foi coletado para fazer a leitura. O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocateu ($\lambda = 750$ nm), a metodologia está descrita por Schiavon et al. (2012) com modificações. Foi utilizada a curva padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO, USA – 100 – 1250 μ g ml⁻¹, $y = 0.0108X$, $r^2 = 0.999$). Os resultados foram apresentados como μ g de ácido gálico equivalente por g de massa.

2.1.2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene), com a comprovação dessas premissas, será utilizada a Análise de Variância Simples (ANOVA One-way) e teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos. O nível de significância adotado foi de 5 % em todos os casos ($p < 0,05$) (Zar 2010). Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA® versão 13.5.

2.1.3 Resultados

2.1.3.1 Qualidade de água

O oxigênio dissolvido foi mantido em 7 mg L^{-1} , a temperatura em $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e a salinidade de acordo com cada tratamento. Os parâmetros de qualidade de água amônia, nitrito, nitrato, fosfato e pH logo após a troca de água das unidades experimentais não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, apresentando diferença estatística somente para alcalinidade (Tabela 1), um dia antes a troca de água apresentou diferença estatística para nitrito, nitrato e pH (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros físicos e químicos da água depois da adição do inoculo ao longo do período experimental de 30 dias de cultivo de *U. ohnoi* com água de bioflocos em diferentes salinidades (10 ‰; 15 ‰; 20 ‰; 25 ‰ e 30 ‰).

Tratamento	10 ‰	15 ‰	20 ‰	25 ‰	30 ‰	Valor <i>p</i>
Amônia (mg L^{-1})	0,19±0,0	0,06±0,05	0,14±0,14	0,18±0,13	0,07±0,05	0,209
Nitrito (mg L^{-1})	0,02±0,0	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,08±0,11	0,529
Nitrato (mg L^{-1})	3,10±0,0	3,95±1,08	2,90±0,67	3,45±0,87	4,25±0,78	0,159
Fosfato (mg L^{-1})	0,25±0,0	0,50±0,24	0,47±0,19	0,52±0,20	0,50±0,20	0,422
Alcalinidade (mg L^{-1})	80,0±0,0 ^a	89,50±8,2 ^{3^a}	109,00±8,25 ^b	121,50±5,97 ^{bc}	129,00±10,52 ^c	<0,001
pH	8,25±0,0	8,20±0,06	8,19±0,07	8,19±0,06	8,17±0,07	0,574

Dados são apresentados em Média ± Desvio Padrão.

Tabela 3. Parâmetros físicos e químicos da água antes da adição do inoculo ao longo do período experimental de 30 dias de cultivo de *U. ohnoi* com água de bioflocos em diferentes salinidades (10 ‰; 15 ‰; 20 ‰; 25 ‰ e 30 ‰).

Tratamento	10 ‰	15 ‰	20 ‰	25 ‰	30 ‰	Valor p
Amônia (mg L ⁻¹)	0,15±0,15	0,10±0,14	0,16±0,23	0,15±0,15	0,15±0,09	0,888
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,16±0,13 _a	0,67±0,47 ^b	0,23±0,14 ^a	0,20±0,05 ^a	0,17±0,07 ^a	<0,001
Nitrato (mg L ⁻¹)	3,87±1,62 _{ab}	4,08±1,43 ^{ab}	2,88±1,00 ^a	2,93±0,47 ^{ab}	2,64±0,85 ^a	0,008
Fosfato (mg L ⁻¹)	0,04±0,02	0,14±0,14	0,15±0,22	0,11±0,12	0,11±0,10	0,796
Alcalinidade (mg L ⁻¹)	93,33±2,31	133,17±83,56	110,33±36,03	115,33±33,47	139,50±12,30	0,382
pH	8,16±0,07 _a	8,40±0,22 ^{ab}	8,76±0,28 ^c	8,74±0,33 ^c	8,71±0,30 ^{bc}	0,008

Dados são apresentados em Média ± Desvio Padrão.

2.1.3.2 Desempenho algal

O ganho de biomassa e taxa de crescimento apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, onde, o tratamento 10 ‰ teve mortalidade total nos primeiros cinco dias de experimento, o tratamento 15 ‰ obteve um desempenho inferior aos tratamentos 20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰ (Tabela 3).

Tabela 4. Desempenho algal ao longo do período experimental de 30 dias de cultivo *U. ohnoi* com água de bioflocos em diferentes salinidades (10 ‰; 15 ‰; 20 ‰; 25 ‰ e 30 ‰).

Tratamento	10 ‰	15 ‰	20 ‰	25 ‰	30 ‰	Valor p
Ganho de biomassa (g)	-	110,53±10,26 ^a	318,46±40,28 ^b	322,04±83,90 ^b	399,53±37,76 ^b	<0,001
Taxa de crescimento (% dia ⁻¹)	-	1,24±0,36 ^a	5,44±0,50 ^b	5,42±1,02 ^b	6,37±0,38 ^b	<0,001

Dados são apresentados em Média ± Desvio Padrão. Letras indicam diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05).

2.1.3.3 Clorofila, carotenoides e compostos fenólicos na *Ulva ohnoi*

Os compostos antioxidantes clorofila, carotenoides e compostos fenólicos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 5. Concentração de clorofila, carotenoides e compostos fenólicos ao longo período experimental de 30 dias de cultivo de *U. ohnoi* com água de bioflocos em diferentes salinidades (10 ‰; 15 ‰; 20 ‰; 25 ‰ e 30 ‰).

Tratamento	10 ‰	15 ‰	20 ‰	25 ‰	30 ‰	Valor <i>p</i>
Clorofila ($\mu\text{g g}^{-1}$)	-	4,27±1,28	5,82 ± 1,50	7,88±1,42	5,79±1,76	0,000004
Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	-	7,93±2,60	10,15 ± 1,18	12,52±1,80	9,82±2,90	0,000001
Compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	-	0,37±0,06	0,32±0,03	0,34±0,04	0,33±0,08	0,000000

Dados são apresentados em Média ± Desvio Padrão.

2.1.4 Discussão

Os parâmetros de qualidade de água são imprescindíveis na produção de qualquer organismo aquático. Quando falamos de macroalgas é necessário concentrações mínimas de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nitrogênio e fósforo para sua absorção e conseqüentemente seu crescimento. Imchen (2012) relata que altas concentrações de nutrientes disponíveis na água não são prejudiciais para a *Ulva* sp. demonstrando uma correlação entre o crescimento algal e a disponibilidade do nutriente. O sistema de bioflocos apresenta como principal característica a produção de nutrientes a todo tempo, assim, a utilização de macroalgas nesse sistema vem sendo estudado para auxiliar na remoção desses compostos. Neste estudo, todos os parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro do recomendando para espécie *U. ohnoi* (Notoya 1999; Ohno 1988; Khoi and Fotedar, 2011; Angell et al., 2015).

As macroalgas passam constantemente por diversos processos fisiológicos e a taxa de crescimento é uma forma direta de verificar sua tolerância aos parâmetros diversos (Kirst 1990). Segundo Angell et al. (2015), a salinidade ideal para o

crescimento da espécie *U. ohnoi* varia entre 25 e 40 ‰. Em nosso trabalho, a salinidade teve um forte efeito sobre a taxa de crescimento da *U. ohnoi* demonstrando que a alga não pode tolerar salinidades baixas (10 ‰), com taxas de crescimento declinando rapidamente após os primeiros 5 dias. Em todos os outros tratamentos as algas sobreviveram durante todo o período experimental. Diferente do relatado por Silva et al. (2008) que demonstraram um crescimento moderado a alto das macroalgas *Cladophora coelothrix*, *Chaetomorpha indica* e *Ulva sp* em salinidades entre 10 ‰ e 20 ‰. Todavia, esse comportamento pode estar relacionado com a espécie, tempo de exposição a salinidade e disponibilidade de nutrientes.

Em nosso estudo, foi observado que as macroalgas apresentaram um maior crescimento a partir da salinidade 20 ‰, demonstrando sua capacidade de absorver os nutrientes disponíveis nos bioflocos, o nitrato por exemplo apresentou menores contrações nos tratamentos 20, 25 e 30 ‰ e conseqüentemente aumentou a biomassa algal. No entanto, em salinidades mais baixas como 10 ‰ observamos uma diminuição na biomassa algal, aumento de nutrientes disponível na água seguida por morte das macroalgas.

Martins et al. (2020) realizaram um estudo semelhante, cultivando *U. ohnoi* e *U. fasciata* utilizando inoculação de bioflocos, e obtiveram uma taxa de crescimento de 4,3 % dia⁻¹ em salinidade 34 ‰ e resultados positivos em termos de taxa de crescimento e absorção de nutrientes, como nitrogênio e ortofosfato, para ambas as espécies. Em nosso estudo, verificamos uma taxa de crescimento superior de 5,42 % dia⁻¹ em salinidades de 20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰, em comparação com o estudo mencionado, considerando a mesma densidade de macroalgas.

As macroalgas têm a capacidade de biossintetizar diferentes compostos orgânicos naturais, incluindo compostos orgânicos voláteis, pigmentos (clorofilas, carotenóides), ácidos graxos poliinsaturados e outros compostos como polifenóis, vitaminas, minerais e polissacarídeos (Cikos et al., 2021). Suas concentrações podem alterar com o ambiente onde estão inseridas em decorrência dos aspectos físicos e químicos bem como a linhagem e espécie de macroalga (Peso-Echarri et al., 2012). Todavia, as concentrações podem variar em decorrência de alterações ambientais, fase de desenvolvimento, reprodução da espécie e salinidade.

Estudos evidenciam a influência da salinidade com as diminuições nas concentrações de clorofila para *Ulva fasciata* e *Ulva pertusa*, Chakbraborty et al. 2012; Kakinuma et al., 2006; Kakinuma et al., (2004). No presente estudo não foram

observadas diferenças estatísticas na concentração de clorofila nas salinidades acima de 15 ‰, que pode estar relacionada com a disponibilidade de nutrientes no sistema de bioflocos. Bews et al (2021) relatam que tanto os nutrientes quanto a salinidade influenciam o metabolismo da *Ulva lactuca*. Em seu estudo demonstraram que o metabolismo de *Ulva* (crescimento e fotossíntese) é afetado negativamente pela baixa salinidade 15 ‰, mas esses efeitos são amplamente atenuados pelo aumento das concentrações de nutrientes na água do mar. Legarda et al. (2020) utilizando a *U. fasciata* em sistema de bioflocos em salinidade $31,6 \pm 1,15$ obtiveram concentrações de clorofila $71,15 \pm 12,07$ ($\mu\text{g g}^{-1}$) superior ao encontrado em nosso estudo, porém essas alterações podem ocorrer pois os experimentos foram realizados com irradiância natural.

Na literatura as concentrações de carotenoides para *Ulva sp.* variam entre 0,005 a 900 mg g^{-1} para *Ulva sp.* (Eismann et al. 2020). Em nosso estudo quantificamos apenas betacarotenos, por isso os valores são inferiores aos relatados anteriormente. Todavia, assim como a clorofila, pode sofrer alterações em decorrência do meio onde estão inseridos. Legarda et al. (2020) quantificou concentrações $16,46 \pm 3,41$ $\mu\text{g g}^{-1}$ em um sistema multitrófico integrado de bioflocos, em nosso estudo valores próximos foram observados no tratamento de salinidade 25.

A atividade antioxidante das plantas é regulada pelos compostos fenólicos, desempenhando papel fundamental no processo de inibição da autoxidação em óleos (Ramarathnam et al., 1986). Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade nesses extratos. Legarda et al. (2020) quantificou concentrações de $0,19 \pm 0,03$ $\mu\text{g g}^{-1}$ em sistema de bioflocos, em nosso estudo obtivemos valores superiores de $0,32 \pm 0,03$.

2.1.5 Conclusão

Os resultados demonstraram que nas salinidades 20 ‰, 25 ‰ e 30 ‰ é possível produzir macroalga *Ulva ohnoi* sem afetar seu crescimento e absorção de nutrientes. Entretanto somente na salinidade 10 ‰ as macroalgas morreram e na salinidade 15 ‰ obtiveram baixa absorção de nutrientes e crescimento, levando em consideração o objetivo de integrar essa espécie recomendamos a utilização da salinidade entre 20 ‰ e 30 ‰.

2.1.6 Referências bibliográficas

ALE, M.T., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011. Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. **J. Appl. Phycol.** 23, 345–351. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9546-2>.

ANGELL AR et al., 2015 Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). **J Phycol.** <https://doi.org/10.1111/jpy.12300>

APHA/AWWA/WEF. Standard. 2012. **Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Stand. Methods. <https://doi.org/ISBN9780875532356>

Aquaculture (Amsterdam, Netherlands), 322-323: 201-209. [http://Ben-Ari T, Neori A, Ben-Ezra D, Shauli L, Odintsov V, et al. \(2014\) Management of *Ulva lactuca* as a biofilter of mariculture effluents in IMTA system. *Aquaculture* 434: 493-498. Bews, E., Booher, L., Polizzi, T., Long, C., Kim, J.-H., & Edwards, M. S. \(2021\). Effects of salinity and nutrients on metabolism and growth of *Ulva lactuca*: Implications for bioremediation of coastal watersheds. *Marine Pollution Bulletin*, 166, 112199. <https://doi:10.1016/j.marpolbul.2021.1121>](http://Ben-Ari T, Neori A, Ben-Ezra D, Shauli L, Odintsov V, et al. (2014) Management of Ulva lactuca as a biofilter of mariculture effluents in IMTA system. Aquaculture 434: 493-498. Bews, E., Booher, L., Polizzi, T., Long, C., Kim, J.-H., & Edwards, M. S. (2021). Effects of salinity and nutrients on metabolism and growth of Ulva lactuca: Implications for bioremediation of coastal watersheds. Marine Pollution Bulletin, 166, 112199. https://doi:10.1016/j.marpolbul.2021.1121)

BOBIN-DUBIGEON, C. M. Lahaye, J.L. Barry Human colonic bacterial degradability of dietary fibres from sea-lettuce (*Ulva sp.*) **J. Sci. Food Agric.**, 73 (2) (1997), pp. 149-159, 10.1002/(SICI)1097-0010(199702)73:2<149::AID-JSFA685>3.0.CO;2-L

CHAKRABORTY K et al (2012) Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. **Food Chem** 119(4): 1399-1408.

CHOPIN, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C., Neefus, C. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. **Journal of Phycology**. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x>.

CIKOS, A.M., Jerković, I., Molnar, M., Šubarić, D., Jokić, S. New trends for macroalgal natural products applications. **Natural Product Research**, 35 (7) (2021), pp. 1180-1191, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644629>

CUMASHI, N.A. Ushakova, M.E. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds **Glycobiology**, 17 (5) (2007), pp. 541-552, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>

EISMANN AI et al (2020) *Ulva spp.* carotenoids: Responses to environmental conditions. **Algal Research**. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101916>

IMCHEN T (2012) Recruitment Potential of a Green Alga *Ulva flexuosa* Wulfen Dark Preserved Zoospore and Its Development. **Plos One**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032651>

KAKINUMA et al (2006) Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (*Ulvales*, Chlorophyta). **Mar Biol.** <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0215-y>

KAKINUMA M (2004) Salinity stress responses of a sterile mutant of *Ulva pertusa* (*Ulvales*, Chlorophyta). **Fish Sci** 70(6): 1177-1179.

KHHOI, L. V.; Fotedar, R. 2011. Integration of western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) and green seaweed (*Ulva lactuca* Linnaeus, 1753) in a closed recirculating aquaculture system. **Aquaculture** (Amsterdam, Netherlands), 322-323: 201-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.030>.

KIRST GO 1990 Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 21– 53.

KRAFT LG, Kraft GT, Waller RF (2010) Investigations into Southern Australian *Ulva* (*Ulvophyceae*, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species†. **Journal of phycology** 46: 1257-1277.

KUHN, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick, G.J., Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. **Aquaculture** 309, 109–114. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>.

LEGARDA EC et al (2020) Sea lettuce integrated with Pacific white shrimp and mullet cultivation in biofloc impact system performance and the sea lettuce nutritional composition. **Aquaculture** 534: 736265 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736265>.

LIGNELL A, Pedersén M, 1989. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Bot Mar** 32:219-227. <https://doi:10.1515/botm.1989.32.3.219>.

LOBBAN, C.S., Harrison, P.J., 1994. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge University Press, Cambridge <https://doi.org/10.1017/CBO9780511626210>.

LUO, M.B., Liu, F., Xu, Z.L., 2012. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. **Aquat. Bot.** 100, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.03.006>.

MARTINS MA et al (2020) Cultivation of the seaweed *Ulva* spp. with effluent from a shrimp biofloc rearing system: Different species and stocking density. **Bol Inst Pesca.** <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2020.46.3.602>.

MOUSTAFA YTA, Eladel HM (2016) Perfil de aminoácidos de *Ulva* sp. macroalgas coletadas na costa de Alexandria, no Egito: um potencial recurso alimentar. **Poi J Bot Micr Res** 1:15-22.

MSUYA, F.E. Neori A. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania Western Indian Ocean **J. Mar. Sci.**, 1 (No. 2) (2002), pp. 117-126.

NALDI, Mariachiara & Wheeler, Patricia. (2002). ¹⁵n Measurements of Ammonium and Nitrate Uptake by *Ulva Fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria Pacifica* (Rhodophyta): Comparison of Net Nutrient Disappearance, Release of Ammonium and Nitrate, and ¹⁵n Accumulation in Algal Tissue 1. **Journal of Phycology**. 38. 135 - 144. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01070.x>.

NOTOYA M. Utilization of *Ulva* spp. and environmental restoration. **Seizandou**, Tokyo. 1999.

OHNO M (1988) Seasonal Changes of the Growth of Green Algae, *Ulva* sp. in Tosa Bay, Southern Japan. **Mar. fouling**. <https://doi.org/10.4282/sosj1979.7.13>

PESO-ECHARRI P et al (2012) Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. **J Bio Mar Ocea**. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001>.

PORRA RJ, Thompson WA, Kreidemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. **Biochim Biophys Acta** 975, 384–394.

RAYMUNDO, M. dos S., Horta, P., & Fett, R. (2004). Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (*Chlorophyta*) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40(4), 495–503. <https://doi:10.1590/s1516-93322004000400007>

RITCHIE R (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. **Photosynth Res** 89:27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.

ROBERTSON-ANDERSSON. The cultivation of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in an integrated aquaculture system, for the production of abalone feed and the bioremediation of aquaculture effluent. MSc Dissertation, **University of Cape Town, South Africa**. 2003.

RYBAK A.S. (2015) Revision of herbarium specimens of freshwater Enteromorpha-like *Ulva* (Ulvaceae, Chlorophyta) collected from Central Europe during the years 1849–1959. **Phyt**. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.218.1.1>.

SANTELICES, B., Aedo, D., Hoffmann, A., 2002. Banks of microscopic forms and survival to darkness of propagules and microscopic stages of macroalgae. **Rev. Chil. Hist. Nat.** 75, 547–555. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2002000300006>.

SCHIAVON M, Moro I, Pilon-Smits EA, Matozzo V, Malagoli M, Dalla Vecchia F (2012) Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. **Aquat Toxicol** 122-123:222-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.014>.

SILVA, P. H., McBride, S., de Nys, R. & Paul, N. A. 2008. Integrating filamentous 'green tide' algae into tropical pond-based aquaculture. **Aquaculture** 284: 74– 80.

STRICKLAND, J. D. H., Parsons, T. R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. A 1156 **Pract. Handb. seawater Anal.** 167, 185. <https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118>.

TAYLOR, R., Fletcher, R.L., Raven, J.A., 2001. Preliminary Studies on the Growth of Selected 'Green Tide' Algae in Laboratory Culture: Effects of Irradiance, Temperature, Salinity and Nutrients on Growth Rate. **Bot. Mar.** 44, 327–336. <https://doi.org/10.1515/BOT.2001.042>

TROELL, M.; Joyce, A.; Chopin, T.; Neori, A.; Buschmann, AH; Fang, JG. Engenharia ecológica na aquicultura - Potencial para aquicultura multi-trófica integrada (IMTA) em sistemas marítimos offshore. **Aquicultura**, 297 (1-4): 1-9. 2009.

UNESCO, 1983. **Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring** 53.

ZAR, J. H. 2010. **Biostatistical Analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall.

2.2 CAPÍTULO II: INTEGRATED MULTITROPHIC AQUACULTURE SYSTEM APPLIED TO SHRIMP, TILAPIA, AND SEAWEED (*ULVA OHNOI*) USING BIOFLOC TECHNOLOGY

Artigo publicado na revista *Aquaculture*, v. 572, p. 739492, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739492>

Highlights:

1. Treatments with seaweed at densities of 1 and 2 g L⁻¹ retained a higher concentration of nitrogen and phosphorus in the organisms.
2. System performance was higher in treatments with the presence of *Ulva ohnoi*.
3. Fish incorporated approximately 28.5 g, fed with only 1 % of their biomass.

Integrated multitrophic aquaculture system applied to shrimp, tilapia, and seaweed
(*Ulva ohnoi*) using biofloc technology

Ana Paula Mariane de morais^a, Ivanilson Lima Santos^a, Ramon Felipe Siqueira
Carneiro^a, Eric Arthur Bastos Routledge^b, Leila Hayashi^a, Marco Antônio de
Lorenzo^a, Felipe do Nascimento Vieira^{a*}

^a Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade
Federal de Santa Catarina, Rua dos Coroas 503, CEP 88061-600, Barra da Lagoa,
Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^b Pesquisador, Diretoria de Pesquisa e Inovação, Embrapa Sede - PqEB - Av. W3
Norte (Final) S/N - Asa Norte, Brasília - DF, 70770-901

* Corresponding author. E-mail address: felipe.vieira@ufsc.br

Abstract

Integrated multitrophic aquaculture (IMTA) is a model that integrates organisms from different trophic levels, all sharing the same production system and, consequently, the nutrients. The choice of potential candidates for integration in this system must consider the ability to make better use of generated effluents. Thus, this study adopted shrimp (*Penaeus vannamei*) as the main species, tilapia (*Oreochromis niloticus*) as an organic consumer, and the seaweed (*Ulva ohnoi*) at different densities as an inorganic consumer in a biofloc production system. The study consisted of an experiment with three treatments and four replicates each: 1) No seaweed; 2) Seaweed 1 g L⁻¹ (density of 1 g L⁻¹ of *U. ohnoi*), and 3) Seaweed 2 g L⁻¹ (density of 2 g L⁻¹ of *U. ohnoi*). Shrimp (3.82 ± 0.05 g) were stocked in 800 L tanks at a density of 275 shrimp m⁻³, fish (14.44 ± 0.57 g) in 90 L tanks at a density of 267 tilapia m⁻³, and 50 and 100 g of seaweed stocked in 50 L tanks, corresponding to treatments with 1 and 2 g L⁻¹, respectively. Water quality parameters were measured twice a week. Nitrogen and phosphorus recovery and mass balance were measured at the beginning and end of the experiment. Water quality parameters and species growth performance remained stable. However, the integration of *U. ohnoi* at densities of 1 g L⁻¹ and 2 g L⁻¹ with *P. vannamei* and *O. niloticus* benefited the system through higher nitrogen and phosphorus recovery and an increase in total productivity, generating an ecological gain. Considering the similar final biomass of seaweed in a multitrophic system with shrimp and tilapia, the use of *U. ohnoi* at a density of 2 g L⁻¹ is recommended since nutrient recovery by fish and shrimp was higher at this density.

Keywords: Nitrogen; Phosphorus; Biomass; IMTA;

2.2.1 Introduction

The biofloc technology system (BFT) can increase productivity in shrimp farming systems and other aquatic organisms, while reducing environmental impacts. This system serves as a supplementary source of feed for reared organisms. At the same time, it maintains water quality carried out by the microbial community present in the system (Avnimelech, 1999; Wasielesky et al., 2006; Ballester et al., 2010). However, high concentrations of nitrogen in this system can become a problem in aquaculture, accumulating as a result of the excretion of produced organisms, uneaten feed, and organic waste (Timmons & Ebeling, 2010).

The accumulation of these compounds can be controlled by two main pathways, heterotrophic and chemoautotrophic. In the heterotrophic pathway, the addition of an organic carbon source acts on the proliferation of heterotrophic bacteria that helps in the assimilation of ammonia and consequent formation of bacterial biomass (De Schryver et al., 2008; Serra et al., 2015). In the chemoautotrophic pathway, nitrifying bacteria act on the successive oxidation of ammonia to nitrate through the nitrification process, which happens through the absorption of inorganic carbon present in the alkalinity (Ebeling et al., 2006). In addition to nitrogen, phosphorus, total suspended solids, and other nutrients tend to accumulate within the production system in the absence of water exchange.

The increase of inorganic compounds in aquaculture is associated with animal excretion and uneaten feed since shrimp retain 23 to 31 % of nitrogen and 10 to 13 % of phosphorus (Crab et al., 2007), while the rest of these nutrients remain in the water and must be removed to prevent deterioration and toxicity to animals. The high concentration of total suspended solids is a result of a predominantly heterotrophic system owing to the constant increase of bacterial biomass. During shrimp rearing, it is recommended to maintain solids below 600 mg L^{-1} because higher values can affect shrimp performance and must be corrected once exceeded (Schveitzer et al., 2013). Systems with a predominance of chemoautotrophic microorganisms also show an increase in solids; however, in smaller amounts, the addition of these microorganisms results in greater efficiency in the nitrification process (Ferreira et al., 2020; Serra et al., 2021). Thus, the challenge of the BFT system is to control the concentration of solids that tends to increase over time and the use of inorganic nutrients generated

during the production cycle. These problems can be solved mechanically using filters or biologically.

In this context, an integrated multitrophic aquaculture (IMTA) system is an alternative to reduce the undesirable surpluses produced in the BFT system since this system integrates organisms from different trophic levels, all sharing the same production system and, consequently, the nutrients. Thus, the organic and inorganic residues generated become inputs (feed or fertilizer) for the lower trophic level species that are part of the system (Chopin et al., 2001).

The application of IMTA can contribute to the reduction of effluents produced and the consequent increase in productivity based on the diversity of species of different trophic levels, thereby allowing better use of the nutrients generated in the BFT system since surplus is consumed by another species, generating, in turn, a better utilization of nutrients present in this system.

The choice of potential candidates for integration in this system must consider the ability to make better use of generated effluents; however, salinity can be a limiting factor. Thus, some species of shrimp, tilapia, and seaweed are suitable candidates to form an IMTA system, as they are euryhaline species able to adapt to a wide range of salinities.

Tilapia is a species already cultured in a biofloc system owing to its adaptability and ability to use flocs as a feed source (Crab et al., 2009; Poli et al., 2019), demonstrating its potential to use the organic surpluses of the system. The genus *Ulva* stood out by its ability to absorb nitrogen and phosphate compounds within an integrated system in biofloc, improving its composition (Lergada et al., 2021). However, its absorption and growth can be affected by stocking densities as a consequence of seaweed shading that causes a low incidence of light (Martins et al., 2020).

Thus, this study evaluated the IMTA aquaculture system by adopting shrimp (*Penaeus vannamei*) (Boone, 1931) as the main species, tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) as an organic consumer, and the seaweed (*Ulva ohnoi*) (M. Hiraoka & S. Shimada, 2004) at different densities as an inorganic consumer in a biofloc production system.

2.2.1.1 Material and methods

2.2.1.1.1 Study site

The study was carried out for 56 days at the Marine Shrimp Laboratory (LCM), which is part of the Aquaculture Department of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), located in Florianópolis, SC, Brazil.

2.2.1.1.2 Biological material

P. vannamei shrimp were obtained from Aquatec[®], a commercial laboratory located in Canguaretama, RN, Brazil. Shrimp were maintained in a 50.000 L nursery tank and cultured in a biofloc system until they reached the initial weight of the experiment (3.82 ± 0.05 g).

Nile tilapia fingerlings *O. niloticus* were obtained from the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (Epagri) and maintained in 1000 L tanks in a biofloc system until the beginning of the experiment when they reached 14.44 ± 0.57 g. *U. ohnoi* seaweed specimens were collected from the sedimentation pond of the Marine Molluscs Laboratory, Florianópolis, SC, Brazil. They were cleaned with seawater to remove epiphytes and attached animals and then kept at the laboratory for salinity acclimation for one week. This work was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFSC (Protocol 8700240920).

2.2.1.1.3 Experimental design

The experimental design consisted of three groups with four replicates each, a total of 12 experimental units: 1) No seaweed; 2) Seaweed 1 g L^{-1} ; and 3) Seaweed 2 g L^{-1} of *U. ohnoi*.

The experimental units consisted of 800 L and 90 L circular tanks of useful volume to culture the shrimp and the tilapia, respectively, and 50 L rectangular tanks of useful volume to cultivate seaweed. All were placed in a greenhouse. Shrimp production experimental units had an 800 W heater with a thermostat to maintain the temperature at $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and an aeration system with micro-perforated hoses connected to a blower to keep the biofloc in suspension and dissolved oxygen higher than 5 mg L^{-1} . Each shrimp tank also had four rectangular artificial substrates of Needlona[®] ($0.40 \times 0.55 \text{ m}$).

The fish and seaweed tanks were equipped with 200 W heaters to maintain the temperature at $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and aeration with an air stone to keep the biofloc in suspension and the oxygen higher than 5 mg L^{-1} . Seaweed tanks had central aeration with

perforated pipes to keep the water moving. Both aeration systems were attached to the same blower that aerated the shrimp tanks.

At the beginning of the experiment, a quantity of mature biofloc from a predominantly chemoautotrophic tank with a total suspended solids concentration of 200 mg L^{-1} was transferred as inoculum to the shrimp and fish tanks, corresponding to 30 % of the volume of each unit and completed with seawater and freshwater to adjust the salinity to 18 g L^{-1} . Throughout the experiment, no water exchange occurred in the experimental units. Freshwater was added only to replace water lost by evaporation.

The system remained in constant recirculation whereby water circulated from the shrimp tank to the fish tank through a Sarlo-Better submerged pump, with a flow rate of 1000 L hour^{-1} , and then returned to the shrimp tank by gravity.

Once a week, for system maintenance, the pump was turned off to transfer water from the seaweed tank to the shrimp tank, followed by filtering 12.5 L of water from the shrimp tank (filter Bag) and returning it to the seaweed tank, which was completed with salt- and/or freshwater to maintain salinity at 20 g L^{-1} . At the end of this procedure, the recirculation system was reconnected according to Legarda et al. (2021).

2.2.1.1.4 Stocking

Shrimp tanks were stocked with 220 animals ($275 \text{ shrimp m}^{-3}$) and fish tanks with 24 tilapia ($267 \text{ tilapia m}^{-3}$), corresponding to 30 % of final shrimp biomass, according to Poli et al. (2019a). Seaweed tanks were stocked with 50 and 100 g of seaweed, corresponding to seaweed 1 g L^{-1} and seaweed 2 g L^{-1} treatments, respectively.

2.2.1.1.5 Feeding

Shrimp were fed with a 35 % crude protein commercial feed (Guabitech 1.6 mm Guabi®) four times a day, according to Jory et al. (2001), with daily amounts adjusted weekly after biometrics. Tilapia individuals were fed once a day with 38 % crude protein commercial feed for omnivorous freshwater fish at 1 % of their biomass, considering the imposition of feed restriction to stimulate biofloc consumption, according to Poli et al. (2019a).

2.2.1.1.6 Water quality and total suspended solids

Temperature and dissolved oxygen were measured twice a day and salinity once a day with the YSI Pro 2030 meter. Ammonia concentration (TAN) (Unesco, 1983), nitrite (N-NO₂) (Strickland and Parsons, 1972), pH (pH-meter Tecnal®), and alkalinity (CaCO₃) (APHA, 2012) were measured twice a week. When pH and alkalinity values were respectively lower than 7.3 and 150 mg L⁻¹, they were corrected with the addition of hydrated lime (Furtado et al., 2011). Nitrate (N-NO₃) (Hach *NitraVer*® 5) and orthophosphate (PO₄) (APHA, 2012) were measured at the beginning, middle, and end of the experiment. Total suspended solids (TSS) were measured twice a week (APHA, 2012) and maintained between 400 and 600 mg L⁻¹, levels considered suitable for *P. vannamei* (Gaona et al. 2011), and excess solids were removed using conical settling tanks as recommended by Schweitzer et al. (2013). After this procedure, the sludge volume and its concentration were measured. Then, the volume and concentration of solids were measured. The amount of sludge removed from each experimental unit was quantified as follows: sludge produced (g tank⁻¹) = $[(TSS_{final} \times V1) - (TSS_{initial} \times V1) / 1000] + (\sum(TSS_{sludge} \times V2))$, where V1 is the volume of the experimental unit in liters, TSS_{final} is the TSS concentration at the end of the experiment, TSS_{initial} is the TSS concentration at the beginning of the experiment, TSS_{sludge} is the TSS concentration in the sludge removed, and V2 is the volume of sludge removed.

2.2.1.1.7 Shrimp, tilapia, and seaweed performance

Shrimp performance was evaluated weekly by weighing a sample of 22 shrimp from each experimental unit on a digital scale with a precision of 0.01 g. At the end of the experiment, weekly growth (g week⁻¹), survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR-A), and productivity (kg m⁻³) were measured.

At the beginning, middle, and end of the experiment, all fish from each tank were weighed. Tilapia performance parameters evaluated were survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR-A), and productivity (kg m⁻³).

Seaweed was weighed biweekly to monitor the increase in biomass. At the end of the experiment, the final mean weight (g), final biomass (kg), production (kg m⁻²), and daily growth rate (% day⁻¹) were evaluated, according to Lignell and Perdesén

(1989), as follows: $TC = [(M_f / M_i)^{1/t} - 1] \times 100$, where M_f is the final biomass (g), M_i is the initial biomass (g), and t is the rearing time.

Final biomass and system productivity were evaluated, considering all organisms (shrimp, fish, and seaweed). The total productivity was calculated by dividing the total biomass by the total volume of the system. The total productivity was calculated by dividing the total biomass by the total volume of the system.

2.2.1.1.8 Nitrogen and phosphorus recovery

At the beginning and end of the experiment, samples were collected from each tank, approximately 100 g of shrimp, tilapia, and seaweed. A total of 100 g of each feed used was also collected. The concentration of nitrogen (N) was determined by the Kjeldahl method (NTK), while phosphorus (P) content was determined by the colorimetric method, following the methodology described by AOAC (2005) for whole animals.

The recovery of nitrogen and phosphorus was calculated according to the respective equation recommended by the NRC (2011): $\text{recovery (\%)} = [(\text{final weight} \times \text{final nutrient (N or P)}) - (\text{initial weight} \times \text{initial nutrient (N or P)}) \times 100] / \text{nutrient input - feed (N or P)}$.

2.2.1.1.9 Mass balance

The initial biomass of shrimp, tilapia, and seaweed, feed consumed by shrimp and tilapia, and their nitrogen and phosphorus contents were considered sources of nutrients. The final biomass of shrimp, tilapia, seaweed, and effluents was estimated at the end of the experiment. The effluent was calculated considering the initial nitrogen and phosphorus as 100 % and the difference of what was removed. For each organism, the biomass from each tank was multiplied by the concentration of nitrogen and phosphorus at the beginning and end of the experiment (Cerozi and Fitzsimmons, 2017).

2.2.1.1.10 Statistical analysis

Data were presented as mean \pm standard deviation and subjected to Shapiro-Wilk and Levene tests to prove the prerequisites of normality and homoscedasticity, respectively. Then, an analysis of variance (one-way ANOVA) was applied to verify differences among the treatments, followed by the Tukey test when differences were found (Zar, 2010). All statistical tests were evaluated with a significance level of 5 % ($p < 0.05$) and performed using the Statistica[®] version 7.0 program.

2.2.1.2 Results

2.2.1.2.1 Water quality parameters

Dissolved oxygen remained higher than 5 mg L⁻¹, the temperature was maintained at 28 °C, and the salinity was maintained at 20 g L⁻¹ for seaweed tanks and 18 g L⁻¹ for shrimp and fish tanks. The pH, alkalinity, nitrogen compounds (ammonia, nitrite, and nitrate), phosphate, and total suspended solids showed no significant difference among treatments throughout the experiment. The total amount of sludge removed during the entire experimental period did not show a significant difference among treatments (Table 1).

Table 1. Mean and standard deviation of water physical and chemical parameters for 56 days of study in a multi-trophic system with biofloc stocked with 275 shrimp *Penaeus vannamei* m⁻³ (3.81 ± 0.05 g), 267 tilapia *Oreochromis niloticus* m⁻³ (14.24 ± 0.39 g) and different seaweed densities (No seaweed; Seaweed 1 g L⁻¹; and Seaweed 2 g L⁻¹ of *Ulva ohnoi*) with four replicates.

Parameter	No seaweed	Seaweed 1 g L ⁻¹	Seaweed 2 g L ⁻¹	p-value
Ammonia (mg L ⁻¹)	0.33 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.97
Nitrite (mg L ⁻¹)	1.04 ± 0.17	1.00 ± 0.29	1.06 ± 0.14	0.96
Nitrate (mg L ⁻¹)	13.92 ± 0.50	14.99 ± 1.84	13.72 ± 0.85	0.48
Phosphate (mg L ⁻¹)	5.32 ± 0.45	5.21 ± 0.59	5.58 ± 0.79	0.77
Alkalinity (mg L ⁻¹)	172.34 ± 1.02	171.53 ± 1.46	171.44 ± 2.48	0.97
pH	8.13 ± 0.02	8.14 ± 0.05	8.12 ± 0.05	0.37
Total suspended solids (mg L ⁻¹)	403.52 ± 6.15	404.74 ± 14.34	388.89 ± 29.44	0.82
Sludge produced (kg tank ⁻¹)	0.35 ± 0.08	0.35 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.99

Different letters in the same line represent a statistical difference with $p < 0.05$.

2.2.1.2.2 Animal and seaweed performance

The final weight, survival, weekly growth, and feed conversion ratio values for shrimp and tilapia did not show significant differences among treatments. The initial and final biomass of the *U. ohnoi* did not show a significant difference among the treatments. Daily growth rate of the seaweed showed a significant difference among treatments with different densities of seaweed since higher growth was obtained in seaweed treatment of 1 g L⁻¹. The final biomass and productivity of the system showed a significant difference among treatments, and the lowest values obtained were those in the treatment without seaweed, as shown in Table 2.

Table 2. Mean and standard deviation of growth performance for 56 days of study in a multi-trophic system with biofloc stocked with 275 shrimp *Penaeus vannamei* m⁻³ (3.81 ± 0.05 g), 267 tilapia *Oreochromis niloticus* m⁻³ (14.24 ± 0.39 g) and different seaweed densities (No seaweed; Seaweed 1 g L⁻¹; and Seaweed 2 g L⁻¹ of *Ulva ohnoi*) with four replicates.

Parameter	No seaweed	Seaweed 1 g L ⁻¹	Seaweed 2 g L ⁻¹	p-value
Shrimp				
Final weight (g)	12.20 ± 0.19	12.11 ± 0.24	12.42 ± .22	0.186816
Survival (%)	88.41 ± 3.61	90.11 ± 3.02	89.09 ± 2.32	0.733517
Feed conversion ratio	2.40 ± 0.16	2.33 ± 0.14	2.39 ± 0.15	0.761413
Weekly growth (g week ⁻¹)	1.05 ± 0.02	1.04 ± 0.03	1.07 ± 0.03	0.186816
Final biomass (kg)	2.37 ± 107.69	2.40 ± 87.74	2.43 ± 69.57	0.653736
Tilapia				
Final weight (g)	43.98 ± 4.09	45.75 ± 3.71	49.14 ± 2.09	0.149636
Survival (%)	94.74 ± 5.21	97.92 ± 4.17	93.70 ± 4.14	0.421985
Feed conversion ratio	0.52 ± 0.07	0.48 ± 0.05	0.49 ± 0.01	0.585645
Weekly growth (g week ⁻¹)	3.71 ± 0.51	3.93 ± 0.46	4.36 ± 0.26	0.149636
Final biomass (kg)	0.96 ± 91.42	1.05 ± 78.13	1.09 ± 46.14	0.094444
<i>Ulva ohnoi</i>				
Initial biomass (g)	-	50 ± 0.0	100 ± 0.0	-
Final biomass (g)	-	393.01 ± 44.50	458.63 ± 64.05	0.143399
Daily growth rate (% day ⁻¹)	-	8.00 ± 0.01 ^a	5.43 ± 0.01 ^b	0.000999
System				
Final biomass (kg)	3.34 ± 0.07 ^a	3.85 ± 0.17 ^b	3.98 ± 0.14 ^b	0.00047
Productivity (kg m ⁻³)	3.59 ± 0.07 ^a	4.14 ± 0.18 ^b	4.28 ± 0.15 ^b	0.000151
System conversion	1.31 ± 0.10	1.15 ± 0.08	1.17 ± 0.07	0.053381

Different letters in the same line represent a statistical difference with $p < 0.05$.

2.2.1.2.3 Nitrogen and phosphorus recovery

Nitrogen and phosphorus recovery of the system showed a significant difference among treatments. In both parameters, treatment without seaweed showed lower values than treatments with seaweed at densities of 1 and 2 g L⁻¹ for both parameters, as shown in Table 3.

Table 3. Mean and standard deviation of nitrogen and phosphorus recovery for 56 days of study in a multi-trophic system with biofloc stocked with 275 shrimp *Penaeus vannamei* m⁻³ (3.81 ± 0.05 g), 267 tilapia *Oreochromis niloticus* m⁻³ (14.24 ± 0.39 g) and different seaweed densities (No seaweed; Seaweed 1 g L⁻¹; and Seaweed 2 g L⁻¹ of *Ulva ohnoi*) with four replicates.

Parameter	No seaweed	Seaweed 1 g L ⁻¹	Seaweed 2 g L ⁻¹	p-value
Nitrogen recovery (%)	24.42 ± 0.53 ^a	27.65 ± 1.42 ^b	27.62 ± 1.35 ^b	0.005059
Phosphorus recovery (%)	14.82 ± 8.92 ^a	18.61 ± 11.97 ^b	19.86 ± 8.94 ^b	0.000152

2.2.1.2.4 Mass balance

Nitrogen mass balance showed a significant difference among the experimental groups for fish in the initial phase of the system, in which seaweed treatment of 2 g L⁻¹ showed a higher value than the others. In the final phase, the system showed a significant difference with seaweed presence, with higher nitrogen value in both treatments (Seaweed 1 g L⁻¹ and Seaweed 2 g L⁻¹), compared to treatment without seaweed (Table 4). At the beginning of the experiment, phosphorus showed a significant difference for fish. At this stage, the no seaweed and seaweed treatment at 1 g L⁻¹ were similar and different from seaweed treatment at 2 g L⁻¹, which showed the highest value. At the end of the experiment, treatments in the presence of seaweed (1 and 2 g L⁻¹) were statistically similar and showed a significantly higher phosphorus concentration than treatment without seaweed. For shrimp, at the beginning of the experiment, phosphorus showed no statistical difference among the treatments. At the end of the experiment, seaweed treatment at 2 g L⁻¹ showed a significant difference from the other treatments, as shown in Table 5.

Table 4. Nitrogen mass balance for 56 days of study in a multi-trophic system with biofloc stocked with 275 shrimp *Penaeus vannamei* m⁻³ (3.81 ± 0.05 g), 267 tilapia *Oreochromis niloticus* m⁻³ (14.24 ± 0.39 g) and different seaweed densities (No seaweed; Seaweed 1 g L⁻¹; and Seaweed 2 g L⁻¹ of *Ulva ohnoi*) with four replicates.

N input	Shrimp feeding (g tank ⁻¹)	Shrimp (g tank ⁻¹)	Tilapia feeding (g tank ⁻¹)	Tilapia (g tank ⁻¹)	Seaweed (g tank ⁻¹)	Initial total (g tank ⁻¹)
No seaweed	195.43 ± 3.44	20.58 ± 0.32	16.12 ± 0.68	7.48 ± 0.19 ^a	-	239.61 ± 2.97
Seaweed 1 g L ⁻¹	193.82 ± 9.41	20.43 ± 0.39	17.27 ± 1.51	7.58 ± 0.12 ^a	0.36 ± 0.0	239.46 ± 8.6
Seaweed 2 g L ⁻¹	201.44 ± 3.16	20.62 ± 0.08	18.45 ± 1.08	7.96 ± 0.34 ^b	0.73 ± 0.0	249.20 ± 3.31
<i>p</i> -value	0.227436	0.660769	0.118517	0.041016	-	0.056506
N output	-	Shrimp (g tank ⁻¹)	-	Tilapia (g tank ⁻¹)	Seaweed (g tank ⁻¹)	Effluent (g tank ⁻¹)
No seaweed		62.49 ± 2.84		22.97 ± 2.17 ^a	-	154.15 ± 2.21
Seaweed 1 g L ⁻¹		63.36 ± 2.32		26.79 ± 1.98 ^b	3.05 ± 0.40	146.27 ± 7.31
Seaweed 2 g L ⁻¹		65.43 ± 1.87		28.05 ± 1.18 ^b	3.14 ± 0.56	152.58 ± 4.71
<i>p</i> -value		0.250580		0.008892	-	0.137554

Different letters in the same line represent a statistical difference with $p < 0.05$.

Table 5. Phosphorus mass balance for 56 days of study in a multi-trophic system with biofloc stocked with 275 shrimp *Penaeus vannamei* m⁻³ (3.81 ± 0.05 g), 267 tilapia *Oreochromis niloticus* m⁻³ (14.24 ± 0.39 g) and different seaweed densities (No seaweed; Seaweed 1 g L⁻¹; and Seaweed 2 g L⁻¹ of *Ulva ohnoi*) with four replicates.

P input	Shrimp feeding (g tank ⁻¹)	Shrimp (g tank ⁻¹)	Tilapia feeding (g tank ⁻¹)	Tilapia (g tank ⁻¹)	Seaweed (g tank ⁻¹)	Initial total (g tank ⁻¹)
No seaweed	49.85 ± 0.88	1.62 ± 0.02	4.27 ± 0.18	2.19 ± 0.06 ^a		57.93 ± 0.74
Seaweed 1 g L ⁻¹	49.44 ± 2.40	1.61 ± 0.03	4.57 ± 0.40	2.22 ± 0.03 ^a	0.02 ± 0.0	57.86 ± 2.11
Seaweed 2 g L ⁻¹	51.38 ± 0.80	1.63 ± 0.01	4.77 ± 0.29	2.33 ± 0.10 ^b	0.03 ± 0.0	60.25 ± 0.84
<i>p</i> -value	0.227436	0.660769	0.118517	0.041016		0.074108
P output	-	Shrimp (g tank ⁻¹)	-	Tilapia (g tank ⁻¹)	Seaweed (g tank ⁻¹)	Effluent (g tank ⁻¹)
No seaweed		4.73 ± 0.21 ^a		8.00 ± 0.76 ^a	-	45.20 ± 0.50
Seaweed 1 g L ⁻¹		4.82 ± 0.18 ^a		9.97 ± 0.74 ^b	0.22 ± 0.03	42.85 ± 1.91
Seaweed 2 g L ⁻¹		5.70 ± 0.16 ^b		10.44 ± 0.44 ^b	0.24 ± 0.04	43.88 ± 0.90
<i>p</i> -value		0.000071		0.001246		0.074108

Different letters in the same line represent a statistical difference with $p < 0.05$.

2.2.1.3 Discussion

Inorganic compounds present in the water that will be absorbed by seaweed come mainly from the decomposition of animal feed and excretion (Timmons & Ebeling, 2010) which can cause toxicity in high concentrations with corresponding decreasing growth, or even mortality, of animals. Through the use of IMTA, nitrate and phosphorus that tend to accumulate in the BFT system are consumed by species of lower trophic levels. Given the ability to assimilate nitrogen and phosphorus and convert them into biomass, seaweeds are often used to integrate these systems (Neori et al., 2004).

Maintaining water quality in production systems, especially in those with high stocking densities, is essential for the growth of animals. Seaweed presence in BTF

systems is important for the removal of excess nutrients, as verified by Legarda et al. (2020), Martins et al. (2020), and Celino et al. (2010). Additionally, in this system, the presence of a microbial community is responsible for converting ammonia into nitrate, a less toxic compound for organisms. Thus, all water quality parameters remained within the recommended values for *P. vannamei* and *O. niloticus* species throughout the experiment (Van-Wyk and Scarpa, 1999; Lin and Chen; 2001, 2003; El-Shafai et al., 2004).

In shrimp production systems, approximately 25 % of nitrogen available in feed is incorporated by shrimp, and the surplus is degraded in the water, which, in turn, accumulates and causes toxicity (Crab et al., 2007; Avnimelech, 2015). Using *U. ohnoi* in densities of 1 and 2 g L⁻¹ did not influence the bacterial process of nitrogen and phosphorus recovery from the system since ammonia, nitrite, and nitrate remained the same in the treatment without macroalgae.

However, the daily rate of seaweed growth differed as the treatment with lower initial density showed a higher specific growth, which was already expected, owing to the similar amount of initial nutrient in both treatments. Therefore, the treatment with lower density showed better growth conditions. In addition, a higher density of seaweed in a small area could cause competition for light, which limits growth. Despite this, the seaweed from both treatments showed a growth rate higher than 5.0 % day⁻¹, which was higher than the 4.3 and 2.7 % day⁻¹ observed by Martins et al. (2020) with seaweed densities of 2 and 4 g L⁻¹, respectively. Legarda et al. (2020), in turn, could not keep up with the growth rate owing to the mortality of the sea lettuce *Ulva lactuca*, and it was necessary to replace the biomass weekly, which could be attributed to the low availability of ammonia, the first nutrient assimilated by macroalgae. However, in the present work, even with similar water quality parameters, the seaweed *U. ohnoi* managed to grow, which may be an indication of the ability of the genus *Ulva* to convert nitrate into ammonia through the nitrate reductase enzyme (Costa, 2006).

In the present work, integration of the seaweed in the system did not significantly affect the performance of shrimp or fish. The high survival and weekly growth rate of shrimp observed were above 88 % and 1 g week⁻¹, respectively, which corresponded to the report by Samocha et al. (2015). Fish showed a survival higher than 93 %, a weekly growth rate higher than 3.7 g week⁻¹, and a mean increase of 28.5 g, even if fed with only 1 % of their biomass, which suggests they used biofloc as a feed source, corroborating the results observed by Poli et al. (2019). However, seaweed presence

in the system provided an increase in biomass to the production system compared to the treatment without macroalgae, which demonstrates that seaweed increased the productivity of shrimp and tilapia in addition to removing the inorganic compounds dissolved in the water. The seaweed tested in this work can be used in feed, as tested by González et al. (2018), who successfully evaluated the use of *Ulva lactuca* as an ingredient in shrimp feed, and Legarda et al. (2021), who evaluated the levels of *Ulva fasciata* inclusion in *Seriola dorsalis* feed.

Nitrogen and phosphorus recovery in production systems is important because of the greater amount of these nutrients in feed. In conventional systems, it is common to carry out water exchange when nitrogen compounds are in high concentrations. In addition, feed represents the highest cost of production in aquaculture, and nitrogen is the most expensive ingredient. In the present work, nitrogen recovery was higher in both treatments with seaweed (1 and 2 g L⁻¹), and the same occurred with phosphorus which recovered in greater quantity in the treatments with seaweed. Legarda et al. (2020) obtained similar behavior with sea lettuce presence, observing higher phosphorus incorporation in shrimp and fish, even without direct contact with the seaweed. These results suggest that seaweed release some compound in the water that favors phosphorus recovery. Further research is needed to confirm this behavior. However, in the treatment without macroalgae, nutrient recovery was still observed in fish, suggesting their use of phosphorus to form bone structure based on the increase in fish biomass, a behavior similar to that observed by Poli et al. (2019). Legarda et al. (2021) used the seaweed *Ulva fasciata* and obtained nitrogen and phosphate recovery of 29.2 and 10.5, respectively. In an integrated recirculation system, Elizondo-González et al. (2018) used *Ulva lactuca* and obtained nitrogen recovery and phosphorus of 80.0 and 64.0 %, respectively, results that demonstrate the efficiency of seaweed in nitrogen and phosphorus recovery. In the present study with *U. ohnoi*, treatment with 1 g L⁻¹ showed nitrogen and phosphorus recovery of 27.65 and 18.61 %, respectively, and similar results in at a density of 2 g L⁻¹, with 27.62 and 19.86 % of nitrogen and phosphorus recovery, respectively.

Considering mass balance, the initial nitrogen of the treatments was similar. At the end of the study, nitrogen of the effluents was statistically similar; however, fish recovery in treatments with 1 and 2 g L⁻¹ was higher than in the treatment without seaweed, another indication that the animals consumed biofloc as feed. Phosphorus showed behavior similar to that observed with nitrogen, in which the initial

concentration was similar among the treatments with no increase in phosphorus in the effluent at the end of the experiment. Regardless of seaweed density, higher phosphorus assimilation was observed, which also occurred for shrimp at 2 g L⁻¹ of seaweed. Even without direct contact, it is possible to attribute the greater incorporation of nitrogen and phosphorus to the presence of seaweed in the system. The low feeding rate of the fish, as an inducement to consume biofloc excess, may have also contributed to the increase of nitrogen and phosphorus in fish. These results show that it is possible to improve system efficiency by increasing nitrogen recovery, diversifying production, and generating the same amount of effluent with a lower concentration of nutrients.

2.2.1.4 Conclusion

The results obtained in the present study prove that the presence of *Ulva ohnoi* in the IMTA system with *P. vannamei* and *O. niloticus* benefited the performance of all species through nitrogen and phosphorus recovery and an increase in total productivity, generating an ecological gain. Considering that *Ulva ohnoi* final biomass was similar, it is recommended to use a density of 2 g L⁻¹ in a multitrophic system with shrimp and tilapia since the nutrient recovery by fish and shrimp was higher at this density.

2.2.1.5 Formatting of funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, by Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC project 2020TR728). Felipe do Nascimento Vieira and Leila Hayashi received a productivity research fellowship from CNPq.

2.2.1.6 Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

2.2.1.7 References

- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbur
- APHA/AWWA/WEF. Standard. 2012. Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods. [https://doi.org/ISBN 9780875532356](https://doi.org/ISBN%209780875532356)
- Avnimelech, Y., 2015. Biofloc technology – A practical guide book. A practical guide book. vol. 258 The World Aquaculture <https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., M., E., L., A., Wasielesky Jr., W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero-exchange suspended microbial flocs intensive system. <https://doi.org/10.1111/j.1365-7142.095.2009.00648.x>
- Celino, J. & Alencar, J. & Horta, P., 2010. Cultivo de Camarão Branco *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) com a Macro-alga *Ulva Lacuata* Linnaeus (Chlorophyta) no Tratamento de Efluentes em Sistema Fechado de Recirculação. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 10. 117-137
- Cerozi, B.S., Fitzsimmons, K., 2017. Phosphorus dynamics modeling and mass balance in na aquaponics system. *Agric. Syst.* 153, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.020>
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C., Neefus, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*. <https://doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x>
- Costa, V. M. F. Da. 2006. Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes (NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄⁻²) provenientes da carcinicultura. Dissertação (Mestrado em Bieciologia Aquática) – Centro de Biociencias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, p. 62
- Crab, R., et al. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquaculture*, v. 40, p. 105-112
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. 2008. The basics of bioflocos technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>

- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Elizondo-González R, Quiroz-Guzmán E, Escobedo-Fregoso C, Magallón-Servín P, Peña-Rodríguez A. 2018. Uso da alga *Ulva lactuca* para biorremediação de água e como aditivo alimentar para camarão branco *Litopenaeus vannamei*. *Peer J*6: e4459 <https://doi.org/10.7717/peerj.4459>
- El-Shafai, S.A., El-Gohary, F.A., Nasr, F.A., Van Der Steen, N.P., Gijzen, H.J., 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*)
- Ferreira, G. S., Silva, V. F., Martins, M. A., Silva, A. C. C. P., Machado, C., Seiffet, W. Q., Do Nascimento, F V., 2020. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs, *Aquacultural Engineering*, Volume 88, 102040, ISSN 0144-8609, <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102040>
- Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 321, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034>
- Gaona, C. a P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality , Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System 12, 54–73. <https://doi:10.21061/ijra.v12i1.1354>
- Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., International, B., Park, H.A., Hwy, N.O.D., Pierce, F. 2001. A Global Review of Shrimp Feed Management: Status and Perspectives. *Aquaculture* 104–152
- Lignell A, Pedersén M, 1989. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Bot Mar* 32:219-227. <https://doi:10.1515/botm.1989.32.3.219>
- Lin, Y., Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) juveniles at different salinity levels 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S00448486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S00448486(03)00220-5)
- Lin, Y., Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels 109–119. [https://doi.org/10.1016/S00220981\(01\)002271](https://doi.org/10.1016/S00220981(01)002271)
- Legarda, E. C., Da Silva, D., Miranda, C. S., Pereira, P. K. M., Martins, M. A., Machado, C., Lorenzo, M. A., Hayashi, L., Vieira, F. N., 2020. *Sea lettuce* integrated with Pacific white shrimp and mullet cultivation in biofloc impact system performance and the *sea lettuce* nutritional composition. *Aquaculture*, v. 736265, p. 736265-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736265>

- Legarda, E. C., Viana M.T., Zaragoza, O. B. D. R., Skrzynska, A. K., André Braga, A., Lorenzo, M. A., Vieira, F. N. 2021. Effects on fatty acids profile of *Seriola dorsalis* muscle tissue fed diets supplemented with different levels of *Ulva fasciata* from an Integration Multi-Trophic Aquaculture system, *Aquaculture*, Volume 535, 736414, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736414>
- Martins, M. A., Da Silva, V. F., Tarapuez, R. P., Hayashi, L., Vieira, F. N. 2020. Cultivation of the seaweed *Ulva spp.* with effluent from a shrimp biofloc rearing system: different species and stocking density. *Boletim do instituto de pesca* (online), v. 46, p. 1-6
- Neori A., Chopin T., Troell M., Buschmann A. H., Kraemer G. P., Halling C et al. 2004. Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquicultura* 231:361 – 391. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.015>
- NRC (National Research Council), 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, DC. www.nap.edu
- Poli, M.A., Legarda, E.C., Lorenzo, M.A, Martins, M. A., Vieira, F.N. 2019. Pacific White shrimp and Nilo tilapia integration in a biofloc system under different fish-stocking densities. *Aquaculture* 498, 83-39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045>
- Samocha, T. M., Fricker, J., Ali, A. M., Shpigel, M., Neori, A., 2015. Growth and nutrient uptake of the macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system, *Aquaculture*, Volume 446, Pages 263-271, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.008>
- Schveitzer, R., Arantes, R., Baloia, M., F., Costódio, P. F. S., Arana, V. L., Seiffert, W. Q., Andreata, E. R. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. *Aquacultural Engineering*.55 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.12.003>
- Serra, F.P., Wasielesky, W., Abreu, P. C. 2021. Nitrogen salt fertilization vs. Substrate availability: Two strategies to improve nitrification during the production of the White shrimp *Litopenaeus vannamei*., *Aquaculture*, Volume 543,736997, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736997>
- Serra, F.P., Gaona, C.A.P., Furtado, P.S. et al. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Int* 23, 1325–1339. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. A 1156 Pract. Handb. seawater Anal. 167, 185. <https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118>
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. *Recirculating Aquaculture Systems*. 2nd Edition p. 939. Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. *Farming Marine Shrimp* In: Van Wyk, P., et al.

(Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138

Unesco, 1983. *Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring* 53

Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Farming Marine Shrimp In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138

Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 2006. Effect of natural production in a zero-exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall

3 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados apresentados nesta tese podemos concluir que é possível cultivar a macroalga *Ulva ohnoi* em sistema de bioflocos nas salinidades 20, 25 e 30 sem prejudicar o crescimento e retenção de nitrogênio e fósforo, todavia, como o intuito era conseguir integrar a espécie ao cultivo de camarão e tilápia determinamos a salinidade 20 como melhor devido ser uma salinidade mais baixa para conseguir integrar com os peixes.

A integração da macroalga *U. ohnoi* ao cultivo do camarão e tilápia nas densidades 1 e 2 g L⁻¹ não afetou negativamente as espécies, foi possível observar uma maior retenção de nitrogênio e fósforo pela tilápia, uma maior retenção de fosforo para o camarão quando cultivada em densidade de 2 g L⁻¹.

Além de reter nitrogênio e fósforo e aumentar a retenção nos camarões e peixes as macroalgas podem ser utilizadas como ingredientes nas rações de camarões e peixes.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AL-AMOUDI, M. M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to seawater in experimental study. **Aquaculture**, 65: 333-342. 1987.

AVNIMELECH Y. Carbono:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**. v.176, p.227-235,1999.

BALDISSEROTTO, B. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-300, 2009.

BALLESTER, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., M., E., L., A. de, Wasielesky Jr., W., Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero-exchange suspended microbial flocs intensive system. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-7142095.2009.00648.x>

BARBIERI JÚNIOR, R. C. J.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

Browdy, Craig & Ray, Andrew & Leffler, John & Avnimelech, Yoram. **Biofloc-based Aquaculture Systems**. 2012.

CHOI, T.S., KANG., E.J.K, KIM, J., KIM, K.Y. Effect of salinity on growth and nutrient uptake of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) from an eelgrass bed. **Algae**. 2010. <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.1.017>

CHOPIN, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C., Neefus, C. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. **Journal of Phycology**. 2001. <https://doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x>

COSTA, L. C. O., Poersch, L. H. S., Abreu P.C. Biofloc removal by the oyster *Crassostrea gasar* as a candidate species to an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system with the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* **Aquaculture**, 540, p. 736731. 2021 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736731>

CRAB R. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. [Ghent, Belgium]: Ghent University. **Faculty of Bioscience Engineering**; 2010.

CRAB, R., et al. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. **Aquaculture**, v. 40, p. 105-112, 2009.

DE SCHRYVER, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture** 277, 125–137. 2008 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>

EBELING, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture** 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. CABI, 2006.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. **SOFIA** 2022.

FONG, P., BOYER, K. E., DESMOND, J. S. & Zedler, J. B. Salinity stress, nitrogen competition, and facilitation: what controls seasonal succession of two opportunistic green macroalgae? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 206:203-221. 1996.

FURTADO, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P. et al. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). **Aquacult Int** 23, 315–327 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z>

GAONA, C. a P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System 12, 54–73. 763 <https://doi:10.21061/ijra.v12i1.1354>

HANISAK M. D., SAMUEL M. A., The influence of major environmental factors on the growth of *Glacilaria tikvahiae* in culture, **J. Phycol.** 19 9Suppl). 6, 1983.

KUHN, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick, G.J., Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. **Aquaculture** 309, 109–114. 779, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>

LEGARDA, E. C., Da Silva, D., Miranda, C. S., Pereira, P. K. M., Martins, M. A., Machado, C., Lorenzo, M. A., Hayashi, L., Vieira, F. N., Sea lettuce integrated with Pacific white shrimp and mullet cultivation in biofloc impact system performance and the sea lettuce nutritional composition. **Aquaculture**, v. 736265, p. 736265-8. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736265>

LITTLER, M.M., Morphological form and photosynthetic performances of marine macroalgae: test of a functional/form hypothesis. **Bot. Mar.** 22, 161–165, 1980.

LOBBAN, C.S., Harrison, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge University Press, Cambridge. 1994. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511626210>.

MARTINS, M. A., Da Silva, V. F., Tarapuez, R. P., Hayashi, L., Vieira, F. N. Cultivation of the seaweed *Ulva spp.* with effluent from a shrimp biofloc rearing system: diferente species and stocking density. **Boletim do instituto de pesca** (online), v. 46, p. 1-6. 2020.

MSUYA, F. and Neori, A. Effect of Water Aeration and Nutrient Load Level on Biomass Yield, N Uptake and Protein Content of the Seaweed *Ulva lactuca* Cultured in Seawater Tanks. **Journal of Applied Phycology**, 20, 1021-1031. 2008 <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9300-6>

NEORI, A., CHOPIN, T., TROELL, M., BUSCHMANN, A. H., KRAEMER, G. P., HALLING, C., SHPIGEL, M. & YARISH, C. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. **Aquaculture**, 231, 361-391. 2004.

PEDERSEN, M.F. Nitrogen limitation of photosynthesis and growth: comparison across aquatic plant communities in a Danish estuary (Roskilde Fjord). **Ophelia** 41, 61-272. 1995.

PILLAY, T. V. R. **Aquaculture: principles and practices**. 1th. Oxford: Fishing News Books, 1990.

POLI, M.A., LEGARDA, E.C., LORENZO, M.A., MARTINS, M.A., NASCIMENTO VIEIRA, F. Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. **Aquaculture** 498, 83-89. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045>

RIVERS, J.S., PECKOL, P. Summer decline of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in a eutrophic embayment: interactive effects of temperature and nitrogen availability. **J. Phycol.** 31, 223-228. 1995.

ROBERTSON-ANDERSSON. The cultivation of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in an integrated aquaculture system, for the production of abalone feed and the bioremediation of aquaculture effluent. MSc Dissertation, **University of Cape Town**, South Africa. 2003.

SCHVEITZER, R., Arantes, R., Baloia, M., F., Costódio, P. F. S., Arana, V. L., Seiffert, W. Q., Andreata, E. R. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. **Aquacultural Engineering**. 55 93-103. 2013 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.12.003>

SERRA, F. P., Carlos A. P. Gaona, C. A. P., Furtado, P. S., Poersch, L. H., Wasielesky, W. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei* **Aquacult Int** 23:1325-1339. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>

SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; FRANCO, M. R. B.; PRADO, I. N.; Visentainer, J. V. Composição química, perfil de ácidos graxos e quantificação dos ácidos α -linolênico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico em vísceras de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Technology**, v. 27, n. 1, p. 73-76, Jan./June, 2005.

TAHON, J., Hoof, D.V.A.N., Vinckier, C., Witters, R., Ley, M.D.E., Lontie, R., 1988. The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. **J. Biochem** 249, 891-896. <https://doi:10.1042/bj2490891>

TAYLOR, R., Fletcher, R.L., Raven, J.A. Preliminary Studies on the Growth of Selected 'Green Tide' Algae in Laboratory Culture: Effects of Irradiance, Temperature, Salinity and Nutrients on Growth Rate. **Bot. Mar.** 44, 327-336. 2001. <https://doi.org/10.1515/BOT.2001.042>

TIMMONS, M.B., Ebeling, J.M., 2010. **Recirculating Aquaculture Systems**. 2nd Edition p. 939.

Troell M., Halling C., Neori A., Chopin T., Buschmann A.H., Kautsky N., Yarish C. Integrated mariculture: asking the right questions. **Aquaculture** 226:69-90. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00469-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00469-1)

TROELL, M.; Joyce, A.; Chopin, T.; Neori, A.; Buschmann, AH; Fang, JG. Engenharia ecológica na aquicultura - Potencial para aquicultura multi-trófica integrada (IMTA) em sistemas marítimos offshore. **Aquiculture**, 297 (1-4): 1-9. 2009.

VINATEA, L. A. **Princípios químicos da qualidade da água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões**. 1. ed. Florianópolis: UFSC, 1997.

WASIELESKY, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 258, 396–403. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

WU, H.; SHIN, S. K.; JANG, S.; YARISH, C.; KIM, J. K. Growth and nutrient bioextraction of *Gracilaria chorda*, *G. vermiculophylla*, *Ulva prolifera*, and *U. compressa* under hypo- and hyper-osmotic conditions. **Algae**. 2018. <https://doi.org/10.4490/algae.2018.33.11.13>