

Eduardo de Oliveira Bastos

**DESENVOLVIMENTO DE BASES BIOTECNOLÓGICAS
PARA UTILIZAÇÃO DA ALGA VERDE
Ulva ohnoi (Chlorophyta)**

Tese submetida ao Programa de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi
Rörig
Coorientador: Prof. Dr. José Bonomi
Barufi

Florianópolis
2019

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

Bastos, Eduardo de Oliveira
DESENVOLVIMENTO DE BASES BIOTECNOLÓGICAS PARA
UTILIZAÇÃO DA ALGA VERDE *Ulva ohnoi*
(Chlorophyta) / Eduardo de Oliveira Bastos ;
orientador, Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig ,
coorientador, Prof. Dr. José Bonomi Barufi , 2019.
165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

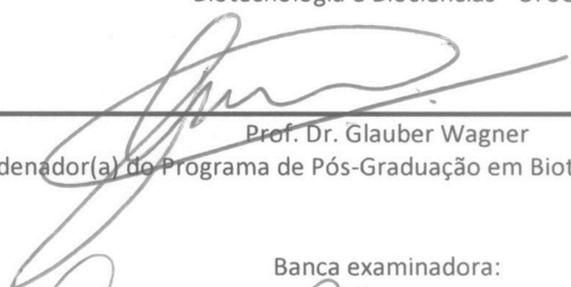
1. Biotecnologia e Biociências. 2.
Fitorremediação. 3. *Ulva ohnoi*. 4. Seleção de
linhagens. I. , Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig. II. ,
Prof. Dr. José Bonomi Barufi. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências.

“Desenvolvimento de bases biotecnológicas para utilização da alga verde *Ulva ohnoi* (Chlorophyta)”

Por

Eduardo de Oliveira Bastos

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (010/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

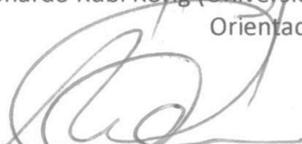


Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr. Leonardo Rubi Röing (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dra. Margareth da Silva Copertino (Universidade Federal do Rio Grande)



Dr. Paulo Antunes Horta Junior (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Carlos Frederico Deluqui Gurgel (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte (Universidade Federal de Santa Catarina)

À Minha Mãe (in memoriam) e ao meu Pai.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e familiares pelo incentivo durante toda esta caminhada. Ao meu Avô materno, Eurico Setembrino de Oliveira, por ter me ensinado a amar e respeitar o mar.

À Universidade Federal de Santa Catarina, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pelo conhecimento passado ao longo dos anos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos professores Dr. Leonardo Rubi Rörig, Dr. José Bonomi Barufi e Dr. Paulo A. Horta, pelas orientações e dedicação nestes longos anos de convivência no laboratório e amizade.

Aos companheiros de jornada do LAFIC-UFSC que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

É fácil deixar de agradecer alguém entre tantas pessoas que de algum modo ajudaram e/ou influenciaram este trabalho, então quem não estiver aqui, sinta-se agradecido também!

“Aquele floresta era composta por grandes plantas arborescentes, e assim que penetramos debaixo das suas ramagens, os meus olhos sentiram-se atraídos pela estranha disposição dos ramos, a qual nunca tinha visto até então nas florestas da superfície terrestre. Nenhuma erva das que atapetavam o solo, nenhum ramo dos arbustos se enroscava ou se estendia num plano horizontal: todos subiam para a superfície do mar. Não havia um filamento, uma fita, por mais delgada que fosse, que não se mantivesse direita como se fosse um fio de ferro. Notei também que todos os espécimes do reino vegetal: estavam presos ao solo apenas por uma ligação superficial. Desprovidos de raízes, indiferentes ao corpo sólido, areia, concha ou pedra, que as suportava apenas lhe pediam apoio e não vitalidade. Essas plantas provêm de si mesmas e o princípio de sua existência está na água, que as sustenta e alimenta.”

“A maior parte delas, em vez de folhas, eram providas de lâminas de formas extravagantes, circunscritas numa gama restrita de cores, que não compreendia mais do que o cor-de-rosa, o carmim, o verde, o azeitonado, e o castanho. Tornei a ver ali, mas não secas, como os exemplares do Nautilus, as sifonáceas, abertas em leques, que pareciam como que solicitar a brisa, cerâmios escarlates, laminárias estendendo seus pequenos gomos comestíveis, neriocrístias filiformes e flexuosas, que desabrochavam à altura de quinze metros, ramalhetes de acetabulárias, cujos pés crescem pela parte superior, e grande número de outras plantas pelagianas, todas porém sem flores.”

“Vinte Mil Léguas Submarinas” Júlio Verne

“A mesma regra mantém-se para os que aqui estão agora, é claro: escolheremos o nosso próximo mundo através daquilo que aprenderemos neste. Não aprender nada significa que o próximo mundo será igual a este, com as mesmas limitações e pesos de chumbo a vencer.”

“Fernão Capelo Gaivota” Richard Bach

RESUMO GERAL

Macroalgas verdes do gênero *Ulva* são conhecidas pela alta taxa de crescimento e absorção de nutrientes. Constituinto assim uma ferramenta para utilização em programas de fitorremediação de efluentes ou áreas impactadas. Da mesma forma, a produção de biomassa para utilização em diversos fins é de grande interesse para o mercado de biomoléculas. Entretanto, a produção mundial destes organismos é baixa e um dos motivos é a necessidade de obtenção de técnicas e linhagens que tolerem as condições de cultivo e apresentem características economicamente desejadas. Sendo assim, apresentamos no primeiro capítulo, a identificação, com base em análises moleculares, da macroalga verde *U. ohnoi*, uma possível espécie não-nativa que ocorre na costa brasileira. Esta espécie é conhecida por apresentar rápido crescimento com altas taxas de absorção de nitrogênio e fósforo. Neste capítulo avaliamos o potencial de fitorremediação de *U. ohnoi* na remoção do metal traço cádmio e as influências que a temperatura e a salinidade possuem neste processo. Quando na presença do cádmio, *U. ohnoi* apresentou redução nos parâmetros fotossintéticos e reduziu sua taxa de crescimento. Entretanto, esta espécie apresentou resistência ao cádmio quando mantida em condições ótimas de temperatura e salinidade. Nossos resultados demonstram remoção de $81,3 \pm 1,1\%$ do Cd adicionado na concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ quando a salinidade era 15 e temperatura de $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Desta forma, *U. ohnoi* apresentou potencial na fitorremediação do cádmio em águas marinhas ou salobras. No segundo capítulo, avaliamos os efeitos interativos da salinidade e do fósforo em aspectos reprodutivos de *U. ohnoi* com objetivo de otimizar a produção de plântulas que poderiam ser usadas na produção de biomassa ou em programas de biorremediação. Observamos que a redução da salinidade de 35 para 25, aliada com o acréscimo de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo no meio resultou em $94,17 \pm 1,89\%$ do talo transformado em estruturas reprodutivas. Uma intensidade alta de liberação das células reprodutivas foi observada com taxas de germinação superiores a 80%. As plântulas obtidas apresentaram valores elevados nas taxas de crescimento em todas as salinidades utilizadas, demonstrando habilidade de aclimação da espécie as novas condições. Desta forma, este capítulo demonstrou o alto potencial de produção de plântulas de *U. ohnoi* utilizando técnicas de indução da reprodução. No terceiro capítulo, selecionamos linhagens gametofíticas e esporofíticas de *U. ohnoi* com o objetivo de obter linhagem que apresentassem tolerância a salinidades reduzidas e com alta eficiência de absorção de fósforo. As linhagens

obtidas apresentaram respostas variadas aos descritores utilizados. Entretanto, linhagens selecionadas em salinidade 25 obtiveram os melhores resultados. As linhagens LE01-25 e LE02-25 apresentaram altos valores de eficiência de absorção de fósforo, com média de $98,80 \pm 2,31\%$ e $97,66 \pm 5,39\%$, respectivamente. Foram observados valores de velocidade de absorção de fósforo superiores a $60 \mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em linhagens esporofíticas. Altas taxas de crescimento também foram observadas, LE01-25 apresentou TC de $34,31 \pm 1,51\% \text{ dia}^{-1}$ quando incubada com $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Desta forma, este capítulo demonstrou a possibilidade de seleção de linhagens, por meio de células reprodutivas, para obter algas adaptadas as condições desejadas de salinidade com uma boa eficiência e velocidade de absorção de fósforo. Sendo assim, acreditamos que nossos resultados demonstram o potencial de uso da *Ulva ohnoi* em programas de visam a fitorremediação e produção de biomassa para diversos fins.

Palavras-chave: *Ulva ohnoi*, Fitorremediação, Seleção de linhagens

GENERAL ABSTRACT

Green macroalgae of *Ulva* genus are known for high growth rate and nutrient absorption. It is therefore a tool for use in phytoremediation programs of effluents or impacted areas. Similarly, the production of biomass for various purposes is of great interest to the biomolecule market. However, world production of these organisms is low and one reason is need to obtain techniques and strains that best tolerate the growing conditions and provide economically desired characteristics. Thus, we present in the first chapter, identification, based on molecular analyzes, of the green macroalgae *U. ohnoi*, a possible non-native species that occurs in the Brazilian coast. This species is known to exhibit rapid growth with high rates of nitrogen and phosphorus absorption. In this chapter, we evaluated the phytoremediation potential of *U. ohnoi* in the removal of cadmium and the influence that temperature and salinity have on this process. When in presence of cadmium, *U. ohnoi* presented reduction in the photosynthetic parameters and reduced growth rate. However, this species presented resistance to cadmium when maintained under optimal conditions of temperature and salinity. Our results demonstrate removal of $81.3 \pm 1.1\%$ of the Cd added at the concentration of $0.625 \mu\text{g L}^{-1}$ when the salinity was 15 and temperature was 18°C . Thus, *U. ohnoi* presented potential in phytoremediation of cadmium in marine or brackish waters. In the second chapter, we evaluated the interactive effects of salinity and phosphorus on reproductive aspects of *U. ohnoi* in order to optimize the production of germlings that could be used in biomass production or in bioremediation programs. We observed that the reduction in salinity from 35 to 25, together with the addition of $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus resulted in $94.17 \pm 1.89\%$ of the thallus transformed into reproductive structure. A high intensity of reproductive cells release was observed with germination rates higher than 80%. Germlings obtained higher values of growth rate in all salinities used, demonstrating the ability of species acclimatization the new conditions. Thus, this chapter demonstrated the high potential of *U. ohnoi* germlings production using reproduction induction techniques. In the third chapter, we selected *U. ohnoi* gametophytic and sporophytic strains with the objective of obtaining strains that presented tolerance to reduced salinities and with high phosphorus absorption efficiency. The obtained strains presented varied answers to the descriptors used. In addition, strains selected in salinity 25 obtained the best results. Strains LE01-25 and LE02-25 presented high values of phosphorus absorption efficiency, with a mean

of $98,80 \pm 2,31\%$ and $97,66 \pm 5,39\%$, respectively. Phosphorus absorption velocity values greater than $60 \mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ were observed in sporophytic strains. High growth rates were also observed, LE01-25 presented GR of $34.31 \pm 1.51\% \text{ day}^{-1}$ when incubated with $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ phosphorus. In this way, this chapter demonstrated the possibility of selecting strains, through reproductive cells, to obtain macroalgae adapted to the desired salinity conditions with a good efficiency and phosphorus absorption rate. Therefore, we believe that our results demonstrate the potential of using *Ulva ohnoi* in phytoremediation and biomass production programs for various purposes.

Keywords: *Ulva ohnoi*, Phytoremediation, Strains selection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida de *Ulva*. Caixa interna representa o ciclo de vida básico com alternância de gerações entre esporófitos diplóides e gametófitos haplóides isomórficos. Caixas externas representam eventos alternativos no ciclo de vida. Porcentagens são relativas aos estudos com *Ulva mutabilis* (Fjeld e Løvlie, 1976). R! = meiose. Modificado de Tanner (1981). 31

Figura 2 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança com 1000 bootstraps baseada em 1141 pb do marcador molecular rbcL. Outras amostras com sequências rbcL idênticas às sequências de *Ulva ohnoi* do Brasil (U7FNPE; U8FNPE) incluem os seguintes números do GenBank: Índia (KP279696; KP279697; KP279698; KP279699; KP279700; KP279702; KP279703; KP279704 – Kazi et al., 2016) ; Japão (AB116035; AB116036; AB116037; AB116038; AB116039; AB116040 - Hiraoka et al., 2004b); Hawaii, EUA (GU138241; GU138250 - O'Kelly et al., 2010) e EUA (KU561279; KU561280; KU561282; KU561283; KU561285; KU561286; KU561287; KU561288; KU561289; KU561290; KU561291; KU561292; KU561293; KU561294; KU561295; KU561296; KU561297; KU561299 - Melton et al., 2016a). 58

Figura 3 - Aspecto do talo de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) após 8 dias. 60

Figura 4 - Grau de branqueamento do talo de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) após 8 dias. Barras representam média \pm DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). 61

Figura 5 - Taxa de crescimento (TC) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 8 dias. Barras representam média \pm DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). 63

Figura 6 - Taxa de transporte de elétrons absoluta (ETRabs), de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) depois de 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05). 65

Figura 7 - Rendimento Quântico Máximo (Fv / Fm), de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) depois de 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05)..... 67

Figura 8 - Taxa de Transporte de Elétrons Absoluta (ETRabs), em intensidades de irradiância PARabs crescentes (curvas ETRabs x irradiância PARabs) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 4 e 8 dias. Pontos representam média para n = 3. 68

Figura 9 - Acúmulo de cádmio no talo de *Ulva ohnoi* exposto a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05). 70

Figura 10 - Fator de Concentração (FC) de Cd no talo de *Ulva ohnoi* exposto a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) depois de 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05)..... 71

Figura 11 - Taxa de crescimento de talos adultos (TCa) de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹) depois de 7 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc de SNK (p < 0,05). .. 91

Figura 12 - Área reprodutiva (%) de talos adultos de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹) depois de 2, 4 e 6 dias. Barras representam média

± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc de SNK (p < 0,05).....	93
Figura 13 - Número de gametas liberadas por <i>Ulva ohnoi</i> exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L ⁻¹) depois 2, 4 e 6 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. A = S10, B = S15, C = S25 e D = S35.....	95
Figura 14 - Taxa de germinação das células reprodutivas de <i>Ulva ohnoi</i> exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L ⁻¹) depois de 7 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05).	97
Figura 15 - Taxa de crescimento das plântulas (TCp) de <i>Ulva ohnoi</i> exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L ⁻¹) depois de 7 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc de SNK (p ≤ 0,05)....	98
Figura 16 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 µmol L ⁻¹ e salinidade 15. Dados representam médias ± DP. n = 4	117
Figura 17 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 µmol L ⁻¹ e salinidade 25. Dados representam médias ± DP. n = 4	118
Figura 18 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 µmol L ⁻¹ e salinidade 35. Dados representam médias ± DP. n = 4	119
Figura 19 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 µmol L ⁻¹ e salinidade 15. Dados representam médias ± DP. n = 4	120
Figura 20 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 µmol L ⁻¹ e salinidade 25. Dados representam médias ± DP. n = 4	121

Figura 21 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 35. Dados representam médias \pm DP. n = 4	122
Figura 22 - Taxa de crescimento de diferentes linhagens de talos gametofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 24 horas e 6 dias de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Dados representam médias \pm DP. n = 4	128
Figura 23 - Taxa de crescimento de diferentes linhagens de talos esporofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 24 horas e 6 dias de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Dados representam médias \pm DP. n = 4	129
Figura 24 - Concentração de fósforo no tecido (%) de diferentes linhagens de talos gametofíticos e esporofíticos de <i>Ulva ohnoi</i> durante 1440 min de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Dados representam médias \pm DP. n = 4.	131

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resumo da análise ANOVA fatorial comparando o grau de branqueamento, taxa de crescimento (TC), taxa de transporte de elétrons absoluta (ETRabs), rendimento quântico máximo (Fv / F m), absorção de cádmio e fator de concentração (FC) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Diferenças significativas estão em negrito (p < 0,05). 72
- Tabela 2 - Valores de correlação de Pearson obtidos entre variáveis dependentes após exposição de *Ulva ohnoi* a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Tratamentos significativamente correlacionados são atribuídos em negrito (p < 0,05). Variáveis dependentes: Grau de Branqueamento, Taxa de Crescimento (TC), Taxa de Transporte de Elétrons Absoluto (ETRabs), Rendimento Quântico Máximo (Fv / F m), Acúmulo de Cádmio e Fator de Concentração (FC). 72
- Tabela 3 - Recentes trabalhos sobre eficiência de absorção do metal cádmio por macroalgas..... 77
- Tabela 4 - Resumo da análise ANOVA fatorial comparando Taxa de crescimento de talos adultos (TCa), Taxa de germinação e Taxa de crescimento de plântulas de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹) depois de 7 dias. Tratamentos significativos estão em negrito (p < 0,05). 91
- Tabela 5 - Resumo da análise ANOVA com medidas repetidas comparando as Áreas reprodutivas e as Taxas de liberação de gametas de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹) depois de 2, 4 e 6 dias. Tratamentos significativos estão em negrito (p < 0,05). 92
- Tabela 6 Resumo de SNK comparando o Número de gametas liberadas por *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹) depois de 2, 4 e 6 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc SNK (p < 0,05)...... 96

Tabela 7 - Valores de correlação de Pearson obtidos entre variáveis dependentes após exposição de *Ulva ohnoi* a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Tratamentos significativamente correlacionados são atribuídos em negrito ($p < 0,05$). Variáveis dependentes: Taxa de crescimento de talos adultos (TCa), Média das Áreas reprodutivas, Total de gametas liberados, Taxa de germinação, Taxa de crescimento das plântulas (TCp)..... 99

Tabela 8 - Eficiência de absorção (%) do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 1440 min de exposição. Letras e símbolos diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). $n = 4$ 123

Tabela 9 - Valores máximos das velocidades de absorção (V) do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15, 30, 60, 120, 180 e 1440 min de exposição. Valores em $\mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ seguido da linhagem que apresentou maior valor do grupo. 124

Tabela 10 - Resumo da análise ANOVA com medidas repetidas para os parâmetros cinéticos de absorção de fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15 e 1440 min de exposição. Tratamentos significativos estão em negrito ($p < 0,05$)..... 125

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de absorção do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15 e 1440 min de exposição. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). $n = 4$ 126

Tabela 12 - Resultados da ANOVA com medidas repetidas comparando a taxa de crescimento (TC) de linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* incubadas em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 24 horas e 6 dias. Efeitos significativos estão em negrito ($p < 0,05$)..... 127

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	13
GENERAL ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	27
1.1 O Gênero <i>Ulva</i>	27
1.1.1 Influência de Fatores Ambientais no Crescimento de <i>Ulva</i> spp.	28
1.1.2 Ciclo de Vida e Reprodução no Gênero <i>Ulva</i>	31
1.1.3 Indução da Reprodução em <i>Ulva</i> spp.....	32
1.1.4 Influência de Fatores Ambientais na Germinação de Células Reprodutivas de <i>Ulva</i> spp.	33
1.2 Utilização de Macroalgas: Ênfase em Espécies do Gênero <i>Ulva</i>	35
1.3 Seleção de Linhagens.....	37
1.4 Relação entre Metais Traço e Macroalgas	38
1.4.1 O Metal Cádmio.....	40
1.5 Objetivos	43
CAPÍTULO 2.....	45
Potencial fitorremediador de <i>Ulva ohnoi</i> (Chlorophyta, Ulvales): influência da temperatura e salinidade na eficiência de remoção e toxicidade do cádmio	45
RESUMO	47
ABSTRACT.....	49
2.1 Introdução	51
2.2 Material e Métodos	53
2.2.1. Material Algal e Condições de Cultura	53
2.2.2. Identificação.....	54
2.2.3. Delineamento Experimental e Procedimentos	55
2.2.4. Grau de Branqueamento e Taxas de Crescimento.....	55
2.2.5. Parâmetros Fotossintéticos.....	56
2.2.6. Remoção do Cádmio	56
2.2.7. Análises Estatísticas	57
2.3 Resultados	57
2.3.1. Manutenção no Laboratório - Pré-experimento	57
2.3.2. Identificação.....	58

2.3.3.	Grau de Branqueamento e Taxas de Crescimento	59
2.3.4.	Parâmetros Fotossintéticos	64
2.3.5.	Acúmulo de Cádmio	69
2.3.6.	Análise de Correlação	72
2.4	Discussão	73
2.5	Conclusão	78

CAPÍTULO 3..... 79

Interações entre salinidade e disponibilidade de fósforo podem influenciar na produção de células reprodutivas de *Ulva ohnoi* (Chlorophyta, Ulvales)79

RESUMO..... 81

ABSTRACT..... 83

3.1. Introdução..... 85

3.2. Materiais e Métodos..... 87

3.2.1. Condições Pré-experimentais..... 87

3.2.2. Identificação do Estádio do Ciclo de Vida..... 87

3.2.3. Desenho Experimental e Procedimentos 87

3.2.4. Efeitos da Salinidade e Fósforo nas Taxas de Crescimento, Indução da Reprodução e Liberação de Células Reprodutivas 88

3.2.5. Efeitos da Salinidade e Fósforo na Taxa de Germinação e Crescimento das Plântulas 89

3.2.6. Análises Estatísticas..... 89

3.3. Resultados..... 90

3.3.1. Identificação do Estádio do Ciclo de Vida..... 90

3.3.2. Taxas de Crescimento de Talos Adultos, Indução da Reprodução e Liberação de Gametas..... 90

3.3.3. Taxa de Germinação e Taxa de Crescimento das Plântulas.. 96

3.3.4. Análise de Correlação..... 98

3.4. Discussão..... 99

3.5. Conclusão..... 104

CAPÍTULO 4..... 105

SELEÇÃO DE LINHAGENS EM <i>Ulva ohnoi</i> (Chlorophyta, Ulvales)	105
RESUMO	107
ABSTRACT	109
4.1. Introdução	111
4.2. Material e Métodos	112
4.2.1. Condições Pré-experimentais	112
4.2.2. Obtenção das Linhagens	112
4.2.3. Absorção de Fósforo	113
4.2.4. Taxa de Crescimento	115
4.2.5. Concentração de Fósforo no Tecido	115
4.2.6. Análises Estatísticas	115
4.3. Resultados	116
4.3.1. Absorção de Fósforo	116
4.3.2. Taxa de Crescimento	127
4.3.3. Concentração de Fósforo no Tecido	130
4.4. Discussão	132
4.5. Conclusão	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
REFERÊNCIAS	139

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O Gênero *Ulva*

O gênero *Ulva* foi descrito por Linnaeus em 1753. Hoje compreende um grupo de 130 espécies aceitas taxonomicamente e estão distribuídas em diversos ambientes com clima tropical ao polar (Guiry e Guiry, 2019), resultando em ampla diversidade de características morfológicas, anatômicas e citológicas com alta plasticidade intraespecífica, tornando a identificação das espécies um tanto complexa (Flagella et al., 2010). Padrões de desenvolvimento, detalhes reprodutivos e cruzamentos entre indivíduos são características importantes para a identificação das espécies deste gênero (Guiry e Guiry, 2019). Diante dessas dificuldades, o uso de técnicas moleculares, utilizando marcadores como ITS, *tufA* e *rbcL*, tem se mostrado uma boa ferramenta para a separação das espécies (Hiraoka et al., 2004b; Melton et al., 2016b).

As espécies de *Ulva* possuem cor verde com talos formados por duas camadas de células crescendo independentemente e formando uma lâmina distromática ou tubular monostromático oco simples ou ramificado. O talo pode ser liso ou lobulado, com margens planas, caneladas ou dentadas (Hayden et al., 2003; Nakanishi et al., 1996). A plasticidade morfológica intraespecífica é encontrada e está relacionada as variações bióticas e abióticas (ex.: dessecação, temperatura, irradiância, fluxo da água e bactérias simbiotes) referentes aos ambientes em que estão fixadas.

Ulva spp. ocupam normalmente a zona entremarés do litoral marinho, onde se fixam ao substrato consolidado por meio de células rizoidais formando um disco basal (Guiry e Guiry, 2019). Entretanto, também são encontradas espécies de vida livre que flutuam com as correntes marinhas (Melton et al., 2016a). Frequentemente são reportadas em estuários e lagunas costeiras, especialmente quando estes ambientes apresentam aumento na concentração de nitrogênio e fósforo (Lanari e Copertino, 2017; Netto et al., 2018). Diante da diversidade de ambientes e variações de fatores abióticos, algumas espécies de *Ulva* são consideradas oportunistas, possuindo capacidade de absorção rápida e armazenamento de grande quantidade de nutrientes para metabolizar nos períodos de escassez (Cohen e Neori, 1991; Copertino et al., 2009). Aliado a estes fatores, a morfologia simples e a alta capacidade reprodutiva permitem a ocupação rápida de substratos e o deslocamento de espécies (Smetacek e Zingone, 2013). Algumas espécies são resistentes e podem sobreviver em condições severas como privação de

luz por longos períodos (Santelices et al., 2002) e condições hipersalinas (Angell et al., 2015).

Em ambientes com condições eutróficas, ocorre o crescimento descontrolado de algumas espécies formando as marés verdes. Estas condições estão aumentando com o crescimento da urbanização das zonas costeiras, tornando cada vez mais frequente o registro de marés verdes (Smetacek e Zingone, 2013). Desta forma, com a utilização de ferramentas moleculares, foram identificadas 8 espécies formadoras de maré verde (Melton et al., 2016a), sendo 3 espécies (*U. rigida*, *U. prolifera* e *U. compressa*) encontradas no litoral brasileiro até o momento (Guiry e Guiry, 2019). Estas florações de *Ulva* spp. provocam diversos problemas ambientais e socioeconômicos sendo necessário ações que mitiguem estes impactos. Entretanto, estas espécies possuem um importante potencial para utilização em sistemas de biorremediação de poluentes ou zonas contaminadas (Wu et al., 2018).

1.1.1 Influência de Fatores Ambientais no Crescimento de *Ulva* spp.

O desenvolvimento de processos que visam a produção de macroalgas tem como objetivo principal a manutenção do crescimento, consequentemente, a produção de biomassa para ser utilizada diretamente ou na extração de bioprodutos (Bostock et al., 2010). Desta forma, para obtenção do ótimo crescimento é necessário alcançar um balanço positivo em relação aos efeitos ambientais positivos e negativos sobre o organismo (Gustavs et al., 2009). Portanto, entender de que forma os fatores ambientais e suas interações influenciam o crescimento deve ser o primeiro e mais importante objetivo de um programa que deseje a utilização de macroalgas para produção de biomassa e/ou biorremediação.

Dentre os fatores mais importantes para o crescimento, a temperatura é um fator essencial, influenciando na fluidez de membranas em todos os processos metabólicos. A temperatura afeta a absorção de nutrientes, a fotossíntese, e, consequentemente, o crescimento (Lobban e Harrison, 1994). Para espécies de *Ulva*, a temperatura ideal para o crescimento ótimo está correlacionada ao regime de temperatura do ambiente em que vivem (Fortes e Lüning, 1980). Por exemplo, *U. fasciata* coletada em uma população na costa oeste Índia apresentou crescimento ótimo em 25°C, reduzindo 60% do crescimento se mantida em 20°C e 25% em 30°C (Mantri et al., 2011). Já para *U. fenestrata* coletada na costa do Japão, o crescimento ótimo foi obtido quando incubada em 10°C, redução de 20% em 20°C e 15% em 5°C (Kalita e Tytlianov, 2003).

A luz é outro fator primordial para o crescimento de *Ulva* spp. devido seu papel na fotossíntese. O crescimento possui alta dependência da fotossíntese com relação similar à da irradiância com a fotossíntese. Neste processo, a fotossíntese aumenta com o aumento da irradiância atingindo um ponto de compensação (fotossíntese passa a ser maior que a respiração) e um pico máximo (irradiância de saturação) onde a fotossíntese também é máxima. Entretanto, quando a irradiação supera a irradiação de saturação ocorre a fotoinibição (Jassbyl e Platt, 1976; Lobban e Harrison, 1994). As respostas do crescimento sob influência da luz são dependentes das espécies e do histórico do local onde são encontradas (Arnold e Murray, 1980). Entretanto, *Ulva* spp. possuem capacidade de aclimação rápida às condições de luminosidade, variando a quantidade de conteúdo pigmentar no talo. Por exemplo, *U. lactuca* manteve o crescimento aumentando o conteúdo de clorofila *a* quando incubada com radiação PAR de 0,6 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Vermaat e Sand-Jensen, 1987). Também são registradas uma gama de irradiância de saturação para diferentes espécies e locais. Por exemplo, para *U. lactuca* da Coreia, a irradiância de saturação foi de 70 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto para *U. linza* da China foi de 689 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fortes e Lüning, 1980; Kim et al., 2011). A fotoinibição tende a ocorrer em intensidades muito altas de luz para este gênero. Arnold e Murray (1980) encontraram redução na fotossíntese de *U. intestinalis* (39%), *U. lobata* (57%) e *U. rígida* (32%) quando incubadas com irradiação entre 1405 e 1956 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Em zonas sob influência das marés ou estuários, espécies de *Ulva* estão susceptíveis às variações da maré, chuvas, longos períodos de exposição solar direta e escoamento de água doce alterando a salinidade do ambiente em que vivem (Lobban e Harrison, 1994). Embora ambientes sejam estressantes para a maioria das macroalgas, adaptações no controle da osmorregulação possibilitaram que algumas espécies colonizassem estas regiões. *Ulva* spp. são tolerantes às variações de salinidade e possuem facilidade de aclimação a baixas ou altas salinidades, resultando, através de sucessivas gerações, na formação de diferentes ecótipos (Lobban e Harrison, 1994). Taylor et al. (2001) estudaram a tolerância às variações de salinidade em 4 espécies de *Ulva* (*U. curvata*, *U. rígida*, *U. compressa* e *U. linza*) formadoras de marés verdes na Inglaterra. No ambiente onde foram coletadas, a salinidade variava entre 32,3 e 34,7, entretanto as espécies cresceram em laboratório quando incubadas em salinidades de 3 até 34. Esta tolerância está ligada ao desenvolvimento de defesas, aumentando a disponibilidade de antioxidantes e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes devido

a mudança na salinidade (Lu et al., 2006). Além disso, podem utilizar íons de K^+ , Na^+ , Cl^- e SO_4^{2-} para equilibrar a pressão osmótica com baixo custo energético (Karsten, 2012).

Os nutrientes são outro fator importante para a manutenção do crescimento em espécies de *Ulva*. O gênero é conhecido como oportunista e domina zonas costeiras eutrofizadas, principalmente com altas concentrações de nitrogênio e fósforo (Luo et al., 2012). Em ambientes costeiros, o nitrogênio pode ser um fator limitante para o crescimento de *Ulva* spp.. Por outro lado, em regiões que possuem alta sedimentação, sedimentos derivados de carbonato de cálcio e/ou com intensa atividade fitoplânctônica possam levar o ambiente a limitação por fósforo (Lapointe et al., 1992; McGlathery et al., 1994). No ambiente, o nitrogênio pode estar presente em diferentes formas; entretanto, muitas macroalgas marinhas utilizam, preferencialmente, o amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (Lobban e Harrison, 1994). Ale et al. (2011) analisaram a preferência de *U. lactuca* por NH_4^+ e NO_3^- como fonte de nitrogênio e observaram maior crescimento em indivíduos cultivados com NH_4^+ ($NH_4^+ = 16.4 \pm 0.18\% \cdot dia^{-1}$ e $NO_3^- = 9.4 \pm 0.72\% \cdot dia^{-1}$). Os autores também observaram maior taxa de absorção de NH_4^+ em relação a NO_3^- , inclusive quando os dois nutrientes estavam em conjunto. Naldi e Wheeler (1999) observaram maior acúmulo de nitrogênio total com consequente aumento de proteínas totais e aminoácidos no tecido de *U. fenestrata* quando mantida com NH_4^+ em relação a NO_3^- . A preferência por NH_4^+ em relação a NO_3^- estaria relacionado ao fato de o amônio estar disponível em estado reduzido, facilitando sua absorção. Para o fósforo, as macroalgas absorvem principalmente o ortofosfato (PO_4^{3-}) (Lobban e Harrison, 1994). Frequentemente, as macroalgas possuem seu crescimento limitado por fósforo; principalmente em ambientes em que as concentrações de nitrogênio são baixas (Lobban e Harrison, 1994). Para *U. fenestrata*, as taxas de crescimento são reduzidas mais rapidamente quando limitadas por fósforo, em comparação com a limitação por nitrogênio (Bjornsater e Wheeler, 1990). Entretanto, em culturas não limitadas por nitrogênio, o crescimento reduz quando as concentrações de fósforo no meio ultrapassam $20 \mu mol L^{-1}$ em *U. compressa* e *U. curvata*, $30 \mu mol L^{-1}$ para *U. rigida* e $60 \mu mol L^{-1}$ para *U. linza* (Taylor et al., 2001). Em cultivo integrado com camarão (*Litopenaeus vannamei*), *U. clathrata* absorveu 50% do fósforo em 15 horas, demonstrando potencial de remoção de $0,72 \text{ mg g}$ (biomassa seca)⁻¹ de fósforo por dia (Copertino et al., 2009).

1.1.2 Ciclo de Vida e Reprodução no Gênero *Ulva*

O ciclo de vida no gênero *Ulva* é complexo e apresenta diferentes vias de acordo com as condições extracelulares em que os talos são expostos (Fjeld e Løvlie, 1976). Basicamente, o ciclo de vida ocorre com alternância de gerações isomórficas entre esporófitos diplóides e gametófitos haplóides. Gametófitos podem liberar gametas masculinos ou femininos formados por mitose, enquanto o esporófito libera zoósporos formados por meiose. Os gametas são biflagelados com fototaxia positiva e os zoósporos apresentam quatro flagelos e fototaxia negativa (Raven et al., 2008) (Figura 1).

Reprodução via partenogênese também foi reportado para o gênero (Tanner, 1981; van den Hoek et al., 1995). Em *U. mutabilis*, gametas podem se desenvolver partenogeneticamente em gametófitos (1 a 2%) ou esporófitos (98 a 99%). Os partenosporófitos são haplóides ou diplóides (Fjeld e Løvlie, 1976). As vias de reprodução ocorrem em equilíbrio na natureza, sendo alteradas por eventos extracelulares como, por exemplo, baixa densidade de indivíduos ou condições desfavoráveis para a fusão dos gametas (Løvlie e Bryhni, 1978) (Figura 1).

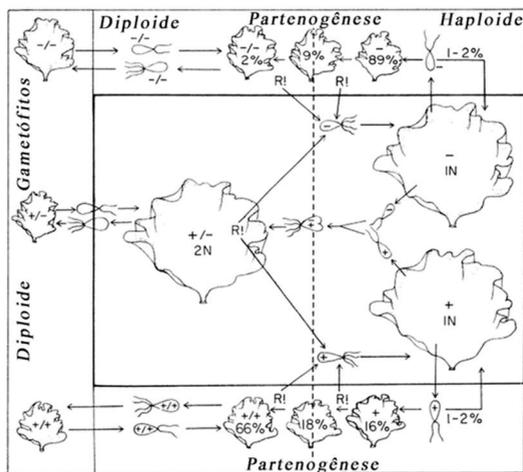


Figura 1- Ciclo de vida de *Ulva*. Caixa interna representa o ciclo de vida básico com alternância de gerações entre esporófitos diplóides e gametófitos haplóides isomórficos. Caixas externas representam eventos alternativos no ciclo de vida. Porcentagens são relativas aos estudos com *Ulva mutabilis* (Fjeld e Løvlie, 1976). R! = meiose. Modificado de Tanner (1981).

A reprodução assexuada por fragmentação do talo é comum no gênero, sendo possível a regeneração do talo a partir de uma única célula (Rusig e Cosson, 2001; Gao et al., 2010). Técnicas utilizando isolamento do protoplasto são utilizadas para reprodução assexuada e aumento da biomassa de *U. pertusa*, *U. fasciata* e *U. conglobata* (Reddy et al., 1989). Hiraoka et al. (2003) também relataram a liberação de células reprodutivas quadriflageladas com fototaxia negativa que possuíam DNA equivalentes às células vegetativas de *U. spinulosa* e são formados sem meiose.

A reprodução sexuada pode ser induzida através de modificações nas condições abióticas (ex.: dessecação, concentração de nutrientes e temperatura; Dan et al., 2002; Carl et al., 2014a). Após a indução, qualquer célula do talo pode ser modificada para a formação de gametas ou zoósporo, sendo comum a modificação das células marginais (Raven et al., 2008).

1.1.3 Indução da Reprodução em *Ulva* spp.

A reprodução em espécies de *Ulva* ocorre quando células vegetativas são transformadas em células reprodutivas por influência de fatores intrínsecos e extrínsecos (Hiraoka e Enomoto, 1998). A transformação ocorre, inicialmente, com estímulo externo e a temperatura ambiente é um dos fatores principais. Picos de reprodução de *U. pseudocurvata* na Alemanha são modificados ao longo das estações do ano, apresentando picos semanais no verão e quinzenais no inverno (Lüning et al., 2008), enquanto *U. lactuca* dos EUA, a reprodução ocorre apenas no verão (Niesenbaum, 1988). Em laboratório, os ciclo de reprodução de *U. fenestrata* foram reduzidos de 100 para 5 dias com o aumento da temperatura de 5 para 10 °C (Kalita e Titlyanov, 2011). Gao et al. (2017a) demonstraram que o aumento da temperatura combinado com aumento no pCO_2 e nitrato aumentaram a taxa de reprodução de *U. rigida* em 64,4%.

Como muitas espécies de *Ulva* ocupam a zona entremarés e estuários, elas estão sujeitas a níveis variados de salinidade provocados pelo aporte de água doce e dessecação nesses ambientes. Em uma baía no Golfo da Califórnia, foram observadas a formação de estruturas reprodutivas em cinco espécies de *Ulva* quando a salinidade variava entre 34,7 e 35,6 (Chávez-Sánchez et al., 2018). Para *U. prolifera* coletada em estuário no Japão, foi observado indução da reprodução entre salinidades 5 e 52, entretanto a liberação das células reprodutivas ocorreu apenas quando mantida entre 13 e 45 (Dan et al., 2002). Para *U. pertusa*, as taxas

de liberação das células reprodutivas ocorreram entre salinidades 15 e 55, com maiores valores entre 15 e 25 (Han et al., 2008). Mantri et al. (2011) observaram em laboratório que a redução da salinidade diminuiu o tempo de formação dos zoósporos em *U. fasciata*. Entretanto, Lin et al. (2011) observaram que a reprodução de *U. prolifera* ocorre somente em salinidades altas (40) e o crescimento vegetativo em baixas (10 e 20).

Os efeitos dos nutrientes sobre a indução da reprodução são pouco abordados na literatura, entretanto, os trabalhos existentes têm demonstrado uma forte relação. Acredita-se que a formação de células reprodutivas é induzida com o aumento nas concentrações de fósforo no meio e a liberação ocorra quando as concentrações de nitrogênio forem maiores. Esta relação é discutida por Imchen (2012) e Chávez-Sánchez et al. (2018). Gao et al. (2018) observaram que a adição de nutrientes (nitrato e fósforo) adiantaram o processo de formação de estruturas reprodutivas em *U. rígida*. Quando os autores adicionaram alta concentração de nutrientes (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrato e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo) ocorreu aumento de 64,4% na taxa de reprodução. Mohsen et al. (1974) observaram aumento na esporogênese e liberação de esporos quando adicionado nitrato ao meio. Os autores observaram ainda aumento na reprodução assexuada, através de zigósporos, quando *U. fasciata* estava limitada por nitrogênio.

1.1.4 Influência de Fatores Ambientais na Germinação de Células Reprodutivas de *Ulva* spp.

A temperatura ambiente é um dos fatores principais na germinação de células reprodutivas em *Ulva* spp. Geralmente, a temperatura ideal para que o processo de germinação ocorra está relacionada com a ocorrência média deste parâmetro no ambiente onde a população está inserida e variações em torno desta média podem diminuir ou aumentar a velocidade do processo, desde que os limites de tolerância não seja ultrapassados (Woodhead e Moss, 1975). Por exemplo, Song et al. (2015) analisaram a germinação de esporos de *U. prolifera*, *U. linza* e *Ulva* sp. coletadas em três zonas na costa norte da China com temperaturas variando de 1 a 30 °C ao longo das estações. Os autores não registraram germinação dos esporos quando mantidos em 5 °C e os valores máximos foram obtidos em 15 °C, 10 °C, 25 °C para *U. prolifera*, *U. linza* e *Ulva* sp., respectivamente.

A luz é outro fator importante para o processo de germinação. A germinação não ocorre se as células reprodutivas forem mantidas no escuro por longos períodos e uma redução linear na sobrevivência é

observado com o aumento do tempo de permanência no escuro. Quando exposta a luz, as taxas de germinação são maiores quando o tempo de permanência no escuro são menores, com atrasos na germinação quando os esporos são incubados por longos períodos no escuro (Kolwalkar et al., 2007). Finlay et al. (2008) obtiveram melhores resultados quando os esporos de *Ulva* sp. foram mantidos em $12 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A qualidade da luz tamb\u00e9m pode afetar a germinação das c\u00e9lulas reprodutivas. Para *U. pertusa*, Han et al. (2004) observaram redu\u00e7\u00e3o acima de 50% na germinação quando esporos incubados por 40 minutos em UV-B com $05\text{-}1,0 \text{ W.m}^{-2}$. Entretanto, quando exposta a luz azul, a germinação era aumentada diminuindo os efeitos da irradiação UV-B.

Poucos estudos demonstraram influ\u00eancia da salinidade nas taxas de germinação. Uma resposta linear foi encontrada para *U. fasciata* por Mantri et al. (2011), onde maiores taxas de germinação foram encontradas quando incubados com salinidade 30 e menores em 15. Sousa et al. (2007), observaram tamb\u00e9m que o crescimento dos esporos diminui significativamente quando s\u00e3o incubados em salinidade 5, entretanto o crescimento aumenta quando incubados acima de salinidade 20.

As concentra\u00e7\u00f5es de nutrientes, especialmente f\u00f3sforo e am\u00f4nia, tem apresentado influ\u00eancia na germinação de c\u00e9lulas reprodutivas e crescimento das pl\u00e2ntulas de esp\u00e9cies de *Ulva*, demonstrando maior sensibilidade em rela\u00e7\u00e3o as macroalgas adultas (Sousa et al., 2007). Em *U. flexuosa*, o crescimento dos zo\u00f3sporos foi significativamente influenciado pelas concentra\u00e7\u00f5es de nitrato utilizadas, com redu\u00e7\u00e3o de quase 50% quando as concentra\u00e7\u00f5es passaram de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Imchen, 2012). Os mesmos autores relatam que o excesso de f\u00f3sforo ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) inibiu o crescimento dos zo\u00f3sporos.

Embora fatores isolados tenham influ\u00eancias sobre a germinação ou crescimento das c\u00e9lulas reprodutivas de esp\u00e9cies de *Ulva*, um n\u00famero crescente de trabalhos tem demonstrado que a intera\u00e7\u00e3o entre os fatores pode demonstrar resultados diferentes e representam melhor a realidade dos ambientes. Para *U. flexuosa*, o crescimento de zo\u00f3sporos \u00e9 estimulado em quase 50% quando a salinidade est\u00e1 em 25 e com $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de f\u00f3sforo adicionado ao meio, enquanto que para nitrato o crescimento \u00e9 maior quando em salinidade 15 e 25 com adi\u00e7\u00e3o de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrato ao meio. Quando as concentra\u00e7\u00f5es de nitrato eram aumentadas, o crescimento era reduzido (Imchen, 2012). A irradiação e as concentra\u00e7\u00f5es de f\u00f3sforo tamb\u00e9m apresentam intera\u00e7\u00f5es significativas para *U. flexuosa* com aumento do crescimento quando exposta em alta irradiação ($80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e baixa concentra\u00e7\u00e3o de f\u00f3sforo ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$), diminuindo o crescimento na medida que as concentra\u00e7\u00e3o de f\u00f3sforo

aumentaram (Imchen, 2012). Em *U. fasciata*, Mantri et al. (2011) observaram maiores taxas de germinação em salinidade 30 e temperatura de 25 °C.

Fatores bióticos também podem influenciar as taxas de germinação de células reprodutivas de *Ulva*. Secreções bacterianas, principalmente de *Pseudoalteromonas tunicata* *Alteromonas* sp., *Halomonas marina*, *Sulfitobacter* spp. e *Shewanella* spp., reduzem ou inibem completamente a germinação através de proteínas, peptídeos ou lactonas (Egan et al., 2001; Silva-Aciaras e Riquelme, 2008; Twigg et al., 2014). A presença de herbívoros também afetam a germinação e o crescimento de esporos desempenhando um importante papel no controle de populações de *Ulva* (Lotze et al., 1999).

1.2 Utilização de Macroalgas: Ênfase em Espécies do Gênero *Ulva*

O registro arqueológico mais antigo de utilização de macroalgas pelo ser humano data por volta de 14000 anos atrás no sul do Chile (Dillehay et al., 2008). Entretanto, registros escritos só mencionam o uso a partir do século IV e VI para o Japão e China, onde produtos alimentícios feitos com algas marinhas eram confeccionados (McHugh, 2003; Tseng, 1987). Entre 1600-1800 d.C. a obtenção destes organismos passou de, exclusivamente extrativista, para, também, ser cultivada (Tamura, 1966). O aumento da demanda por biomassa e produtos oriundos de algas marinhas, principalmente a partir da década de 50, pós segunda guerra mundial, desencadeou um surpreendente crescimento na produção proveniente da aquicultura (McHugh, 2003). Segundo os dados da FAO (2018), a produção em 2016 alcançou 30 milhões de toneladas, sendo a China (47,9%) e Indonésia (38,7%) os maiores produtores. Este crescimento foi possível, principalmente, com o aumento na produção de espécies dos gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus*, que representaram juntas 40% da produção mundial em 2016.

Inicialmente as algas marinhas eram utilizadas para alimentação direta e medicina tradicional (Buchholz et al., 2012). No Japão, *Ulva* spp. (Alface do mar, Awosa, Aosa ou Aonori) são consumidas em sopas, sendo uma importante fonte de proteína e minerais (Chapman e Chapman, 1980). A partir do século 17, com a descoberta das propriedades de gelificação, a extração de hidrocolóides ganhou destaque. Este composto é formado por hidratos de carbono solúveis e, em água, forma uma solução viscosa sem cor, cheiro ou gosto (McHugh, 2003). São extraídos de algas vermelhas (carragenana e ágar), algas pardas (alginato) e algas verdes (ulvana) e possuem variadas utilizações na indústria, tais como:

gelatinas, adesivos especiais, emulsificantes, inseticidas e produção de cosméticos (Oliveira, 1997; Pengzhan et al., 2003).

Em virtude de determinadas características apresentadas por alguns gêneros, novas utilidades foram surgindo ao longo dos anos. Espécies, principalmente do gênero *Ulva*, tornaram-se boas bioindicadoras de contaminação por apresentarem capacidade de crescimento e tolerância a altos níveis de contaminantes em conjunto com resistência as variações ambientais (Favero et al., 1996). A forma laminar do talo, com células uniformes, proporciona alta relação área : volume, contribuindo para a absorção dos poluentes (Villares et al., 2001). Estudos como os de Ho (1990), Favero et al. (1996) e Rybak et al. (2013) demonstram a eficiência de *Ulva* spp. como bioindicadoras de metais como Zn, Cr, Ni, Cd, Cu, Co e Mn em zonas tropicais e subtropicais. Entretanto, Villares (2001) alerta que fatores ambientais (temperatura, salinidade, irradiação) podem alterar a taxa de crescimento, podendo afetar a absorção de contaminantes e interferir na eficiência como bioindicadoras.

A capacidade de acumular metais em ambiente natural tem recebido maior atenção nas últimas décadas, possibilitando o estudo para aplicação destes organismos na recuperação e proteção ambiental de áreas contaminadas ou a recuperação de metais de interesse dos efluentes (Mehta e Gaur, 2005). Duas estratégias são recorrentes; a utilização das macroalgas vivas e a utilização de biomassa não viva. Cada estratégia possui suas peculiaridades e estudos têm demonstrado ser uma forma eficiente e econômica na remoção de metais em ambientes e/ou condições onde os métodos físicos e químicos tradicionais possuem limitações (Hashim, 2004; Henriques et al., 2015; Rai et al., 1981). Neste sentido, Vecchia et al. (2012) obtiveram taxas de remoção de Cd de 30,7% utilizando *U. laetevirens* viva em água do mar. Ghoneim et al. (2014) utilizando biomassa não viva de *U. lactuca* removeram 99,2% de Cd in vitro. Henriques et al. (2015) ao comparar a remoção de Hg entre biomassa viva e biomassa não viva de *U. lactuca*, obteve melhores resultados com biomassa viva.

Por outro lado, as algas marinhas, especialmente as espécies de *Ulva*, são conhecidas por consumirem grandes quantidades de N e P do ambiente (Yokoyama e Ishihi, 2010; Al-Hafedh et al., 2015). Em ambientes com altas concentrações destes compostos ocorre crescimento descontrolado, resultando nas marés verdes com diversos problemas socioambientais causados quando da morte das algas (Smetacek e Zingone, 2013). Entretanto, estas florações de *Ulva* podem fornecer serviços ecossistêmicos inestimáveis se manejadas. Wu et al. (2018)

calcularam, durante uma das maiores marés verdes registradas na China, o potencial de remoção de N e P do ambiente. Os autores registraram crescimento da biomassa de 12,80% ao dia, aumentando de $1,1 \times 10^4$ para $4,1 \times 10^6$ toneladas de biomassa fresca em 50 dias, com um potencial de remoção de $7,46 \times 10^3$ e $1,05 \times 10^3$ toneladas de N e P respectivamente. Diante deste cenário, diversos estudos foram realizados utilizando espécies de *Ulva* para a remoção de N e P de águas residuais resultante da produção de outros organismos (Neori et al., 1991; Cohen e Neori, 1991; Yokoyama e Ishihi, 2010; Al-Hafedh et al., 2015; Guttman et al., 2018) ou de efluente do tratamento de esgoto doméstico (Chan et al., 1979; Wong e Lau, 1979; Gil et al., 2005; Tsagkamilis et al., 2010). Desta forma, o uso de algas marinhas para a remoção de N e P do efluente é essencial para a expansão do setor de produção aquícola, bem como, auxilia na redução dos níveis destes compostos em zonas costeiras contaminadas ou impedindo que entrem no sistema.

No Brasil, diversos estudos visando diferentes usos foram realizados com o gênero. As espécies *U. lactuca* e *U. fasciata* foram utilizadas como bioindicadoras de metais traço em zonas costeiras, acumulando principalmente As, Ba, Cu, Mn, Ni, Cd, Co, Cr e Pb (Drude et al., 1985; Carvalho et al., 1991; Lacerda et al., 1992; Karez et al., 1994; Paradas e Amado Filho, 2007; Brito et al., 2012). Neste sentido, Pilatti et al. (2016 e 2017) analisaram os efeitos da gasolina e diesel em *U. lactuca* com objetivo de avaliar seu potencial bioindicador para estes compostos. Amado Filho et al. (1997) avaliaram o potencial de acúmulo de Zn e obtiveram melhores resultados com *U. flexuosa*, seguido por *U. lactuca*. Visando a produção de biomassa para extração de polissacarídeos, Castelar et al. (2014) cultivaram *U. flexuosa* e *U. lactuca* em cordas no mar e obtiveram taxas de crescimento de 11,95 e 0,37% ao dia, respectivamente. Entretanto, os esforços nos últimos anos estão na utilização para a remoção de nutrientes (N e P) de efluentes (Oliveira et al., 2016), especialmente da aquicultura marinha (Alencar et al., 2010; Brito et al., 2014; Copertino et al., 2009; Maia et al., 2016; Nardelli et al., 2018), como alimento para camarões marinhos visando aumentar sua resistência ao ataque de doenças (Pallaoro et al., 2016) e na utilização da ulvana (Freitas et al., 2011; Delgado et al., 2013; Araujo e Stadnik, 2013; Araújo et al., 2014; Freitas e Stadnik, 2015).

1.3 Seleção de Linhagens

Nas últimas décadas a produção de macroalgas tem apresentado crescimento expressivo, totalizando 30 milhões de toneladas em 2016

(FAO, 2018). Este crescimento é reflexo de ações que incluíram a seleções de espécies e linhagens que possuíam características de interesse econômico e com alta produção (Levy e Friedlander, 1990a, b, c). Embora existam programas de melhoramento e seleção de espécies e linhagens de macroalgas, este setor ainda é embrionário quando comparado com o setor de agricultura terrestre (Robinson et al., 2013).

A seleção de linhagens busca melhorar a expressão de uma ou mais característica que são de interesse e de apelo comercial (Meneses e Santelices, 1999). Dentre estas características, o crescimento é uma das mais importantes (Macchiavello, 1998; Paula et al., 1999; Hayashi et al., 2007). Entretanto, outras características são desejadas de acordo com as necessidades. Por exemplo, a resistência a altas ou baixas temperaturas (Levy e Friedlander, 1990a; Yan et al., 2010), rendimento de ficocolóides (Hayashi et al., 2007; Muñoz et al., 2004), resistência a epífitas (Bulboa et al., 2007) e morfologia do talo (Li et al., 1999).

Ao longo dos anos, diferentes técnicas foram empregadas na seleção de linhagens e seus usos dependem das espécies e das características desejadas. Hayashi et al. (2008a) utilizaram técnicas de micropropagação com formação de calos aliada a aplicação de colchicina para selecionar linhagens com melhor crescimento em *Kappaphycus alvarezii*. Chen et al. (1982) utilizaram seleção a partir de esporos de *Chondrus crispus* induzindo mutações com colchicina. Técnicas de hibridização foram utilizadas em *Alaria esculenta* (Kraan e Guiry, 1998). Seleção a partir de esporos foram realizadas por Levy e Friedlander (1990a, c) para *Gracilaria verrucosa* e *Kappaphycus alvarezii* por Paula et al. (1999). Estudos buscando linhagens em populações diferentes também foram realizadas para *Chondracanthus chamissoi* (Bulboa et al., 2008) e espécies de *Ulva* (Fort et al., 2019). Lawton et al. (2013) encontraram respostas intraespecíficas diferentes no crescimento de cinco espécies de *Ulva* coletadas em diferentes populações da Austrália, indicando a formação de ecótipos resistentes a temperaturas baixas e altas.

1.4 Relação entre Metais Traço e Macroalgas

Embora não exista uma definição precisa sobre metais traço, existe um consenso que são elementos presentes, normalmente, em baixas concentrações ($> 100 \mu\text{g g}^{-1}$) no ambiente, ainda que as concentração possam variar dentro do ambiente, organismo e função biológica (Richir, 2016). Estes elementos são encontrados na forma de elementos nativos (cobre, ouro prata) ou na forma de óxidos, sulfuretos, carbonatados ou

fosfatados ligados aos minerais na crosta terrestre (Bouard et al., 2007). Muitos destes metais traço são considerados micronutrientes essenciais (Fe, Mn, Cu, Ni, Mo e Zn) e atuam em diversas funções metabólicas (exemplo: catalizadores em sistemas enzimáticos e ativadores de proteínas) dos organismos. Mesmo que sejam essenciais, quando estão em baixas concentrações causam deficiências, por outro lado, podem ser tóxicos quando absorvidos em grandes concentrações. Alguns metais traço são considerados não essenciais (Hg, Pb e Cd) por não possuírem função biológica conhecida e são tóxicos mesmo em baixas concentrações (Henriques et al., 2015). Desta forma, a essencialidade ou não destes elementos evolui com conhecimento científico (Bouard et al., 2007; Richir, 2016).

A introdução destes elementos no meio ambiente acontece de forma natural através de erosões, dissolução de rochas e solos e atividades vulcânicas. Estes processos, normalmente, liberam metais em concentrações extremamente baixas, sendo tolerante pela maioria dos organismos (Singh et al., 2011). As atividades antropogênicas também são outra forma de introdução destes elementos no meio ambiente. Durante milhares de anos as atividades humanas tem mobilizado e concentrado metais traço na superfície terrestre liberando, de forma localizada ou difusa, em ecossistemas aquáticos, terrestres e pela atmosfera (Bouard et al., 2007). Em ambiente marinho, as principais fontes naturais de introdução destes elementos são através da lixiviação continental e deposição atmosférica, entretanto, existe um crescente aumento nesta introdução através de atividades humanas como mineração, atividades agrícolas e urbanas.

No ambiente marinho os metais são encontrados dissolvidos na forma de íons livres, íons complexos quelados com ligantes inorgânicos (ex.: OH^- e Cl^-) ou complexados com ligantes orgânicos (ex.: proteínas e aminas). Podem ser encontrados também particulados em diversas formas, tais como adsorvidos em partículas, incorporados em partículas orgânicas (ex.: animais e vegetais) e agregados colidais (ex.: óxidos hidratados). Estas formas são mutáveis e o estado físico/químico destes elementos é controlado pelos fatores bióticos (atividades biológicas) e abióticos (pH, salinidade, alcalinidade, partículas, força iônica), diante disto, variações destes fatores podem alterar a disponibilidade dos metais na coluna da água, contribuindo para os efeitos de acumulação e toxicidade nos organismos (Lobban e Harrison, 1994). Estes elementos não são biodegradáveis e permanecem acumulados nos sedimentos ou nos organismos, causando doenças e desequilíbrio ambiental (Babich e Stotzky, 1978; Markham et al., 1980; Barwick e Maher, 2003).

Ecologicamente, a poluição com metais traço impactam diretamente na riqueza de espécies e na estrutura das comunidades, excluindo do ambiente, espécies sensíveis aos metais ou às concentrações em que eles se encontram (Meng et al., 2008). Por outro lado, algumas espécies são tolerantes e conseguem crescer nestes ambientes (Huan et al., 2018). Quando expostas, as macroalgas acumulam os metais em função da concentração no ambiente, tornando-se bioacumuladoras destes compostos (Henriques et al., 2015). Os metais são acumulados, principalmente, na parede celular através de ligações com polissacarídeos sulfatados ou podem ser internalizados (Webster et al., 1997).

Macroalgas do gênero *Ulva* são conhecidas como tolerantes a uma gama de contaminantes, incluindo metais (Villares et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado sua capacidade de absorção destes compostos e sua habilidade está ligada a sua morfologia simples e alta relação área : volume, além de seu crescimento rápido (Henriques et al., 2015). Em virtude destas características, diversos estudos foram realizados com objetivo de utilização de espécies deste gênero para a remoção de metais traço em efluentes ou áreas contaminadas (Lee e Wang, 2001; Suzuki et al., 2005; Farooq et al., 2010; Jiang et al., 2013). Henriques et al. (2015) observaram alta capacidade de remoção de mercúrio por *U. lactuca*, removendo do meio 98% do metal adicionado em 72 horas. Huan et al. (2018) obtiveram resultados parecidos com *U. prolifera* e o metal cádmio. Estudos utilizando a biomassa morta também têm demonstrado eficiência na remoção de metais, indicando novas possibilidades de uso para *Ulva* (Suzuki et al., 2005; Areco et al., 2012).

Por outro lado, quando o metal é internalizado, se liga a diversas organelas causando danos estruturais e fisiológicos (Baumann et al., 2009). Seus efeitos são dependentes do tipo de metal, da concentração, do tempo de exposição e da espécie exposta que pode apresentar diversos mecanismos de quelação e detoxificação deste metal (Hall, 2002; Henriques et al., 2015). Os danos biológicos mais comuns são alterações nos pigmentos fotossintéticos (Celis-Plá et al., 2018), redução na capacidade fotossintética (Baumann et al., 2009), estresse oxidativo (Collén et al., 2003) e alterações ultraestruturais (Bouzon et al., 2012).

1.4.1 O Metal Cádmio

O cádmio (Cd) é um elemento químico de transição utilizado na manufatura de baterias, placas eletrônicas, pigmentos e ligas metálicas (Hu et al., 1996). Embora seja encontrado na natureza, não faz parte de moléculas orgânicas e não tem função biológica conhecida, exceto como

cofator de enzimas na diatomácea *Thalassiosira weissflogii* sob condições de baixa concentração de zinco (Lane e Morel, 2000). Entretanto, quando disponível no ambiente é frequentemente relacionado com redução no crescimento (Markham et al., 1980), redução da fotossíntese (Huan et al., 2018) e estresse oxidativo (Kumar et al., 2010). Em *U. lactuca*, o cádmio influencia na captação de minerais, especialmente Na e K, alterando o equilíbrio osmótico celular (Kumar et al., 2010). Também foi relatado redução na clorofila *a* para a mesma espécie, indicando que o metal poderia desestabilizar a molécula substituindo o Mg no centro de reação (Bertrand e Poirier, 2005; Saleh, 2015). Webster e Gadd (1992) observaram que, em concentrações altas (15mM), cádmio inibe a respiração em *U. lactuca*. Alterações na ultraestrutura também já foram registradas em macroalgas (Bouzon et al., 2012; Costa et al., 2016) e observa-se grande afinidade por grupos sulfatados. Webster et al. (1997) encontraram dois sítios de ligação de Cd ao metabolismo independente da *U. lactuca*. O primeiro está localizado na parede celular e está disponível em baixas concentrações. O segundo está no material intracelular e está disponível apenas para altas concentrações. O local da parede celular estaria relacionado a grupos funcionais com oxigênio, como o complexo borato ramnose, encontrado no polissacarídeo sulfatado ulvana, principal polissacarídeo do gênero *Ulva* (representando 8% a 29% da biomassa seca) (Webster et al., 1997; Lahaye e Robic, 2007) No complexo borato ramnose, o Cd substitui o Ca e desestabiliza o complexo, afetando a rigidez do talo (Webster e Gadd, 1996).

1.5 Objetivos

Desta forma, a presente tese teve como objetivos:

- Avaliar a interação de fatores ambientais (temperatura e salinidade) sobre a capacidade de captação de Cd em *U. ohnoi* utilizando descritores fisiológicos para entender a relação entre os fatores utilizados.
- Avaliar os efeitos interativos da salinidade e fósforo na indução da reprodução, na liberação de células reprodutivas, bem como na germinação e crescimento das plântulas de *U. ohnoi*.
- Selecionar linhagens gametofíticas e esporofíticas que apresentem tolerância a salinidades reduzidas e apresentem alta eficiência de absorção de fósforo.

CAPÍTULO 2

Potencial fitorremediador de *Ulva ohnoi* (Chlorophyta, Ulvales): influência da temperatura e salinidade na eficiência de remoção e toxicidade do cádmio

(Este capítulo foi publicado no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety* com o título: *Phytoremediation potential of Ulva ohnoi* (Chlorophyta): influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium)

RESUMO

Ulva ohnoi é uma macroalga verde com rápido crescimento e altas taxas de absorção de nitrogênio e fósforo, formadora de marés verdes. O presente estudo avaliou o potencial de fitorremediação utilizando concentrações ambientalmente realísticas de Cd (0,625 - 15 $\mu\text{g L}^{-1}$). Da mesma forma, os efeitos dos parâmetros físico-químicos (salinidade e temperatura) na toxicidade e eficiência de remoção foram avaliados. A análise molecular de duas sequências (1141 pb) obtidas, corrobora com outras 34 sequências para *U. ohnoi* obtidas no GenBank. A adição de Cd no meio afetou os parâmetros fotossintéticos e reduziu a taxa de crescimento. Entretanto, *U. ohnoi* apresentou resistência ao Cd quando cultivado a 18 °C, S15 e 18 - 25 °C, S35 em concentrações entre 0,625 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, mantendo taxa de crescimento positiva. Acúmulo dependente de dose foi observado em todas as combinações de fatores usados com um valor máximo de 4,20 $\mu\text{g Cd}$ por grama de alga seca na condição de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd a 18 °C e S35. O valor máximo do fator de concentração foi de $81,3 \pm 1,1\%$ do Cd adicionado na concentração de 0,625 $\mu\text{g L}^{-1}$ a S15 e 18 °C. Nossos resultados demonstram o alto potencial da espécie *U. ohnoi* na fitorremediação de Cd em água marinha ou salobra.

Palavras-chave: Cádmiu; *Ulva ohnoi*; fitorremediação; eficiência de absorção; delineamento multifatorial

ABSTRACT

Ulva ohnoi is a green macroalgae with fast growth and high rates of nitrogen and phosphorus absorption. Recently, this species has been recorded in several places with record of green tide formation in some of them. We demonstrate here the potential for phytoremediation in environmentally realistic concentrations of Cd ($0.625 - 15 \mu\text{g L}^{-1}$). Likewise, the effects of physicochemical parameters (salinity and temperature) on the toxicity and uptake efficiency were evaluated. Molecular analysis of two sequences (1141 bp) obtained corroborates other 34 sequences for *U. ohnoi* obtained from GenBank. The addition of Cd in the medium affected the photosynthetic parameters and reduced the growth rate. *U. ohnoi* showed resistance to Cd when cultivated at 18°C , S15 and $18 - 25^\circ\text{C}$, S35 at concentrations between 0.625 and $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cd maintaining positive growth rate. Dose-dependent accumulation was observed in all combinations of factors used with a maximum value of $4.20 \mu\text{g Cd per gram of dry seaweed}$ in the condition of $15 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cd at 18°C and S35. Maximum value of the concentration factor was $81.3 \pm 1.1 \%$ of the Cd added at the concentration of $0.625 \mu\text{g L}^{-1}$ to S15 and 18°C . Our results demonstrate the potential of the *U. ohnoi* species in the phytoremediation of Cd in salt water or brackish water.

Keywords: Cadmium; *Ulva ohnoi*; phytoremediation; uptake efficiency; Multifactorial design

2.1 Introdução

Nas últimas décadas, tem se observado um incremento na demanda por matérias-primas vinculado ao aumento da população humana e dos produtos e processos industriais (Volesky, 2001). Como consequência, muitos compostos xenobióticos têm sido mobilizados e liberados em altas concentrações no meio ambiente, causando alterações nos processos físicos, químicos e biológicos (Martins et al., 2012; Scherner et al., 2013, 2018). Entre estes compostos, os íons de metais traços livres causam muitos efeitos ambientais negativos e são bioacumulados no ecossistema (Barwick e Maher, 2003; Caruso et al., 2011), sendo o cobre (Cu), cádmio (Cd), zinco (Zn) e níquel (Ni) os poluentes metálicos mais frequentes (Duruibe et al., 2007). Entre eles, o Cd é o único metal que não tem função biológica relatada, exceto como cofator para a anidrase carbônica na diatomácea *Thalassiosira weissflogii* sob condições de baixa concentração de zinco (Lane e Morel, 2000). Sua disponibilidade no ambiente ocorre frequentemente em pequenas concentrações por intemperismo ou em maiores concentrações relacionadas à mineração e processamento mineral, aplicação de pesticidas e fabricação de baterias (Babich e Stotzky, 1978). Em ambientes aquáticos, o Cd é livremente transportado e absorvido pelos organismos devido à alta solubilidade e similaridade aos metais essenciais (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+}) (Peters et al., 1997). Em organismos marinhos fotossintetizantes, especialmente macroalgas, os efeitos do Cd têm sido extensivamente estudados, particularmente, aqueles relacionados à fisiologia e à ultraestrutura (Collén et al., 2003; Costa et al., 2016; Markham et al., 1980; Webster e Gadd, 1992, 1996; Wu et al., 2009). A maioria destes estudos foram concentrados na avaliação dos efeitos isolados de um metal, negligenciando interações com fatores ambientais chave que podem alterar a toxicidade e a capacidade de bioacumulação (Scherner et al., 2018).

As variações dos fatores ambientais, como, temperatura e salinidade, interferem em vários aspectos dos processos biológicos relacionados com a absorção e/ou incorporação de metais (Lobban e Harrison, 1994; Scherner et al., 2018). A temperatura influencia as taxas de absorção em consequência das mudanças nas demandas metabólicas e nas propriedades das membranas, tais como permeabilidade, fluidez e estado de fase da membrana (Eggert, 2012). As variações na salinidade influenciam nas concentrações iônicas, absorção de nutrientes, regulação osmótica e processos fisiológicos, resultando em mudanças bioquímicas

e estruturais (Karsten, 2012). No ambiente, variações na salinidade podem causar mudanças no pH e aumentar a biodisponibilidade de metais (Munda, 1984). Estudos que avaliam as respostas das algas com interesse industrial expostas aos fatores ambientais isolados são comuns e contribuem para melhorar os processos de produção (Dawes et al., 1999; Floreto et al., 1993; Macler, 1988; Mantri et al., 2011; Yokoya e Oliveira, 1992). No entanto, uma abordagem que investigue as interações dos fatores ambientais junto com os contaminantes, como metais traço, ainda é escassa (Lee e Wang, 2001; Scherner et al., 2018). Os delineamentos experimentais multifatoriais podem melhorar os cenários realistas relativos às aplicações das ferramentas de biorremediação em gradientes ambientais amplos relacionados ao tempo (sazonalidade) ou ao espaço (latitude) (Scherner et al., 2018).

As macroalgas estão entre as opções mais práticas e econômicas para remover poluentes de áreas contaminadas. Vários estudos utilizando biomassa foram realizados mostrando potenciais efeitos benéficos (Kang e Sui, 2010; Lee e Wang, 2001; Sode et al., 2013; Wu et al., 2018). No entanto, pouco se sabe sobre como os fatores ambientais afetam a remoção dos contaminantes pelas macroalgas (Choi et al., 2010; Fan et al., 2014), especialmente no caso de metais traço. A redução da salinidade foi relacionada com aumento acima de 70% na absorção de Cd (Felix et al., 2014). Lee e Wang, (2001) obtiveram um aumento de 137% no conteúdo de Cd em *Ulva fasciata* quando a concentração de nitrato no meio foi aumentada. Dentre as espécies estudadas, destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Ulva* devido a sua alta taxa de absorção e rápido crescimento que, juntamente com sua tolerância a uma ampla gama de condições ambientais, tornam estas espécies candidatas à biorremediação (Angell et al., 2015).

O gênero *Ulva* (Chlorophyta) é cosmopolita e comum em todos os oceanos e estuários (Guiry e Guiry, 2019). Algumas espécies deste gênero possuem alta capacidade de absorção de nitrogênio (N) e fósforo (P) e são responsáveis pela formação de marés verdes (Melton et al., 2016a). Estudos demonstraram que as marés verdes são desencadeadas por fatores físico-químicos (temperatura, luz, salinidade e concentração de N e P) e podem ter efeitos negativos nos ecossistemas se negligenciados (Smetacek e Zingone, 2013; Li et al., 2016), contudo, podem promover benefícios, bens e serviços ambientais, se gerenciados (Wu et al., 2018). Esta capacidade de crescimento rápido estimulou o uso de espécies de *Ulva* no tratamento de águas residuais (Al-Hafedh et al., 2015; Copertino et al., 2009; Tsagakamilis et al., 2010). Além disso, as paredes celulares das espécies de *Ulva* contêm polissacarídeos com grupos carboxila e

sulfato carregados negativamente, o que confere a essas estruturas um potencial sítio de ligação para diferentes metais traços, como o Cd (Jaulneau et al., 2010). Os metais podem ainda ser internalizados e encontrados em todas as organelas celulares (Webster e Gadd, 1996).

Atualmente, existe a necessidade de desenvolver tecnologias para reduzir os níveis de Cd a limites aceitáveis de maneira econômica e ambientalmente corretas. A prospecção de espécies e a manipulação das condições ambientais são fundamentais para o desenvolvimento de processos de fitorremediação ajustáveis a diferentes localidades. Durante um levantamento no arquipélago de Fernando de Noronha, os espécimes de *Ulva* foram coletados e identificados molecularmente como *Ulva ohnoi* M. Hiraoka e S. Shimada. Diversos estudos foram realizados com esta espécie formadora de maré verde demonstrando seu potencial de uso na biorremediação de efluentes da aquicultura (Lawton et al., 2013; Masaló et al., 2016), embora seu potencial para captação de metais traços, como o cádmio, não seja conhecido. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de fatores ambientais (temperatura e salinidade) sobre a capacidade de captação de Cd em *U. ohnoi* utilizando descritores fisiológicos para entender a relação entre os fatores utilizados.

2.2 Material e Métodos

2.2.1. Material Algal e Condições de Cultura

As amostras de algas foram coletadas no Buraco da Raquel (03°50'4.95"S - 32° 23'52.06"W) no arquipélago de Fernando de Noronha, 360 km da costa nordeste do Brasil. O arquipélago tem um nível de urbanização muito baixo e não tem atividade industrial. O clima é tropical, com uma temperatura média da superfície da água do mar de 28°C ao longo do ano (Sampaio et al., 2013).

Indivíduos de *U. ohnoi* (5 g) foram coletadas dos costões rochosos em março de 2015 e transportadas, em tubos Falcon no escuro em temperatura ambiente, até o LAFIC-UFSC (Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). As algas foram limpas para remover areia e epífitas utilizando pincéis e água do mar esterilizada. Partes do talo das algas foram separados para identificação molecular. A água do mar foi esterilizada por filtração mecânica (5 e 10 μm) e exposta, em fluxo contínuo, à irradiação ultravioleta *c*. As culturas unialgais foram mantidas com água do mar esterilizada enriquecida em solução de von Stoch (8 mL L⁻¹) a 25 \pm 1°C, salinidade 35, aeração constante, 120 \pm 10 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (4

lâmpadas fluorescentes, Osram 30W DayLight) e 12:12 luz:escuro. O meio de cultura foi renovado a cada 7 dias e as algas foram pesadas para manter uma densidade de 5g (peso húmido) por litro. A irradiância foi medida com o sensor LI-COR LI-1400 DataLogger e sensor UnderWater UWQ8815.

2.2.2. Identificação

Para identificação molecular, foram utilizados cerca de 10 mg de tecido para extrair DNA de dois indivíduos coletados. As amostras foram colocadas num tubo Eppendorf de 1,5 ml, congeladas com nitrogênio líquido e moídas durante 2 minutos. O conteúdo de DNA foi extraído usando um kit comercial [NucleoSpin® Plant II, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha] seguindo as instruções do fabricante. A grande subunidade da região gênica da Ribulose Bisfosfato Carboxilase-Oxigenase (RuBisCO) codificada em plastídios (*rbcL*) foi amplificada em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers publicados RH1 e 1385r (Manhart, 1994) e as condições ciclísticas descritas em Loughnane et al. (2008). Após amplificação, a purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando PEG 8000 (Polyethyleneglycol 8000) (Lis e Schleif, 1975).

O sequenciamento dos produtos de PCR foi feito pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977), com um kit Big Dye Terminator v 3.1 (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA) seguindo o protocolo especificado pelo fornecedor. A reação sequencial do ciclo resultante foi purificada com precipitação ETOH/EDTA e sequenciada em analisadores de DNA (3500 XL ou ABI 3730 Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Fisiologia do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina. Os cromatogramas resultantes foram montados utilizando o software Sequencing Analysis v6.0 (Thermo Fischer Scientific).

Duas sequências *rbcL* foram geradas com 1141 pb. Sequências de consenso foram montadas a partir de leituras diretas e inversas. A análise e edição de qualidade das sequências consensuais foram realizadas no Geneious R9 (<http://www.geneious.com>, (Kearse et al., 2012)). As sequências de concordância do DNA foram alinhadas usando o método Muscle no software MEGA 7.0.26 (Tamura et al., 2011). Outras (44) sequências de *rbcL* do gênero *Ulva* foram baixadas do Genbank e uma sequência de *Umbraulva olivascens* foi adicionada ao alinhamento como grupo externo.

Análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos de máxima verossimilhança (MV) com um modelo GTR + modelo G. As análises MV foram executadas pelo programa RxML-HPC2 usando o servidor online 'The CIPRES Science Gateway V.3.3' (Miller et al., 2010) com 1000 réplicas.

2.2.3. Delineamento Experimental e Procedimentos

Um planejamento tri-fatorial foi utilizado para avaliar os efeitos combinados da temperatura, salinidade e Cd na fisiologia e absorção do metal em *U. ohnoi*. Após cinco meses de cultivo em laboratório, foram selecionados fragmentos de *U. ohnoi* ($0,50 \pm 0,02$ g FW por frasco) e incubados em três temperaturas (18 ± 1 , 25 ± 1 e 28 ± 1 °C), duas salinidades (S15 e S35) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e $15 \mu\text{g L}^{-1}$), totalizando 30 tratamentos. Para cada combinação, foram utilizadas três repetições. As temperaturas utilizadas representam valores encontrados ao longo da costa brasileira e as salinidades representam valores comuns da água do mar e estuários (NOAA, 2015; Pagliosa et al., 2006). As temperaturas utilizadas foram obtidas utilizando uma mesa de gradiente descrita por Oliveira et al. (1995) e os níveis de salinidade foram obtidos pela diluição da água do mar com água destilada (Oliveira et al., 1995). As concentrações de Cd utilizadas representam um gradiente de valores encontrados ao longo da costa brasileira e valores permitidos pela legislação brasileira para águas marinhas e salobras (CONAMA, 2005; Ferreira et al., 2004). Estas concentrações foram alcançadas pela dissolução de CdCl_2 (CAS 10108-64-2) na água do mar. Os tratamentos foram mantidos por 8 dias sob as mesmas condições de cultivo, exceto temperatura, salinidade (usada de acordo com o tratamento) e solução de von Stoch (preparada sem EDTA). O pH da água foi monitorado e manteve-se constante em $8,7 \pm 0,6$.

2.2.4. Grau de Branqueamento e Taxas de Crescimento

O grau de branqueamento das algas foi determinado fotografando os talos no final do experimento usando uma câmera (Canon G12) com as mesmas configurações (ISO - 100, abertura do diafragma - $f / 8$, velocidade de captura - $1 / 80$ segundos) e iluminação (luz de fundo - VitraLux E27). As imagens geradas foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.8.0 para calcular a porcentagem (%) de área branqueada em relação à área total do talo de *U. ohnoi*. A biomassa fresca foi registrada no início e no final do experimento utilizando uma balança

analítica (BioPrecisa FA-2104N). A taxa de crescimento foi calculada como $TC (\% \text{ dia}^{-1}) = [(B_t/B_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde B_i = biomassa inicial fresca, B_t = biomassa fresca após 8 dias e t = tempo experimental em dias.

2.2.5. Parâmetros Fotossintéticos

Os parâmetros fotossintéticos foram obtidos por análise da fluorescência da clorofila *a in vivo* utilizando um fluorômetro de pulso modulado (WaterPAM, Walz, Efeltrich, Alemanha). Algas aclimatadas à luz ($120 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram submetidas a três (pseudoreplicas) pulsos de saturação por frasco (aproximadamente 10000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 0,8 s), tomadas em diferentes partes do talo. O rendimento qu\u00e2ntico efetivo ($\Delta F/F_m'$) foi calculado usando $\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t)/F_m'$, onde F_t \u00e9 a fluoresc\u00eancia em estado estacion\u00e1rio em amostra adaptada \u00e0 luz e F_m' \u00e9 a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima da mesma amostra ap\u00f3s um pulso de luz branca saturante. Os dados de $\Delta F/F_m'$ obtidos foram usados para calcular a Taxa de Transporte de El\u00e9trons Absoluta (ETR_{abs}) aplicando a f\u00f3rmula: $\text{ETR}_{\text{abs}} = \Delta F/F_m' \times E \times A \times 0.5$, onde E \u00e9 a irradi\u00e2ncia act\u00ednica, A \u00e9 a absorv\u00eancia e 0,5 \u00e9 a fra\u00e7\u00e3o de clorofila associada ao fotossistema II em macroalgas verdes (Grzymiski et al., 1997). A absorv\u00eancia foi obtida conforme descrito por Korbee et al. (2005). As amostras foram aclimatizadas no escuro por 30 minutos para obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia basal (F_0), e, ap\u00f3s, foram expostas a nove crescentes irradi\u00e2ncias act\u00ednicas (0, 170, 250, 330, 450, 570, 680, 825 e 1200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por 10 segundos. Um pulso de luz branca saturante foi aplicado entre cada irradi\u00e2ncia de exposi\u00e7\u00e3o. Depois do primeiro pulso, o valor m\u00e1ximo de fluoresc\u00eancia (F_m) foi obtido e o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo (F_v/F_m) foi calculado usando a equa\u00e7\u00e3o $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Os dados obtidos ap\u00f3s o segundo pulso foram utilizados para o c\u00e1lculo de $\Delta F/F_m'$ e, em seguida, os ETR_{abs} para cada irradi\u00e2ncia act\u00ednica, permitindo a constru\u00e7\u00e3o das curvas ETR_{abs} x irradi\u00e2ncia PAR_{abs} . Tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es foram amostradas para an\u00e1lise dos par\u00e2metros fotossint\u00e9ticos.

2.2.6. Remo\u00e7\u00e3o do C\u00e1dmio

A concentra\u00e7\u00e3o de Cd foi determinada conforme descrito por Schneider et al. (2017). Foram utilizadas 40 mg de algas secas (48h em 60\u00b0C) em um bal\u00e3o de polipropileno, onde foram adicionados 300 μL de HNO_3 , 300 μL de H_2O_2 e enchidos at\u00e9 2 mL com \u00e1gua deionizada. As amostras foram, ent\u00e3o, submetidas a um banho termost\u00e1tico a 80\u00b0C por

15 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas por 6 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi usado para posterior análise em um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução modelo CONTRAA 600 (Analytik Jena, Jena, Alemanha). O programa de temperatura para um tubo de grafite revestido com Ir empregou temperaturas de pirólise e atomização de 600°C e 1300°C, respectivamente. A calibração instrumental foi realizada com solução aquosa na faixa de 0,5 µg L⁻¹ - 10 µg L⁻¹, com limites de detecção e quantificação de 7,5 ng g⁻¹ e 25 ng g⁻¹, respectivamente. Os dados obtidos foram expressos como absorção de Cd e utilizados para calcular o fator de concentração (CF) = $[\text{Cd}]_{\text{biomassa}} / [\text{Cd}]_{\text{água}} \times 100$, onde $[\text{Cd}]_{\text{biomassa}}$ é a concentração de Cd encontrada na biomassa de *U. ohnoi* e $[\text{Cd}]_{\text{água}}$ é a concentração de Cd na água usada nos tratamentos.

2.2.7. Análises Estatísticas

Os efeitos da temperatura, salinidade e concentração de Cd em *U. ohnoi* foram analisados por ANOVA fatorial. Análises de normalidade e homogeneidade das variâncias foram realizadas para verificar se as premissas foram atendidas. Quando foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de comparação múltipla post hoc de Newman-Keuls (SNK) foi aplicado. A análise de correlação de Pearson foi realizada, com significância considerada de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. 2011).

2.3 Resultados

2.3.1. Manutenção no Laboratório - Pré-experimento

Durante o cultivo pré-experimental, *U. ohnoi* cresceu de forma constante com TC médio de $12 \pm 3\%$ dia⁻¹ e não apresentou crescimento epifítico. Eventos reprodutivos foram observados com liberação de células reprodutivas biflageladas. Nenhuma formação de novos indivíduos foi observada, indicando que, os indivíduos utilizados neste experimento eram gametófitos femininos ou masculinos.

2.3.2. Identificação

U. ohnoi foi encontrada em uma ilha oceânica em zona tropical (média anual da temperatura da água do mar de 28°C), com características oligotróficas (Sampaio et al., 2013), fixada em substrato rochoso com poucos e dispersos indivíduos de comprimento máximo de 4 cm. O alinhamento de duas sequências de DNA *rbcL* (1141 pb) obtidas das amostras, mostrou um clado monofilético em uma árvore filogenética com as sequências encontradas no GenBank para *U. ohnoi* (Figura 2). As sequências obtidas foram idênticas às publicadas para as ilhas havaianas (O’Kelly et al., 2010), Índia (Kazi et al., 2016), EUA (Melton et al., 2016b) e Japão, incluindo a sequência do tipo espécime (Hiraoka et al., 2004b) (Figura 2).

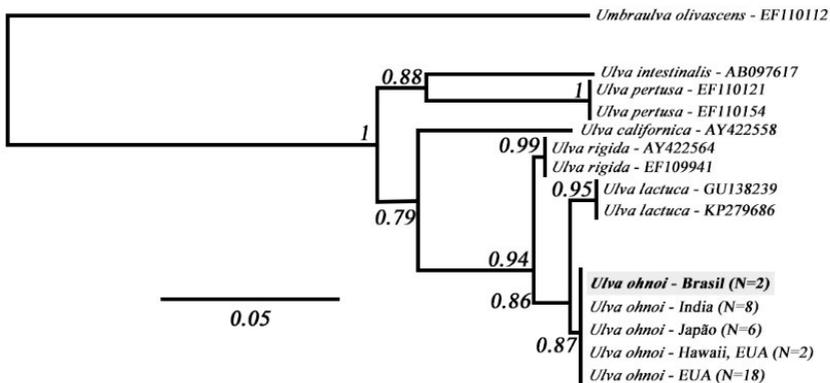


Figura 2 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança com 1000 bootstraps baseada em 1141 pb do marcador molecular *rbcL*. Outras amostras com sequências *rbcL* idênticas às sequências de *Ulva ohnoi* do Brasil (U7FNPE; U8FNPE) incluem os seguintes números do GenBank: Índia (KP279696; KP279697; KP279698; KP279699; KP279700; KP279702; KP279703; KP279704 – Kazi et al., 2016) ; Japão (AB116035; AB116036; AB116037; AB116038; AB116039; AB116040 - Hiraoka et al., 2004b); Hawaii, EUA (GU138241; GU138250 - O’Kelly et al., 2010) e EUA (KU561279; KU561280; KU561282; KU561283; KU561285; KU561286; KU561287; KU561288; KU561289; KU561290; KU561291; KU561292; KU561293; KU561294; KU561295; KU561296; KU561297; KU561299 - Melton et al., 2016a).

2.3.3. Grau de Branqueamento e Taxas de Crescimento

Os efeitos dos tratamentos (salinidade, temperatura e concentração de Cd) no grau de branqueamento de *U. ohnoi* são mostrados na Figura 3 e 4. ANOVA fatorial indica diferenças significativas no grau de branqueamento para temperatura, salinidade e tratamentos com Cd, assim como, interações significativas entre os tratamentos (Tab. 1). Sem adição de Cd, as amostras em S15 apresentaram maior grau de branqueamento do que as amostras em S35 ($12,41 \pm 2,37\%$ e $1,46 \pm 0,95\%$, respectivamente). Na S15, o branqueamento foi maior em 25 °C ($20,73 \pm 1,01\%$), seguido por 28°C ($13,73 \pm 4,40\%$) e 18°C ($2,76 \pm 1,69\%$). Para S35, o branqueamento não mostrou diferenças significativas entre as temperaturas no teste post hoc SNK (Figura 4).

A adição de Cd aumentou o branqueamento para todas as temperaturas em S15 (Figura 3 e 4). O efeito foi mais expressivo (acima de 50% na primeira concentração de Cd utilizada) a 25 e 28°C e gradual a 18°C (acima de 50% com aplicação $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ou superior). Para S35, o efeito do Cd no branqueamento foi observado apenas a 25°C e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ($9,50 \pm 0,52\%$) e a 28°C e 5 e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ($9,69 \pm 2,91\%$ e $45,39 \pm 5,80\%$, respectivamente) (Figura 3 e 4).

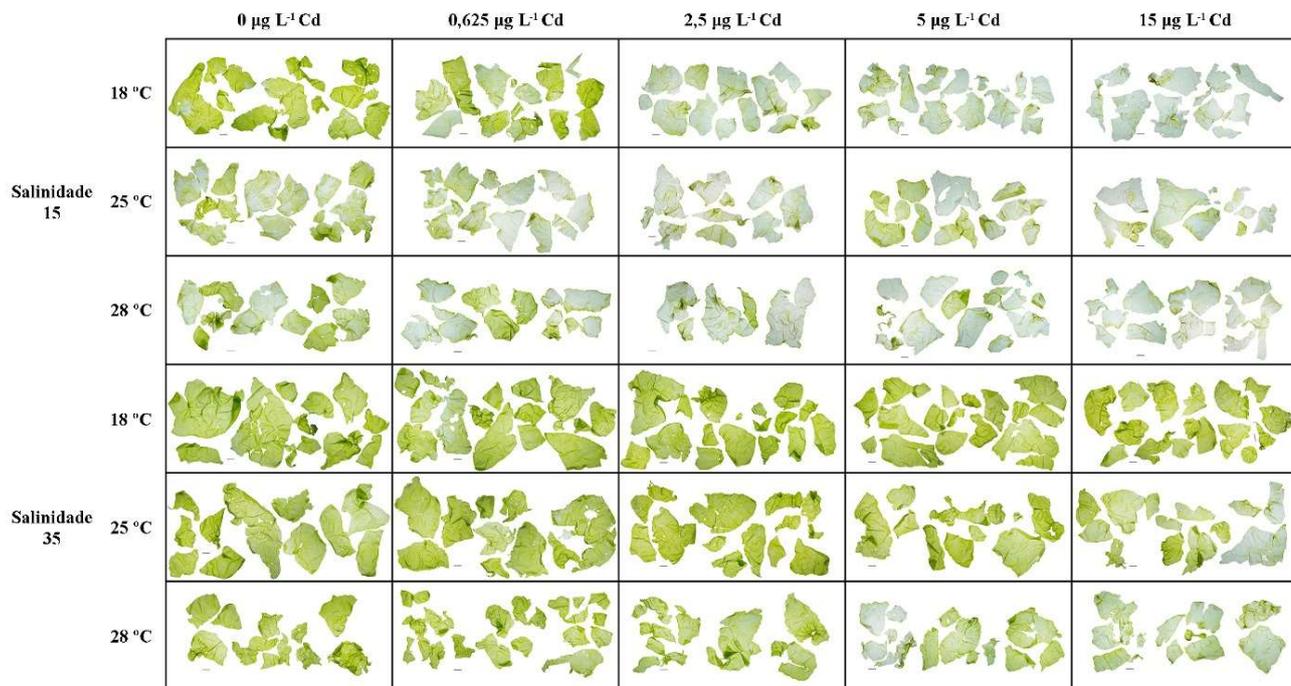


Figura 3 - Aspecto do talo de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) após 8 dias.

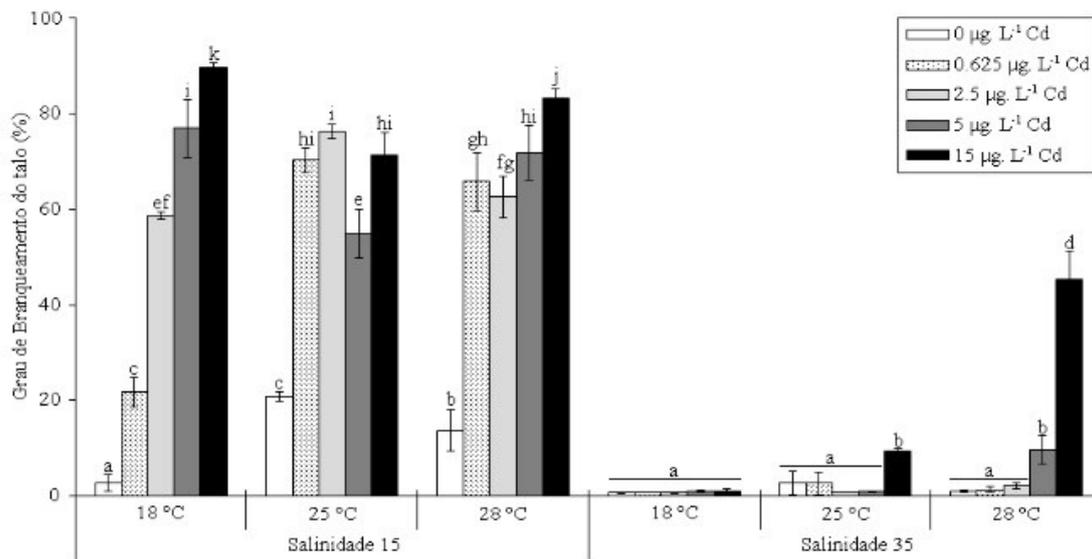


Figura 4 - Grau de branqueamento do talo de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28 °C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05).

As TCs de *U. ohnoi* foram significativamente influenciadas pelos tratamentos de temperatura, Cd e salinidade, assim como interações significativas entre os tratamentos também foram encontradas (Tab. 1). Os maiores valores de TC foram encontrados a 18°C em S35 e S15 ($5,57 \pm 0,45$ e $3,18 \pm 0,52\%$ dia⁻¹, respectivamente), seguidos por 25°C em S35 e S15 ($4,99 \pm 0,73$ e $2,27 \pm 0,54\%$ dia⁻¹, respectivamente). As reduções nas taxas de crescimento foram mais pronunciadas nos tratamentos com adição de Cd, onde valores negativos (perda de biomassa) foram observados em todas as temperaturas (Figura 5). Para 18°C em S15 e 18 e 25°C com S35, as TCs foram negativas somente quando a concentração de Cd foi igual ou maior que 5 µg L⁻¹ (Figura 5).

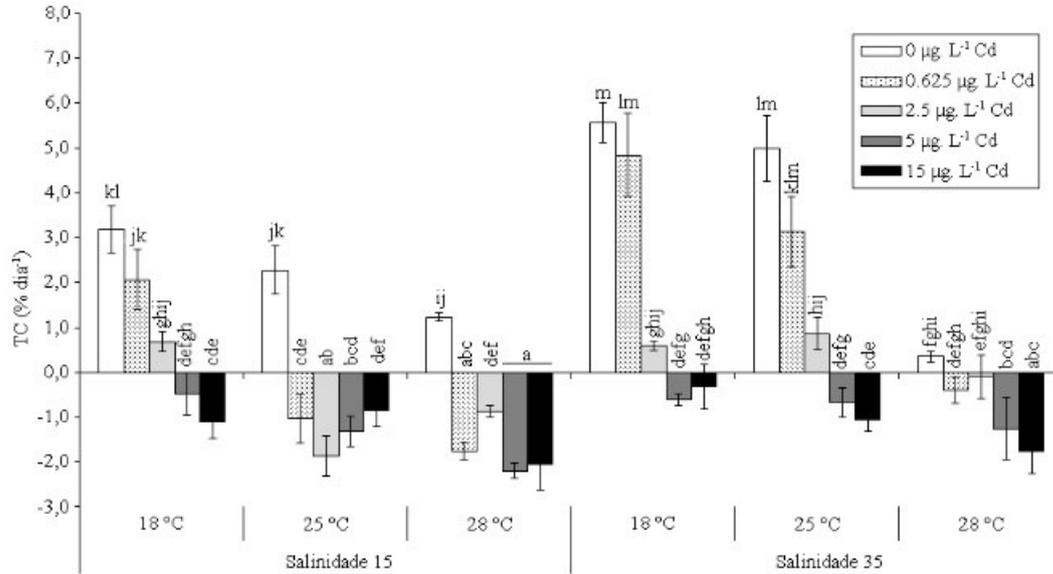


Figura 5 - Taxa de crescimento (TC) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) depois de 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05).

2.3.4. Parâmetros Fotossintéticos

U. ohnoi cultivada sob diferentes salinidades, temperaturas e concentrações de Cd apresentou parâmetros fotossintéticos significativamente diferentes e interações significativas entre fatores (Tab. 1).

Para a Taxa de Transporte de Elétrons Absoluta (ETR_{abs}), SNK demonstrou que o Cd afetou significativamente os tratamentos de 18°C, S15 e 25°C, S35, quando em concentrações iguais ou superiores a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e tratamentos 18 e 28°C, S35, quando a concentração de Cd foi igual ou superior a $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Os demais tratamentos foram afetados nas menores concentrações de Cd ($0,625 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 6).

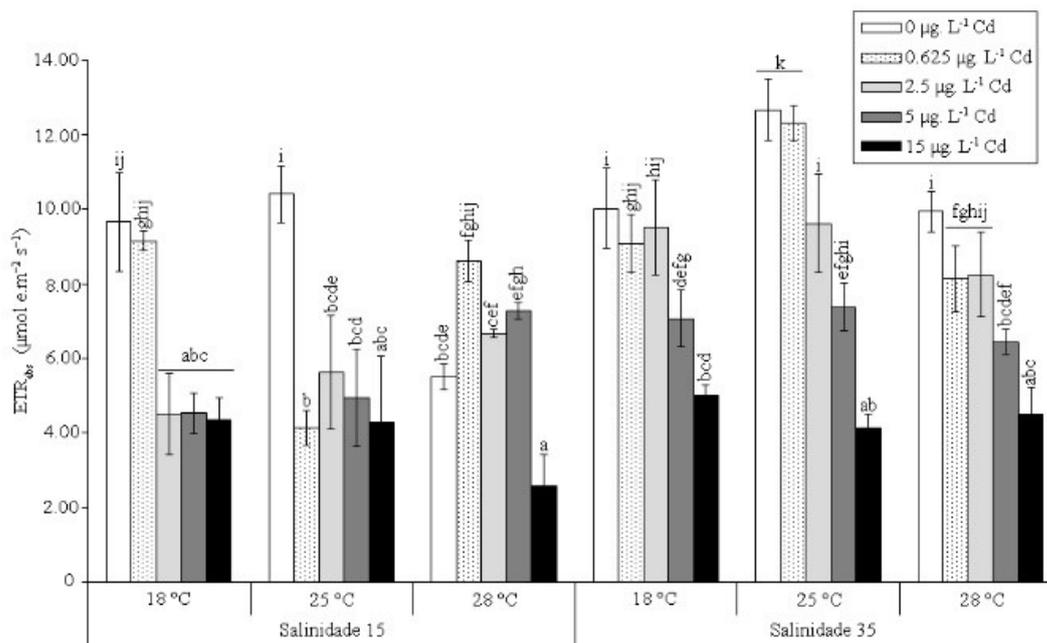


Figura 6 - Taxa de transporte de elétrons absoluta (ETR_{abs}), de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28 °C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 8 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$).

Os valores de Rendimento Quântico Máximo (F_v / F_m) diminuíram quando as concentrações de Cd foram aumentadas (Figura 7). Na S15, os efeitos foram observados quando a concentração de Cd foi igual ou superior a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em 18 e 25°C e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em 28°C . No entanto, para o S35 os efeitos foram observados apenas em concentrações mais elevadas ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em 25°C , $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em 18°C e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ em 28°C) (Figura7).

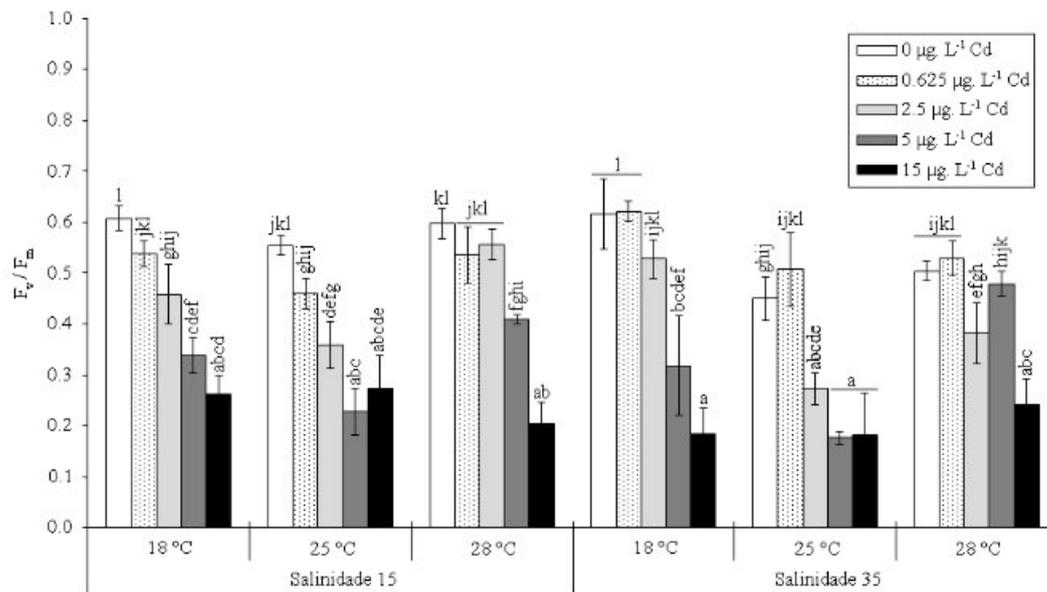


Figura 7 - Rendimento Quântico Máximo (F_v / F_m), de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 8 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$).

As curvas ETR_{abs} x irradiância PAR_{abs} mantiveram formas semelhantes em todos os tratamentos, mas mostraram magnitudes diferentes entre as curvas iniciais e após 4 e 8 dias (Figura 8). Todos os tratamentos mostraram diminuição na absorção da radiação fotossinteticamente ativa (PAR), especialmente em concentrações mais altas de Cd (Figura 8). A amplitude das curvas (valores de ETR_{abs}) diminuiu gradualmente com o aumento das concentrações de Cd e ao longo do tempo em relação à curva inicial. A 18 °C (ambas as salinidades) houve uma menor diferença de amplitude entre a concentração de 0,625 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd e tempo em relação à curva inicial (Figura 8).

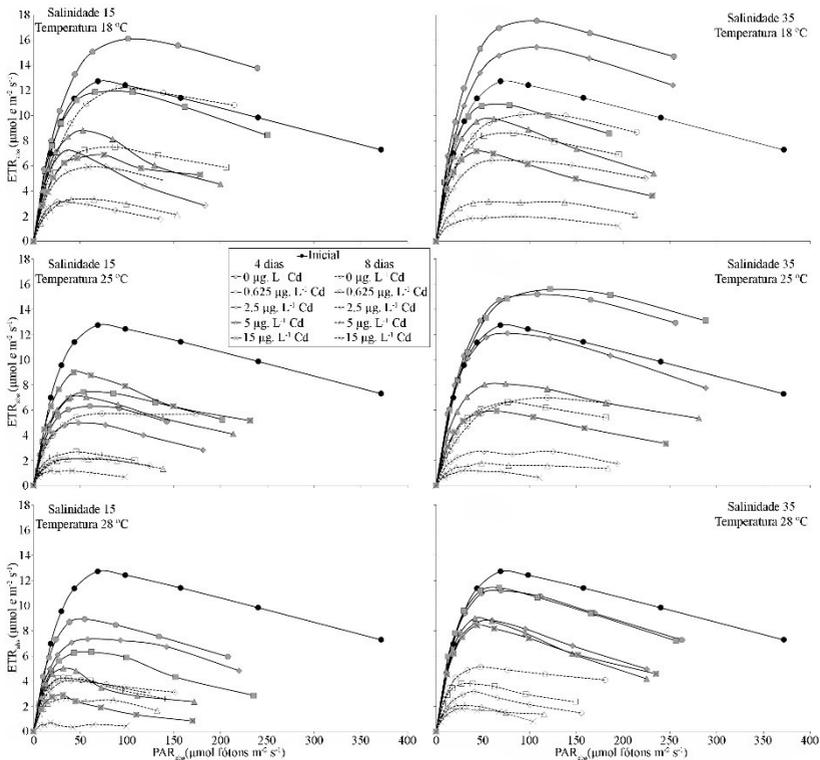


Figura 8 - Taxa de Transporte de Elétron Absoluta (ETR_{abs}), em intensidades de irradiância PAR_{abs} crescentes (curvas ETR_{abs} x irradiância PAR_{abs}) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) após 4 e 8 dias. Pontos representam média para $n = 3$.

2.3.5. Acúmulo de Cádmio

Os teores de Cd encontrados na biomassa de *U. ohnoi* aumentaram com as concentrações utilizadas ($r = 0,648$; $p < 0,0001$, $N = 72$) e foram significativamente afetados pelos tratamentos utilizados (Tab. 1 e Figura 9). O acúmulo de Cd foi maior em S35, com valor máximo de $4,199 \pm 0,835 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd em 18°C com $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd na água. Para S15, o maior acúmulo foi na temperatura de 28°C e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd na água ($2,896 \pm 0,178 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd) (Figura 9).

O fator de concentração (FC) também foi significativamente influenciado pelos tratamentos aplicados (Tab.1). Os valores de FC diminuíram com o aumento da concentração de Cd no meio ($r = -0,685$, $p < 0,0001$ nível, $N = 72$). Além disso, o valor médio de FC foi maior em S15 ($69,6 \pm 12,1\%$), seguido por S35 ($58,1 \pm 19,2\%$). Para temperatura, o valor médio de FC foi maior a 25°C ($68,6 \pm 16,1\%$), seguido por 18°C ($62,6 \pm 26,4\%$) e 28°C ($60,3 \pm 14,1\%$). Os valores de FC foram maiores nas menores concentrações de Cd ($0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd - $63,8 \pm 15,7\%$). Decrescendo quando a concentração de Cd no meio aumentou ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd - $33,0 \pm 7,5\%$; $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd - $23,5 \pm 4,2\%$, $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd - $14,7 \pm 9,5\%$). Em $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, o maior valor de FC foi encontrado na combinação de 18°C e S15 ($81,3 \pm 1,1\%$), seguido por 25°C e S35 ($79,9 \pm 7,4\%$) e 28°C e S15 ($70,3 \pm 1,1\%$). Para $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, o FC apresentou maiores valores a 25°C e S15 ($40,7 \pm 8,3\%$), seguido de 28°C e S35 ($39,7 \pm 4,0\%$) e 18°C e S15 ($35,5 \pm 4,1\%$). Na concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, o FC apresentou maiores valores a 28°C e S15 ($30,6 \pm 7,1\%$), seguidos por 28°C e S35 ($26,3 \pm 4,3\%$) e 18°C e S15 ($22,6 \pm 8,1\%$). Finalmente, na concentração $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, os maiores valores de FC foram a 18°C e S35 ($28,0 \pm 5,6\%$), seguidos por 28°C e S15 ($19,3 \pm 1,2\%$) e 25°C e S35 ($19,2 \pm 1,8\%$) (Figura 10).

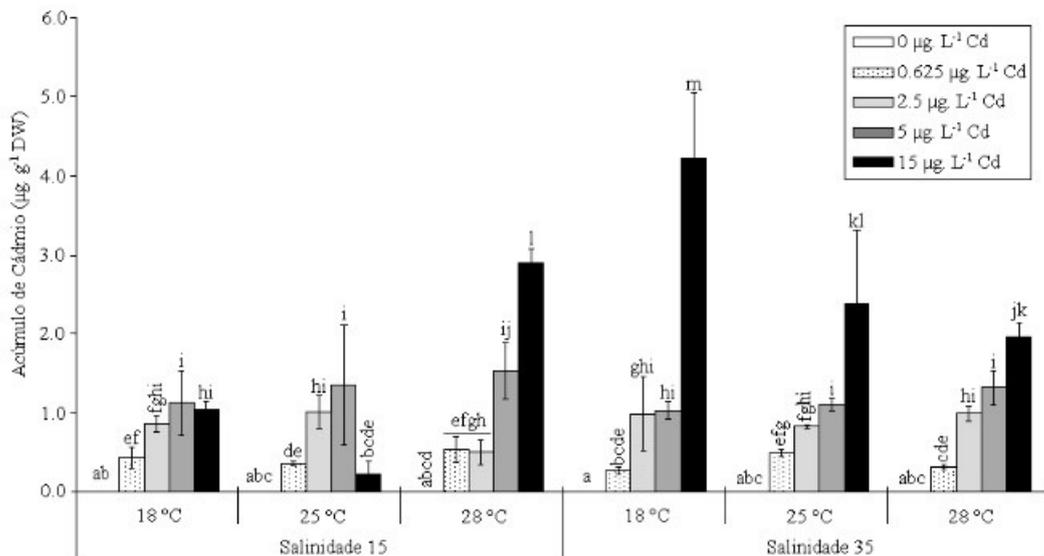


Figura 9 - Acúmulo de cádmio no talo de *Ulva ohnoi* exposto a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28 °C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05).

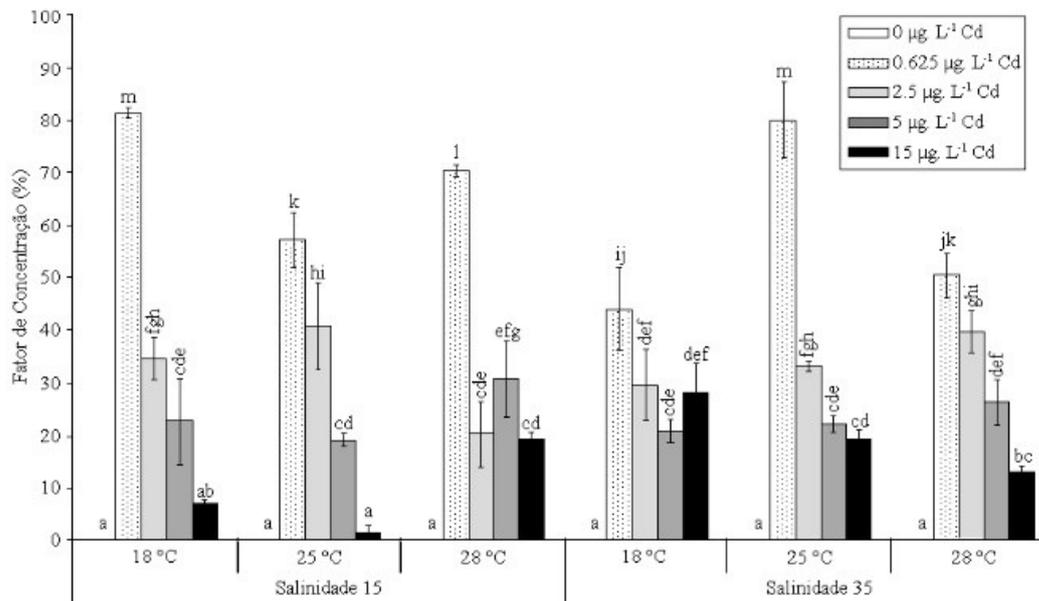


Figura 10 - Fator de Concentração (FC) de Cd no talo de *Ulva ohnoi* exposto a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28 °C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) depois de 8 dias. Barras representam média ± DP para n = 3. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK (p < 0,05).

Tabela 1 - Resumo da análise ANOVA fatorial comparando o grau de branqueamento, taxa de crescimento (TC), taxa de transporte de elétrons absoluta (ETR_{abs}), rendimento quântico máximo (F_v / F_m), absorção de cádmio e fator de concentração (FC) de *Ulva ohnoi* exposta a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Diferenças significativas estão em negrito (p < 0,05).

	Grau de Branqueamento		TC		ETR _{abs}		Fv/Fm		Acúmulo de Cd		FC	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Temperatura	87,6	0,000	127,3	0,000	5,9	0,005	45,3	0,000	6,2	0,004	0,1	0,879
[] Cd	486,1	0,000	143,2	0,000	107,5	0,000	161,0	0,000	216,9	0,000	577,2	0,000
Salinidade	6333,9	0,000	99,5	0,000	132,3	0,000	7,0	0,010	17,0	0,000	0,0	0,893
Temp.*[] Cd	51,0	0,000	8,6	0,000	7,5	0,000	8,8	0,000	9,2	0,000	5,3	0,000
Temp.*Sal.	14,2	0,000	9,6	0,000	11,3	0,000	4,3	0,017	9,0	0,000	16,5	0,000
[] Cd*Sal.	258,7	0,000	9,5	0,000	6,6	0,000	4,4	0,004	21,9	0,000	16,1	0,000
Temp.*[] Cd*Sal.	62,1	0,000	7,0	0,000	14,8	0,000	4,1	0,001	13,4	0,000	25,6	0,000

2.3.6. Análise de Correlação

A análise de correlação indicou que o teor de Cd encontrado na biomassa se correlacionou de forma significativa e positiva com o grau de branqueamento do talo e negativamente com o TC e os parâmetros fotossintéticos (F_v / F_m e ETR_{abs}) (Tab. 2). O grau de clareamento apresentou correlação negativa com TC, ETR_{abs} e F_v / F_m, e os dados de FC não apresentaram correlação significativa com nenhum parâmetro analisado (Tab. 2).

Tabela 2 - Valores de correlação de Pearson obtidos entre variáveis dependentes após exposição de *Ulva ohnoi* a duas salinidades (15 e 35), três temperaturas (18, 25 e 28°C) e cinco concentrações de Cd (0, 0,625, 2,5, 5 e 15 µg L⁻¹) após 8 dias. Tratamentos significativamente correlacionados são atribuídos em negrito (p < 0,05). Variáveis dependentes: Grau de Branqueamento, Taxa de Crescimento (TC), Taxa de Transporte de Elétrons Absoluto (ETR_{abs}), Rendimento Quântico Máximo (F_v / F_m), Acúmulo de Cádmio e Fator de Concentração (FC).

	TC	ETR _{abs}	Fv/Fm	Remoção de Cd	CF
Grau de Branqueamento	-0,571	-0,618	-0,261	0,232	0,037
TC		0,675	0,560	-0,600	-0,087
ETR _{abs}			0,551	-0,572	0,127
Fv/Fm				-0,741	0,134
Remoção de Cd					0,140

2.4 Discussão

Nas últimas décadas, a introdução de espécies marinhas não nativas vem aumentando (Batista et al., 2018; Silva et al., 2010). As mudanças climáticas e as atividades humanas estão entre as principais causas destas questões (Boudouresque e Verlaque, 2010). Por outro lado, o aumento na identificação de espécies não-nativas pode ser resultante do uso de ferramentas moleculares na identificação de táxons e espécies que possuem poucos ou nenhum caráter morfológico distinto (Hayden e Waaland, 2004); por exemplo, as algas marinhas do gênero *Ulva* (Guiry e Guiry, 2019).

Algumas espécies do gênero *Ulva* possuem grande capacidade de dispersão e invasão, aliado a identificação complexa (Hayden e Waaland, 2004). Com base em análises moleculares, detectamos a presença de *U. ohnoi*, uma possível espécie não-nativa que ocorre na costa brasileira, acrescentando esta espécie à flora marinha do Atlântico Sul. Da mesma forma, um número crescente de registros da *U. ohnoi* está sendo relatado. A espécie foi inicialmente descrito por Hiraoka et al., (2004b) a partir de algas encontradas na Baía de Tosa, no Japão, usando análises moleculares (*rbcL* e *ITS1-5.8S-ITS2*), morfológicas e cruzamento entre espécies (Hiraoka et al., 2004a). Após a descrição, *U. ohnoi* foi registrada para diferentes locais do Japão (Kawai et al., 2007; Yabe et al., 2009), Havaí (O'Kelly et al., 2010), Itália (Flagella et al., 2010), Austrália (Kirkendale et al., 2013), EUA (Melton et al., 2016a), Venezuela (Melton et al., 2016b) e Tunísia (Miladi et al., 2018).

U. ohnoi tem despertado grande interesse devido ao seu potencial de absorção de nitrogênio e fósforo de efluentes da aquicultura (Lawton et al., 2013; Masaló et al., 2016) produzindo biomassa com altos níveis de proteínas, lipídios, aminoácidos e polissacarídeos sulfatados (Angell et al., 2015; Mata et al., 2016; Glasson et al., 2017). Essas características tornam a espécie uma potencial ferramenta para a captação de íons metálicos de águas salinas contaminadas.

Neste trabalho, *U. ohnoi* apresentou crescimento em todos os tratamentos de temperatura e salinidade utilizados, com maior crescimento aos 18 - 25°C e S35. Esses dados corroboram parcialmente os valores encontrados por Ohno (1988) (citado como *Ulva* sp.) para o local da espécie-tipo, com maior TC entre 20 e 28°C e menor em 18°C com salinidade média de 18. Notoya (1999) encontrou condição ótimas entre 20 e 25°C e Lawton et al. (2013) encontraram respostas diferentes em sete linhagens registradas para Austrália. Esta espécie ainda apresenta uma ampla gama de crescimento em diferentes salinidades (20 a 60) com

crescimento ótimo entre 25 e 40 (Angell et al., 2015). Essa heterogeneidade de respostas aos fatores temperatura e salinidade por *U. ohnoi* pode ser atribuída às adaptações genotípicas influenciadas pelas condições locais (Eggert, 2012; Karsten, 2012), bem como à plasticidade fenotípica desta espécie, o que corrobora com a diversidade de novos locais e condições ambientais em que a espécie está sendo relatada (Guiry e Guiry, 2019). Estas características (euritérmica e eurihalina) são de grande importância para a fitorremediação, uma vez que as condições dos efluentes ou ambientes impactados são diversas (Lawton et al., 2013).

Embora *U. ohnoi* encontrada no Brasil apresente crescimento em diferentes condições ambientais, as TCs relatadas aqui (ver Figura 5) são baixas comparadas àquelas encontradas para esta espécie em outras localidades (Angell et al., 2015, 2014; Lawton et al., 2013). Observamos um decréscimo de TCs em 28°C (ambas as salinidades), um aumento no branqueamento em S15 e uma redução nas curvas PAR_{abs} e na amplitude das curvas de ETR_{abs} x Irradiância PAR_{abs} ao longo do tempo (0, 4 e 8 dias) em todos os tratamentos. Possivelmente, esse resultado é uma resposta à quantidade de NO₃⁻ (0,5 µM) adicionada ao meio durante o experimento. Sabe-se que a disponibilidade de nitrogênio em ambientes costeiros de regiões temperadas é considerada como o principal fator limitante para o crescimento de macroalgas e, quando em excesso, estimula o crescimento descontrolado de *U. ohnoi* (Howarth et al., 2000; Melton et al., 2016a; Nixon e Pilson, 1983). Quando o nitrogênio se torna limitante, os pigmentos são metabolizados, gerando o branqueamento dos talos (ver Figura 3 e Figura 4). (Floreto et al., 1993; Pinchetti et al., 1998). Embora nossos resultados apresentem baixas TCs para esta espécie, os resultados obtidos não invalidam o uso de *U. ohnoi* para fitorremediação de Cd e demonstram a necessidade de melhores estudos com a cepa brasileira, onde o fornecimento de nitrogênio e fósforo seja avaliado. Angell et al. (2015, 2014) demonstraram o potencial de crescimento desta espécie quando aumentaram as concentrações de nitrogênio na água, obtendo TCs de 15,04% dia⁻¹ a 26,8% dia⁻¹.

Quando o Cd foi adicionado, observamos um efeito dose-dependente com maior toxicidade quando *U. ohnoi* foi exposta as maiores concentrações de Cd. Esse efeito também foi observado por Kumar et al. (2010) para *U. lactuca* e Jiang et al. (2013) para *U. linza* e *U. prolifera*. Sob influência da temperatura e salinidade, observou-se que a toxicidade do metal foi maior com menor salinidade e maior temperatura, reduzindo os parâmetros fotossintéticos analisados e consequentemente os valores de TCs. Um padrão semelhante foi encontrado por Connan e Stengel (2011), onde um aumento nas concentrações de cobre e redução na

salinidade afetou fisiologicamente a alga marrom *Ascophyllum nodosum*. Embora a temperatura seja de grande importância para as macroalgas, pesquisas sobre sua interação com a toxicidade de metais são negligenciadas. Por outro lado, estudos com microalgas são comuns e apresentam aumento da toxicidade com o aumento da temperatura (Rai et al., 1981).

Neste trabalho, *U. ohnoi* manteve crescimento e alta atividade fotossintética quando exposta as menores concentrações de Cd utilizadas (0,625 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) em S15, 18°C e S35, 18 - 25°C. Resistência a baixas concentrações de metais também foi relatada por Jiang et al. (2013) para *U. prolifera* e *U. linza*. Os autores observaram um aumento na capacidade de controle osmótico e manutenção dos teores totais de N e P em baixas concentrações de Cd. Essa capacidade também foi relatada em halófitas, entretanto, seus mecanismos de resistência ainda não estão claros (Ghnaya et al., 2007). TCs negativas com menor concentração de Cd (0,625 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram observados nos tratamentos que apresentaram menores TCs sem adição de Cd (S15, 25 - 28°C e S35, 28°C). Essas reduções dos TCs podem estar relacionadas a mecanismos de exclusão ou imobilização do metal por processos ativos visando à redução da toxicidade. Com parte do metabolismo realocando energia para reduzir o estresse da temperatura e da salinidade, a adição de Cd pode ter resultado em um balanço energético negativo. Resultados semelhantes com a interação de salinidade e metais traço também foram observados por Connan e Stengel (2011) para *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus*, com redução de TCs na menor concentração de cobre (0,1 mg L^{-1} Cu) e valores negativos em 1 mg L^{-1} Cu.

O desempenho da fotossíntese descrito aqui pelas ETR_{abs} , F_v / F_m e curvas $\text{ETR}_{\text{abs}} \times \text{irradiância PAR}_{\text{abs}}$, demonstrou uma redução significativa com o aumento da concentração de Cd no meio e uma alta correlação com a captação de Cd (ver Tab. 2). Vários padrões foram encontrados nas salinidades e temperaturas utilizadas, demonstrando a complexidade das interações que ocorrem na experimentação trifatorial. Nossos resultados indicaram que a concentração de Cd influenciou a absorção de luz pelo fotossistema II em *U. ohnoi*. Os valores de PAR_{abs} demonstraram redução ao longo do tempo e características dose-dependentes, resultando em um decréscimo nos valores de ETR_{abs} . Esse processo ocorre devido aos múltiplos sítios de ligação do Cd nos componentes dos processos fotossintéticos (Kučera et al., 2008). Os componentes da fotoquímica primária do fotossistema II são mais suscetíveis ao Cd, interferindo tanto no lado doador quanto no lado receptor de elétrons na taxa de transporte de elétrons (Perreault et al.,

2011). No doador, a troca de Ca por Cd ocorre no cofator Mn afetando a reação de Hill e inibindo a evolução de oxigênio (Parmar et al., 2013; Perreault et al., 2011). No receptor, o Cd provoca vários efeitos como a interferência na transferência de elétrons entre as plastoquinonas QA e QB (Parmar et al., 2013; Sigfridsson et al., 2004). Em outro ponto importante, o Cd substitui o Mg no centro da molécula de clorofila, impedindo a absorção e transferência de fótons para os centros de reação, resultando na degeneração da clorofila (Bertrand e Poirier, 2005). Este fato também pode explicar nossos resultados de branqueamento do talo causado pela perda de pigmentação em tratamentos onde o Cd foi adicionado.

Embora o Cd cause alterações fisiológicas que comprometem os processos fisiológicos, neste trabalho, *U. ohnoi* apresentou manutenção do crescimento mesmo quando incubada em água contaminada com Cd. Também observamos um acúmulo de Cd dependente da dose em todas as combinações usadas com um valor máximo de $4,20 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd. Acúmulo dependente de dose é atribuído ao aumento da força motriz causada pela diferença na concentração de Cd entre meio e algas (Suzuki et al., 2005), bem como os sítios de ligação disponíveis na parede celular e material intracelular (Webster et al., 1997). A manutenção do crescimento pode estar relacionada a uma maior quantidade de sítios de ligação ao Cd na parede celular, dificultando a internalização e conseqüente dano metabólico.

Os valores máximos do fator de concentração (FC) foram $81,3 \pm 1,1\%$ do Cd adicionado na concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ em S15 e 18°C , seguido por $79,9 \pm 7,4\%$ em S35 e 25°C . Os valores de FC diminuíram com o aumento da concentração de Cd no meio, com valores mais baixos ($13,1 \pm 1,2\%$) para S35, 28°C e ($1,5 \pm 1,1\%$) S15, 25°C na concentração máxima utilizada ($15 \mu\text{g L}^{-1}$). De fato, *U. ohnoi* exibe maior eficiência na absorção de Cd do que outras macroalgas (veja Tab. 3). Essa diferença na eficiência de captação pode estar ligada às concentrações iniciais de Cd usadas nos estudos. Vale ressaltar que os valores de Cd utilizados neste estudo representam um gradiente em torno dos valores permitidos na legislação brasileira e encontrados em águas marinhas e estuarinas (CONAMA, 2005; Ferreira et al., 2004). Assim, nossas descobertas podem representar, em certo sentido, cenários do mundo real. Em contraste com a grande maioria dos estudos, que avaliam a toxicidade e os efeitos bioquímicos da contaminação de Cd em macroalgas usando concentrações extremamente altas comparadas com àquelas encontradas em efluentes ou águas contaminadas por descargas de efluentes (Ferreira et al., 2004). Mesmo que esses trabalhos demonstrem altos valores de

eficiência de captação (ver Tab. 3), os níveis finais na solução encontrada nesses estudos são ainda maiores do que aqueles permitidos pela legislação, tornando o potencial de biorremediação menos relevante em tais estudos.

Tabela 3 - Recentes trabalhos sobre eficiência de absorção do metal cádmio por macroalgas

Macroalgas	Concentração inicial de Cd	Eficiência na remoção (%)	Tempo de exposição	Referências
<i>Ulva lactuca</i>	1.50 mg. L ⁻¹	27.04	5d	Saleh, 2015
<i>Ulva prolifera</i>	1.12 mg. L ⁻¹	39.2	7d	Jiang et al., 2013
<i>Ulva linza</i>	1.12 mg. L ⁻¹	24.3	7d	Jiang et al., 2013
<i>Ulva intestinalis</i>	1.12 mg. L ⁻¹	12.5	7d	Vecchia et al., 2012
<i>Ulva laetevirens</i>	1.12 mg. L ⁻¹	30.7	7d	Vecchia et al., 2012
<i>Ulva ohnoi</i>	0.625 µg. L⁻¹	81.3	8d	Este trabalho
<i>Pterocladia capillacea</i>	0.17 mg. L ⁻¹	75.6	7 d	Felix et al., 2014
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	1 mg. L ⁻¹	9.1	6d	Tonon et al., 2011
<i>Fucus vesiculosus</i>	10 µg. L ⁻¹	76.3	7d	Henriques et al., 2017

Nossos resultados demonstraram que *U. ohnoi* tem capacidade de captação de Cd aceitável ao longo de uma gama de combinações de temperatura, salinidade e concentrações realistas de Cd. Nas menores concentrações utilizadas, as algas mantiveram o crescimento (multiplicação celular), resultando em aumento da área de superfície e possivelmente maior número de sítios de ligação disponíveis para Cd. No entanto, os resultados dos tratamentos sem adição de Cd demonstraram que *U. ohnoi* poderia ter estado limitada por nutrientes nos últimos 4 dias do experimento. A deficiência de nitrogênio pode levar a uma diminuição na atividade enzimática do metabolismo do carbono e um declínio na concentração de proteínas solúveis (Pinchetti et al., 1998). Assim, a eficiência de absorção de Cd por *U. ohnoi* pode ser maior do que a registrada aqui. Estudos que vinculam a captação de Cd e nutrientes em *U. ohnoi* são necessários para melhor elucidar essa questão. Esta suposição foi confirmada para *U. fasciata*, onde Lee e Wang (2001) obtiveram um aumento de 2,4 vezes no acúmulo de Cd quando a concentração de nitrato no meio foi aumentada de 10 para 100 µM.

2.5 Conclusão

Este trabalho demonstrou o potencial de fitorremediação de *U. ohnoi* sob condições ambientalmente realistas de contaminação por Cd. Da mesma forma, os efeitos dos parâmetros físico-químicos (salinidade e temperatura) sobre a toxicidade e capacidade de acúmulo de Cd foram avaliados, elucidando, na medida do possível, as complexas relações entre os fatores utilizados e as respostas biológicas dessa espécie. Em geral, mudanças nos parâmetros fotossintéticos analisados foram observadas em todas as concentrações de Cd utilizadas. No entanto, em algumas combinações de salinidade, temperatura e concentração de Cd, essas alterações não se refletiram na redução do crescimento e no aumento do branqueamento do talo. Este fato ocorreu nas mesmas combinações que favoreceram o crescimento nos tratamentos sem Cd (18°C, S15 e 18 - 25°C, S35), indicando que nestas condições, os efeitos negativos do Cd não são suficientes para alterar negativamente o balanço metabólico. Essas condições permitiram o crescimento e a contínua absorção de metais do meio, diminuindo as concentrações residuais de Cd na água do mar. Acúmulo dependente da dose foi observado em todas as combinações de fatores usados com um valor máximo de 4,20 µg Cd por grama de alga seca, quando *U. ohnoi* foi exposto a 15 µg L⁻¹ de Cd a 18°C e S35. Os valores máximos de FC foram de 81,3 ± 1,1% do Cd adicionado na concentração de 0,625 µg L⁻¹ em S15 e 18°C, seguido por 79,9 ± 7,4% em S35 e 25 °C.

Em geral, nossos resultados demonstraram o potencial do uso de *U. ohnoi* na fitorremediação de águas contaminadas com Cd, com a vantagem de ter altas taxas de absorção de nutrientes e altas taxas de crescimento. Assim, pode ser uma espécie promissora para novos estudos visando um modelo de fitorremediação de águas salinas contaminadas.

CAPÍTULO 3

Interações entre salinidade e disponibilidade de fósforo podem influenciar na produção de células reprodutivas de *Ulva ohnoi* (Chlorophyta, Ulvales)

(Este capítulo foi submetido ao periódico Environmental and Experimental Botany com o título: Interaction between salinity and phosphorus availability can influence seed production of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta, Ulvales))

RESUMO

Embora a produção global de macroalgas tenha aumentado nas últimas décadas, a contribuição das macroalgas verdes para este cenário é pouco expressiva, principalmente, por limitações técnicas na obtenção de uma fonte confiável e constante de germinação. *Ulva ohnoi* (Ulvophyceae) é uma espécie amplamente distribuída que exibe rápido crescimento e altas taxas de absorção de nitrogênio e fósforo, sendo uma boa candidata para a produção de biomassa. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos interativos da salinidade e do teor de fósforo na água na indução da reprodução de *U. ohnoi*, na liberação de células reprodutivas, bem como na germinação e crescimento das plântulas. A área reprodutiva do talo apresentou um valor máximo de $94,17 \pm 1,89\%$ no dia 4 com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo e S25. Na mesma condição, a maior intensidade de liberação de gametas ocorreu com 284.000 ± 33.000 gametas L^{-1} no dia 6. Após a liberação, $87,5 \pm 3,5\%$ dos zigotos germinaram quando mantidos na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo e S25. A taxa de crescimento das plântulas foi positiva em todos os tratamentos testados, com valores máximos para incubação em S15, S25 e S35 ($24,12 \pm 2,11$, $27,54 \pm 0,86$ e $24,21 \pm 0,89\%$ dia^{-1} , respectivamente) na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Em geral, os resultados mostram um alto potencial de produção de biomassa de *U. ohnoi* utilizando técnicas de indução e semeadura.

Palavras-chave: germinação, *Ulva ohnoi*, reprodução, macroalgas verdes, produção de macroalgas

ABSTRACT

Although the global macroalgae production has increased in the last decades, the contribution of green macroalgae to this scenario is little motivated, mainly, by technical limitations in obtaining a reliable and constant source of germlings. *Ulva ohnoi* (Chrolophyta) is a widely distributed species that exhibits rapid growth and high rates of nitrogen and phosphorus absorption, making it a good candidate for biomass production. Therefore, the present study aimed to evaluate the interactive effects of salinity and phosphorus content in the water on *U. ohnoi* reproductive induction, reproductive cell release, as well as germination and growth of the germlings. The reproductive area in the thallus presented a maximum value of $94.17 \pm 1.89\%$ on day 4 with $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus and S25. In the same condition, highest intensity of gamete release occurred with 284000 ± 33000 gametes L^{-1} on day 6. After release, $87.5 \pm 3.5\%$ of the zygotes germinated when kept at the concentration of $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ phosphorus and S25. The growth rate of germlings was positive in all treatments tested with maximum values for incubated at S15, S25 and S35 (24.12 ± 2.11 , 27.54 ± 0.86 and $24.21 \pm 0.89\%$ day^{-1} , respectively) at the concentration of $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus. In general, the results show a high potential of *U. ohnoi* biomass production using breeding induction and sowing techniques.

Keywords: *Ulva ohnoi*, reproduction, green macroalgae, macroalgae production

3.1.Introdução

A produção mundial de macroalgas marinhas tem apresentado crescimento expressivo nas últimas décadas, passando de um volume de produção na ordem de 13 milhões de toneladas em 2005 para pouco mais de 30 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018). No entanto, esta produção é dominada por apenas algumas espécies de macroalgas vermelhas (Rhodophyta) e pardas (Phaeophyceae) (por exemplo, *Euचेuma* spp., *Laminaria japonica*; *Gracilaria* spp.; *Undaria pinnatifida*), usadas principalmente para extração de ficocolóides ou alimentação direta (FAO, 2018). As macroalgas verdes (Chlorophyta) têm representação limitada, com redução de 46% na produção nas últimas duas décadas, atingindo 15.737 toneladas em 2016 (FAO, 2019). Pouco interesse econômico combinado com limitações técnicas para alcançar produção constante de biomassa poderia explicar esse declínio (Gao, 2016). No entanto, a descoberta de novos produtos, a partir de algas verdes, renovou o interesse na produção de biomassa e, conseqüentemente, otimizou as tecnologias para atingir esse objetivo (Chiellini e Morelli, 2011).

O gênero *Ulva* é um dos mais estudados dentre as macroalgas verdes, apresentando diversas características interessantes para sua aplicabilidade. O gênero é cosmopolita, apresenta rápido crescimento, tolerância as variações ambientais e altas taxas de absorção de nutrientes (Angell et al., 2015; Guiry e Guiry, 2019). No entanto, a produção comercial é quase inexistente e está ligada ao consumo de produtos alimentícios de alto valor no Japão. É cultivada usando sistemas de semeadura totalizando, cerca de, 1500 toneladas de biomassa seca por ano (Ohno, 2006). Nos últimos anos, vários estudos revelaram diferentes aplicações da biomassa de *Ulva* na indústria, como matéria-prima para produtos farmacêuticos (Zhang et al., 2012), produção de biogás (Bruhn et al., 2011) e remoção de metais tóxicos de efluentes (Areco et al., 2012).

As espécies de *Ulva* são geralmente cultivadas por reprodução vegetativa através da fragmentação ou liberação de células reprodutivas e semeadura em estruturas como cordas, redes ou sistemas de "germling cluster" (Castelar et al., 2014; Hiraoka et al., 2008). Embora, amplamente utilizada em sistemas de produção em tanques, a fragmentação vegetativa apresenta vários problemas, como a indução da formação de estruturas reprodutivas. Conseqüentemente, a liberação de células reprodutivas resulta na desintegração de parte ou de todo o talo. Por outro lado, a

semeadura de células reprodutivas proporciona maior controle do processo com produção intensiva de biomassa (Carl et al., 2014b).

A produção de macroalgas por semeadura é uma técnica utilizada com várias espécies (Alveal et al., 1997; Castelar et al., 2014; Le Gall et al., 2004). No ambiente natural, são instaladas cordas ou redes em bancos naturais das espécies desejadas, e quando as células reprodutivas são liberadas, assentam nas estruturas possibilitando a transferência para zonas de produção (Castelar et al., 2014). Entretanto, esta técnica não permite o controle da densidade, e a distribuição pode ser irregular nas cordas ou redes. Além disso, a ocorrência de espécies não alvo na estrutura representa um problema adicional que reduz a produtividade e aumenta o custo de produção. Por outro lado, técnicas de semeadura artificial vêm sendo utilizadas desde a década de 1980. A manipulação de fatores abióticos, como temperatura, salinidade, fragmentação, desidratação e adição de nutrientes, induzem a reprodução e, consequentemente, a liberação de células reprodutivas para a semeadura (Carl et al., 2014a). Embora, diversos estudos tenham sido realizados para identificar os fatores que induzem a reprodução em *Ulva* spp. (Carl et al., 2014a e b; Mantri et al., 2011), ainda é necessário entender como estes fatores interagem e, precisamente, como induzem a reprodução e liberação de células reprodutivas, resultando na germinação e crescimento das plântulas.

Estudos demonstraram que *Ulva ohnoi* possui alto potencial para produção de biomassa, apresentando tolerância às mudanças nos fatores ambientais e altas taxas de crescimento (Lawton et al., 2013; Angell et al., 2015; Mata et al., 2016; Bastos et al., 2019). Além de sua aplicação na biorremediação de efluentes da aquicultura (Masaló et al., 2016) e remoção de metais traço (Bastos et al., 2019), o polissacarídeo ulvana e outros subprodutos, como ácidos graxos, fibras solúveis e aminoácidos, agregam valor à cadeia de produção, criando possibilidades econômicas interessantes para utilização da biomassa (Angell et al., 2014; Mata et al., 2016; Glasson et al., 2017). No entanto, pouco se sabe sobre aspectos reprodutivos e utilização de técnicas de semeadura nesta espécie, uma vez que os estudos, até o momento, se concentram na utilização por reprodução vegetativa (Mata et al., 2016). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos interativos da salinidade e do teor de fósforo na água na indução da reprodução, na liberação de células reprodutivas, bem como na germinação e crescimento das plântulas de *U. ohnoi*. Uma vez que a utilidade econômica da *U. ohnoi* poderia estender-se a potenciais atividades de biorremediação em ambientes costeiros mundiais (Elekwachi et al., 2014) este estudo pode melhorar o

conhecimento sobre esta espécie e desenvolver uma base para a produção de biomassa através da indução de reprodução e semeadura artificial .

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Condições Pré-experimentais

Amostras de *U. ohnoi* foram coletadas e identificadas por Bastos et al. (2019). Os indivíduos foram mantidos em cultivo por 12 meses no Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina - Brasil, antes da realização dos experimentos. No laboratório, *U. ohnoi* foi mantida utilizando água do mar esterilizada (salinidade 35) enriquecida com von Stoch (8 mL L⁻¹) (Edwards, 1970), temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), aeração e irradiância ($120 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com 4 lâmpadas fluorescentes, Osran 30w DayLight) constantes com 12h de fotoperíodo. A irradiância foi medida com LI-COR LI-1400 DataLogger e sensor UnderWater UWQ8815. A água do mar foi esterilizada com filtro mecânico (5 e 10 μm) e exposta, em fluxo contínuo, à irradiação ultravioleta *c*. A água do mar foi analisada por meio de técnica colorimétrica, segundo por Grasshoff et al. (1983), e apresentou baixos níveis de amônia ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$), nitrato ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fósforo (indetectável). O meio de cultivo foi trocado semanalmente e as algas pesadas para manter a densidade de 5 g (biomassa úmida) por litro. Durante os experimentos, foram modificados apenas a salinidade e as concentrações de fósforo.

3.2.2. Identificação do Estádio do Ciclo de Vida

Para a identificação do estágio do ciclo de vida de *U. ohnoi* foi realizada indução da liberação de células reprodutivas com indivíduos adultos isolados, de acordo com Mantri et al. (2011). Após a liberação, os talos das macroalgas adultas foram removidos. Algumas células reprodutivas foram mantidas isoladas, enquanto outras foram misturadas com células reprodutivas de outros indivíduos adultos. As células reprodutivas foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 3.2.1.

3.2.3. Desenho Experimental e Procedimentos

Um desenho bi-fatorial foi utilizado para avaliar os efeitos interativos da salinidade e adição do fósforo nos aspectos reprodutivos e crescimento de *U. ohnoi*. Nos experimentos, as algas foram incubadas em

quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0.25, 0.5 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), totalizando 16 tratamentos. Para cada tratamento foi utilizado três réplicas. As salinidades utilizadas representam valores de estuários e oceanos na costa brasileira (NOAA, 2015; Pagliosa et al., 2006) e obtida com a diluição da água do mar com água destilada (Oliveira et al., 1995). Após a diluição, as concentrações de nutrientes na água do mar permaneceram baixas, como descrito anteriormente. As concentrações de fósforo representam um gradiente de valores encontrados em águas costeiras eutróficas (Fonseca e Braga, 2006; Martins et al., 2012; Scherner et al., 2012). Estas concentrações foram alcançadas pela adição de quantidades proporcionais de Na_2HPO_4 , 7 H_2O (CAS 7782-85-6) na água utilizada.

3.2.4. Efeitos da Salinidade e Fósforo nas Taxas de Crescimento, Indução da Reprodução e Liberação de Células Reprodutivas

Macroalgas adultas com biomassa de $0.50 \pm 0.05\text{g FW}$ sem células em modo reprodutivo foram incubadas por 7 dias em frascos de 250 mL de água do mar esterilizada em diferentes salinidades (10, 15, 25 e 35) e solução de nutrientes von Stoch sem Na_2HPO_4 , 7 H_2O . As concentrações de fósforo foram adicionadas separadamente em cada tratamento no início do experimento. Concentrações de fósforo foram adicionadas separadamente à cada tratamento e foram obtidas pela diluição proporcional de uma solução estoque de Na_2HPO_4 , 7 H_2O com 50 mM até que as concentrações usadas nos experimentos fossem obtidas. Após 7, dias as algas foram secas utilizando papel absorvente e pesadas em balança analítica. As taxas de crescimento foram calculadas como $\text{TCa} (\% \text{ dia}^{-1}) = [(B_t/B_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde B_i = biomassa fresca inicial, B_t = biomassa fresca depois de 7 dias e t = tempo do experimento em dias.

A indução da reprodução foi avaliada observando cada réplica individualmente em 2, 4 e 6 dias. Um microscópio óptico (Leica Microsystems DM 2500 e sistema de captura Leica Microsystems DFC295) foi utilizado, e 50 campos ópticos foram avaliados em 400x de ampliação em cada réplica. Quando o campo não apresentava área 100% reprodutiva ou não reprodutiva, foi fotografado, medido as áreas e calculadas, com o auxílio do software ImageJ 1.8.0, a porcentagem reprodutiva e não reprodutiva do campo. Os dados são apresentados como área reprodutiva (%).

A quantificação da liberação de células reprodutivas foi realizada utilizando três alíquotas de 500 μL de cada réplica após 2, 4 e 6 dias do início do experimento. Utilizando uma câmara de Neubauer (volume de

0,009 mL), os gametas foram quantificados em 3 pseudoréplicas por réplica.

3.2.5. Efeitos da Salinidade e Fósforo na Taxa de Germinação e Crescimento das Plântulas

Para avaliar as taxas de germinação, utilizou-se alíquotas de cada tratamento anterior e, após diluição, a concentração foram ajustadas para 10×10^3 células reprodutivas por mL^{-1} . Desta solução, alíquotas de 10 mL foram colocadas em placas de Petri de 50 mL com 5 lamínulas (2 x 2 cm) e meio de cultura preparado conforme explicado no item 3.2.3. Imediatamente após a inoculação, as placas foram deixadas no escuro por 2 horas para estimular a fixação das células reprodutivas nas lamínulas. Após 7 dias, a taxa de germinação foi avaliada pela contagem de 30 campos óticos de 400x por réplica. Foram consideradas células reprodutivas germinadas aquelas que apresentaram ao menos uma divisão celular. Os resultados foram expressos como % de células reprodutivas germinadas em relação ao total observado.

As taxas de crescimento foram avaliadas medindo o comprimento do talo de 30 plântulas por lamínula após 14 e 21 dias de cultivo. Os resultados foram expressos como taxa de crescimento ($\text{TCp} = \% \text{ dia}^{-1}$) e calculados seguindo a fórmula: $\text{TCp} (\% \text{ dia}^{-1}) = [(C_t/C_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde C_i = comprimento inicial do talo, C_t = comprimento do talo após 7 dias, e t = tempo do experimento em dias.

Este experimento manteve as algas nas mesmas condições e tratamentos utilizados na indução da reprodução e liberação de gametas (Item 3.2.4) e foram realizados em triplicata para cada tratamento, com meio de cultivo trocado a cada 7 dias.

3.2.6. Análises Estatísticas

Os efeitos interativos da salinidade e concentração de fósforo em *U. ohnoi* foram analisados por ANOVA. Análises de normalidade e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) foram realizadas para verificar se as premissas foram atendidas. ANOVA fatorial foi usada para detectar diferenças significativas nos efeitos da salinidade, concentrações de fósforo e suas interações nas taxas de crescimento do talo adulto (TCa), taxas de germinação de células reprodutivas e taxas de crescimento das plântulas (TCp). Utilizou-se ANOVA com medidas repetidas para detectar os efeitos dos fatores utilizados (salinidade e fósforo) e suas interações na formação de áreas reprodutivas e liberação de gametas ao

longo do tempo (2, 4 e 6 dias). Nesta análise, o tempo foi considerado como outro fator. Quando diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$), o teste de comparação múltipla post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) foi aplicado. A análise de correlação de Pearson foi realizada considerando o nível de significância como $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 12 (StatSoft, Inc. 2011).

3.3. Resultados

3.3.1. Identificação do Estádio do Ciclo de Vida

As células reprodutivas liberadas por *U. ohnoi* apresentaram dois flagelos de comprimento análogo e, quando mantidos isolados, não formaram geração subsequente, confirmando a natureza gametofítica das algas utilizadas. Embora Hiraoka et al. (2004b) tenham descrito os gametas como sendo anisogâmico, a diferenciação entre gameta feminino e masculino não foi possível neste trabalho. Quando os gametas foram colocados em contato, ocorreu a fecundação, perda dos flagelos, sedimentação e germinação dos zigotos.

3.3.2. Taxas de Crescimento de Talos Adultos, Indução da Reprodução e Liberação de Gametas

Valores de TCa de *U. ohnoi* foram fortemente afetados pela interação entre salinidade e fósforo (Tab. 4). Em S35 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo, foram encontrados os maiores valores de TCAs (Figura 11). Para S10 e S15, nenhuma mudança significativa foi observada em TCAs ao longo das concentrações de fósforo utilizadas, com uma média de $8,81 \pm 1,30\%$ dia^{-1} para S10 e $7,60 \pm 3,10\%$ dia^{-1} para S15. Para S25, foi observada uma redução no TCa com aumento das concentrações de fósforo ($r = 0,955$; $p < 0,0001$; $n = 12$), tornando-se negativo a partir de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo (Figura 11).

Tabela 4 - Resumo da análise ANOVA fatorial comparando Taxa de crescimento de talos adultos (TCa), Taxa de germinação e Taxa de crescimento de plântulas de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 7 dias. Tratamentos significativos estão em negrito ($p < 0,05$).

	TCa		Taxa de germinação		TCp	
	F	p	F	p	F	p
Salinidade	687,5	< 0,001	109,6	< 0,01	69,8	< 0,01
Fósforo	14,7	< 0,001	54,0	< 0,01	215,4	< 0,01
Salinidade X Fósforo	64,3	< 0,001	6,7	< 0,001	28,2	< 0,01

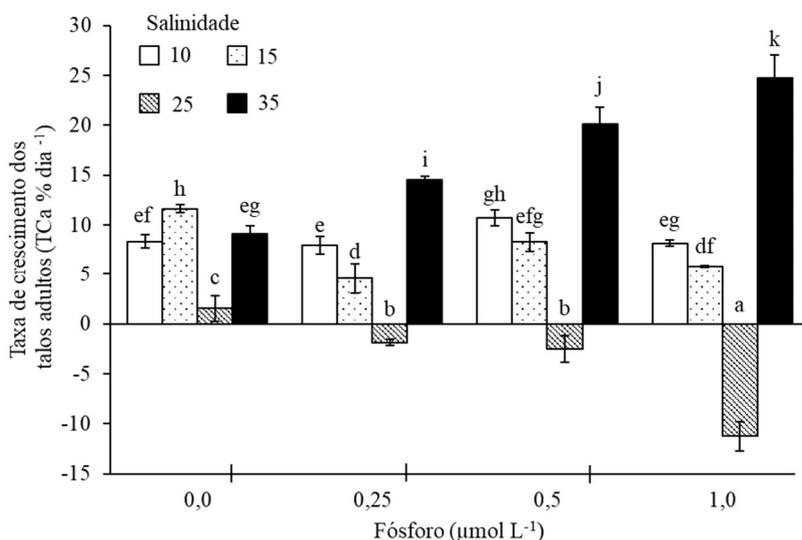


Figura 11 - Taxa de crescimento de talos adultos (TCa) de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 7 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc de SNK ($p < 0,05$).

U. ohnoi aumentou sua área reprodutiva quando exposta a salinidades intermediárias (principalmente em S25) e concentrações mais altas de fósforo (Figura 12). A formação de áreas reprodutivas no talo foi, significativamente, influenciada pela interação da salinidade, fósforo e tempo de acordo com ANOVA com medidas repetidas (Tab. 5). A área

reprodutiva do talo foi maior em S25 em todas as concentrações de fósforo utilizadas, com maiores valores ($89,92 \pm 6,29\%$, $94,17 \pm 1,89\%$ e $90,73 \pm 4,45\%$ em 2, 4 e 6 dias, respectivamente) na maior concentração de fósforo adicionada ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 12). Em S35, a formação de áreas reprodutivas não foi significativa para as concentrações de fósforo utilizadas durante os tempos analisados (Figura 12).

Tabela 5 - Resumo da análise ANOVA com medidas repetidas comparando as Áreas reprodutivas e as Taxas de liberação de gametas de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) depois de 2, 4 e 6 dias. Tratamentos significativos estão em negrito ($p < 0,05$).

	Área reprodutiva		Gametas liberados	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Salinidade	1396,3	< 0,001	1220,6	< 0,001
Fósforo	56,2	< 0,001	161,9	< 0,001
Salinidade X Fósforo	11,2	< 0,001	108,4	< 0,001
Tempo	46,2	< 0,01	4,2	< 0,02
Tempo X Salinidade	6,6	< 0,01	19,2	< 0,001
Tempo X Fósforo	4,0	< 0,001	6,4	< 0,001
Tempo X Sal. X Fósf.	4,5	< 0,001	8,3	< 0,001

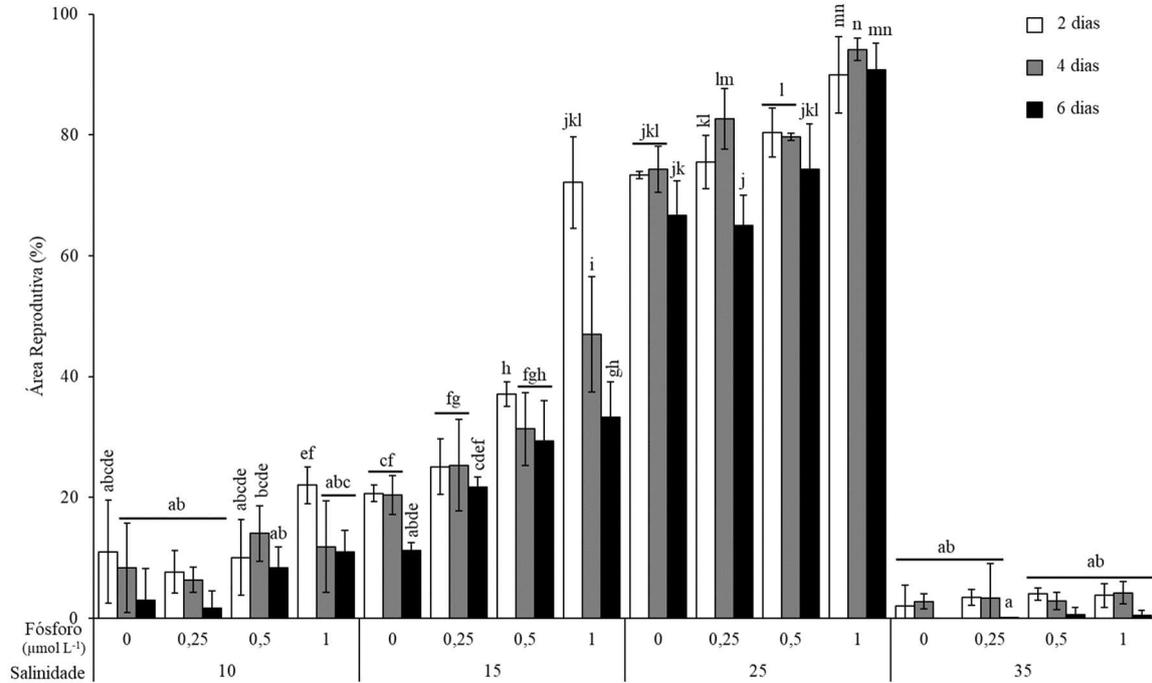


Figura 12 - Área reprodutiva (%) de talos adultos de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 2, 4 e 6 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc de SNK ($p < 0,05$).

Gametas foram liberados em todas as combinações de salinidade e concentração de fósforo utilizadas nos tempos estudados (Figura 13). Os resultados foram significativamente influenciados pelos fatores analisados (salinidade, fósforo e tempo) (Tab. 5). Para S10 e S35, a liberação dos gametas foi acentuada nos primeiros 2 dias, mas diminuiu ao longo do tempo (Figura 13). Para S15 e S25, os gametas liberados tinham padrões diferentes ao longo do tempo e as concentrações de fósforo usadas (Figura 13). Para S15, a liberação foi maior no 2º dia nas concentrações de 0 e 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo, seguida de redução ao longo do tempo. Em concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a liberação foi maior no 4º dia, diminuindo no 6º dia (Figura 13). Os maiores valores de gametas liberados foram encontrados no S25. Uma intensidade significativamente maior na liberação de 284000 ± 33000 gametas L^{-1} foi encontrada nas concentrações de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo no dia 6 (Figura 13; Tab. 6).

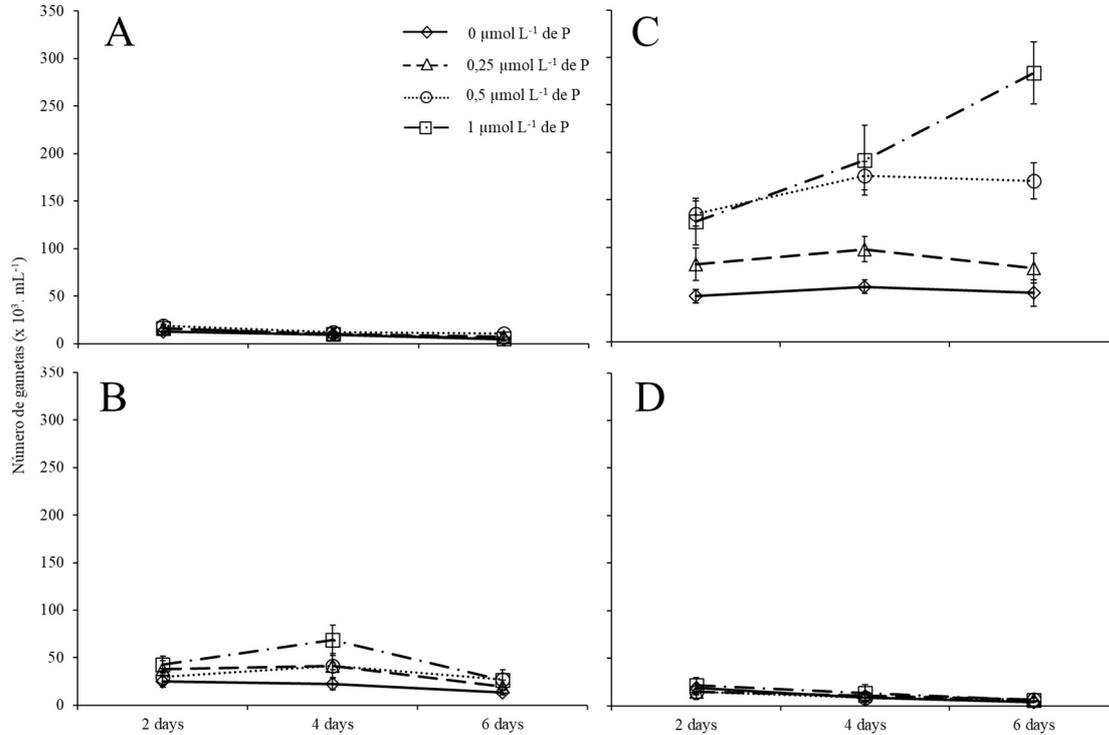


Figura 13 - Número de gametas liberadas por *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois 2, 4 e 6 dias. Barras representam média \pm DP para n = 3. A = S10, B = S15, C = S25 e D = S35.

Tabela 6 Resumo de SNK comparando o Número de gametas liberadas por *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 2, 4 e 6 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc SNK ($p < 0,05$).

Salinidade	Fósforo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Tempo		
		2 dias	4 dias	6 dias
10	0,00	abc	abc	a
	0,25	abcd	abc	abc
	0,50	abcd	abc	abc
	1,00	abcd	abc	a
15	0,00	abcde	abcde	abc
	0,25	abcdef	bcdefg	abcd
	0,50	abcdef	bcdefg	abcde
	1,00	cdefg	gh	abcde
25	0,00	defg	fgh	efg
	0,25	hi	i	hi
	0,50	j	k	k
	1,00	j	k	l
35	0,00	abcd	abc	a
	0,25	abc	abc	ab
	0,50	abc	abc	ab
	1,00	abcde	abc	ab

3.3.3. Taxa de Germinação e Taxa de Crescimento das Plântulas

As taxas de germinação das células reprodutivas foram iguais ou superiores a 50% em todas as combinações de fatores utilizados (salinidade e fósforo) (Figura 14). Os valores mais altos foram encontrados para o S25 em todas as concentrações de fósforo, com a maior taxa de germinação de $87,5 \pm 3,5\%$ na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado ao meio (Figura 14). Os resultados mostraram interações significativas entre salinidade e fósforo (Tab. 4).

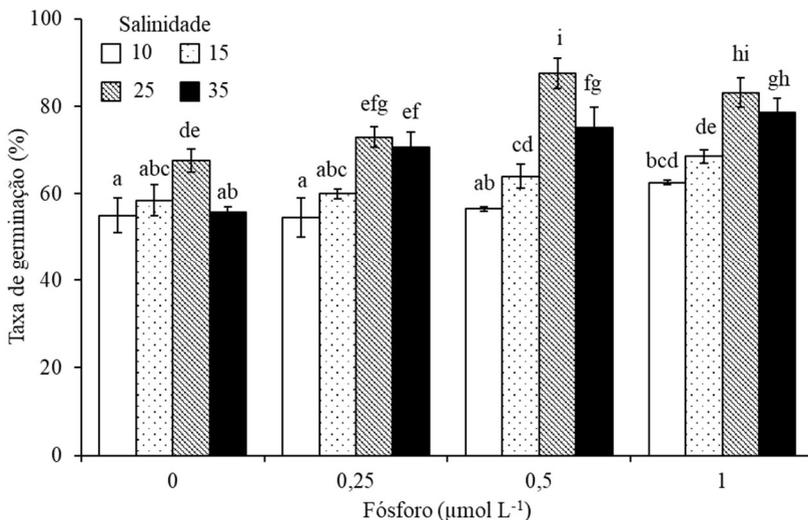


Figura 14 - Taxa de germinação das células reprodutivas de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 7 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$).

Os valores de TCps foram positivos em todos os tratamentos testados, apresentando valores máximos para plântulas incubadas em S15, S25 e S35 na concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo ($24,12 \pm 2,11$, $27,54 \pm 0,86$ e $24,21 \pm 0,89\%$ dia^{-1} , respectivamente) (Figura 15). Interações significativas foram encontradas entre os fatores estudados (salinidade e fósforo) (Tab. 4). O teste SNK mostrou que S10 não obteve diferenças significativas nas concentrações de fósforo utilizadas. O mesmo resultado foi encontrado para todas as salinidades testadas quando nenhum fósforo foi adicionado ao meio (Figura 15).

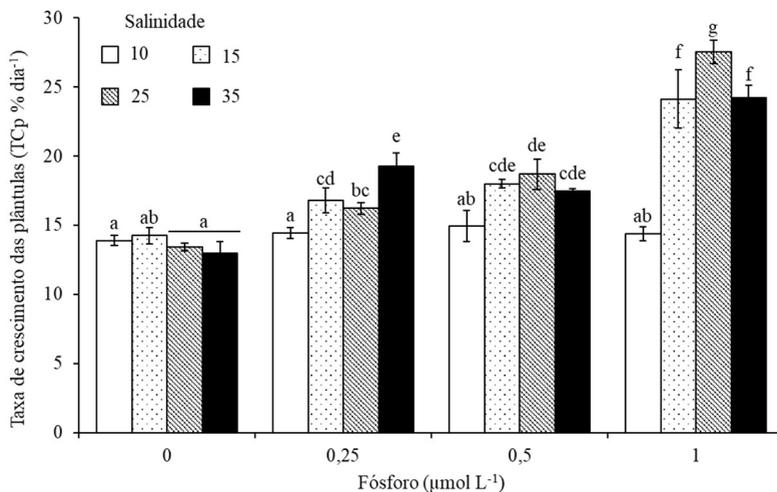


Figura 15 - Taxa de crescimento das plântulas (TCp) de *Ulva ohnoi* exposta a quatro salinidades (10,15,25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) depois de 7 dias. Barras representam média \pm DP para $n = 3$. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc de SNK ($p \leq 0,05$).

3.3.4. Análise de Correlação

A análise de correlação indicou que TCa apresentou uma forte correlação negativa com a média das áreas reprodutivas formadas ao longo de 6 dias e o número total de gametas liberados (Tab. 7). Por outro lado, o número total de gametas liberados mostrou uma forte correlação com a média das áreas reprodutivas (Tab. 7).

Tabela 7 - Valores de correlação de Pearson obtidos entre variáveis dependentes após exposição de *Ulva ohnoi* a quatro salinidades (10, 15, 25 e 35) e quatro concentrações de fósforo (0, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Tratamentos significativamente correlacionados são atribuídos em negrito ($p < 0,05$). Variáveis dependentes: Taxa de crescimento de talos adultos (TCa), Média das Áreas reprodutivas, Total de gametas liberados, Taxa de germinação, Taxa de crescimento das plântulas (TCp).

	Média das Áreas Reprodutivas	Total de gametas liberados	Taxa de germinação	TCp
TCa	-0,845	-0,802	-0,234	-0,139
Média das Áreas Reprodutivas		0,876	0,577	0,375
Total de gametas liberados			0,698	0,532
Taxa de germinação				0,667

3.4. Discussão

Os efeitos da salinidade em algas marinhas têm sido extensivamente estudados ao longo dos anos e mostram que faixas ótimas de crescimento estão dentro da média do registrado no ambiente em que são encontradas (Karsten, 2012). Em estuários, as variações na salinidade influenciam significativamente na biomassa de algas adultas de *U. intestinalis*, entretanto, o enriquecimento com nutrientes reduz os efeitos negativos da baixa salinidade (Kamer e Fong, 2000). Para *U. ohnoi*, Angell et al. (2015) obtiveram crescimento em uma ampla faixa de salinidade para uma cepa australiana, com melhores resultados entre 25 e 40. A mesma espécie já foi registrada crescendo em salinidade 18 na costa japonesa (Ohno, 1988). Nossos resultados demonstraram crescimento ótimo em S35 com efeito significativo da adição de fósforo ao meio. Foi observado também redução em S10 e S15, sem efeitos da adição de fósforo ao meio e sem apresentar formação de áreas reprodutivas significativas no talo. Angell et al. (2015), obtiveram resultados ainda mais drásticos para *U. ohnoi* australiana, com morte em 3 dias para salinidade 10 e 9 dias para 15. Esta heterogeneidade nas respostas pode estar relacionada a aclimação da espécie as particularidades encontradas em cada ambiente e ao tempo de exposição as variações dos fatores. Embora macroalgas do gênero *Ulva* apresentem alta tolerância a uma ampla gama de salinidades (Angell et al., 2015; Xiao et al., 2016), a exposição por longos períodos em faixas nos extremos dos valores de aclimação podem desencadear alterações importantes e com alto custo energético no metabolismo para manter a osmorregulação (Kirst, 1989).

Uma redução drástica nas TCas foi observada quando a salinidade foi reduzida de 35 para 25, sendo potencializada pelo aumento nas concentrações de fósforo ao meio. Esta redução está fortemente correlacionada com o aumento na indução da reprodução e liberação dos gametas. Durante o processo de formação de estruturas reprodutivas, são desencadeadas uma série de mudanças metabólicas que resultam na redução do crescimento vegetativo e transformação de células somáticas em estruturas reprodutivas (Wichard e Oertel, 2010). Além disso, a liberação de zoósporos e gametas causa ruptura celular e desintegração parcial ou total do talo (Hiraoka e Enomoto, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados por Ale et al. (2011) e Bruhn et al. (2011) para *U. lactuca*. Gao et al. (2017a) também encontraram um declínio acentuado no crescimento e aumento na taxa reprodutiva em uma linhagem selvagem de *U. rigida*, enquanto uma linhagem mutante estéril continuou a crescer. Estes eventos reprodutivos desencadeados por fatores abióticos parecem ser um dos principais fatores que contribuem para a formação de marés verdes provocadas por espécies de *Ulva* (Zhang et al., 2013). Entretanto, a manipulação da indução da reprodução se torna uma importante ferramenta para produzir sementes para cultivos em diversos sistemas de produção (Hiraoka e Oka, 2008).

A indução da reprodução em espécies de *Ulva* acontece naturalmente por eventos ambientais, tais como variações na salinidade, ondas de calor e fases da Lua (Lüning et al., 2008). Embora pouco estudada, a indução artificial da reprodução tem-se demonstrado uma importante ferramenta (Han e Choi, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre a interação entre fatores e sua influência na indução da reprodução, apenas na germinação e crescimento das plântulas (Imchen, 2012). Nossos resultados demonstraram interações entre a salinidade e as concentrações de fósforo utilizadas. Em S35, não ocorreu áreas reprodutivas abundantes (média de 9,62%), demonstrando que, isoladamente, as concentrações de fósforo utilizadas neste trabalho não apresentaram efeito indutor da reprodução em *U. ohnoi*, apenas estimulando o crescimento vegetativo (ver Figura 11 e 12). Por outro lado, em S10, S15 e S25 os resultados demonstraram uma forte correlação entre a salinidade e as concentrações de fósforo. Um incremento de 28% (média dos dias analisados) na área reprodutiva dos talos cultivados entre 0 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo em S25 foi observado. Han et al. (2005) e Dan et al. (2002) observaram resultados semelhantes ao incubar *U. pertusa* e *U. prolifera* (citada como *Enteromorpha prolifera*), em salinidades diferentes. Para *U. fasciata*, Mantri et al. (2011) encontraram melhor resultados incubando em salinidade 15 e 25°C. Entretanto, para Carl et al.

(2014a), a salinidade não estimulou a reprodução em *Ulva* sp.3, sendo a temperatura e o fotoperíodo os gatilhos para a reprodução nesta espécie. A interação entre a salinidade e temperatura antecipou e elevou a taxa reprodutiva de *U. fasciada* (Mantri et al., 2011). Nossos resultados indicam que a redução da salinidade pode ser o principal gatilho para a indução da reprodução de *U. ohnoi* neste trabalho. Por outro lado, a adição do fósforo pode ter elevado o balanço metabólico, fornecendo, em conjunto com o nitrogênio adicionado ao meio, reservas para a gametogênese. Esta ideia é apoiada também por Chávez-Sánchez et al. (2018), que obtiveram um aumento na indução da reprodução quando *U. acanthophora* estava presente em concentrações elevadas de fósforo. Estes resultados evidenciam a necessidade de estudos que integram os fatores para aumentar o estímulo da reprodução e, conseqüentemente, a liberação de células reprodutivas em menor tempo, tornando o processo de obtenção de células reprodutivas mais eficaz.

Embora a salinidade tenha induzido de forma pronunciada a formação de estruturas reprodutivas em S25, foi observado liberação de gametas em todas as combinações de salinidade e concentração de fósforo utilizadas. Observou-se um número maior de gametas liberados em S15 e S25. Para S15, o auge da liberação foi no 4º dia na maior concentração de fósforo ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Em S25, foram liberados o maior número de gametas, com picos no 4º dia e no 6º dia. Nossos resultados estão dentro da faixa de salinidade (15 e 35) que parece ser o ideal para a liberação de células reprodutivas em macroalgas marinhas por estar dentro da média registrada no ambiente (Han e Choi, 2005; Pellizzari et al., 2008; Mantri et al., 2011). Entretanto, valores extremos de salinidade (por exemplo 5 ou 50), podem impossibilitar a liberação de células reprodutivas em talos férteis, influenciando no diâmetro do poro e das células reprodutivas (Dan et al., 2002). Nossos resultados também demonstraram interações significativas entre salinidade e as concentrações de fósforo utilizadas. Aumento de 449,2% na liberação de gametas foi observado em S25 no dia 6 quando a concentração de fósforo adicionado ao meio passou de 0 para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados semelhantes foram observados por Imchen (2012) com *U. flexuosa*. Chávez-Sánchez et al. (2018) ao estudar populações de *Ulva* no Golfo da Califórnia, observaram que a formação de zoósporos é influenciada pelo aumento na concentração de fósforo e a liberação ocorre quando aumentam as concentrações de nitrogênio na água.

Condições apropriadas também são necessárias para que as células reprodutivas germinem e cresçam (Agrawal, 2009). Normalmente, macroalgas adultas possuem maior resistência as variações ambientais,

possuindo uma faixa de tolerância maior em relação aos esporos, gametas e plântulas (Choi et al., 2010; Sousa et al., 2007). Nossos resultados apontam para uma alta taxa de germinação em todas as combinações de salinidade e fósforo utilizadas. Uma média de $66,9 \pm 10,5\%$ dos gametas liberados neste trabalho fecundaram e germinaram, com menor valor (54%) para S10 e $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo e maior (87%) para S25 e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo, evidenciando a interação entre os fatores testados. Para S35, 78% dos gametas germinaram na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Desta forma, acreditamos que, para a germinação de zigotos de *U. ohnoi*, a faixa ótima de salinidade está entre 25 e 35, corroborando com outros trabalhos realizados com espécies do mesmo gênero. Mantri et al. (2011) registraram 78% de germinação para *U. fasciata* quando incubada em salinidade 30 e baixa irradiância ($15 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para *U. prolifera*, uma espécie de vida livre formadora de marés verdes, Cui et al. (2018) e Zhang et al. (2013) encontraram taxas de germinação de 91 e 96%, respectivamente. A interação entre temperatura, CO_2 e nitrato elevou em 440,35% a germinação em *U. rigida* no segundo dia (Gao et al., 2017b). Estes resultados deixam evidente que os processos reprodutivos são influenciados de forma isolada e conjunta por diversos fatores ambientais e que o estudo dos efeitos e seus mecanismos são de grande importância para melhorar o rendimento na obtenção de plântulas.

Outro fator importante na produção de biomassa por semeadura de células reprodutivas é o crescimento das plântulas. No estágio inicial do desenvolvimento das plântulas, o metabolismo está destinado a replicação celular e, por consequência, crescimento vegetativo, refletindo em altas taxas de crescimento em um curto período de tempo (ver Xiao et al., 2016). Este fato torna o cultivo de *Ulva* para produção de biomassa através da semeadura de células reprodutivas ainda mais interessante, embora grande parte dos estudos utilizem algas adultas (Xiao et al., 2016). A utilização de plântulas tem proporcionado altas densidades de alga em pouco espaço sem problemas com sombreamento (Hiraoka e Oka, 2008). Neste trabalho, as plântulas cultivadas em S15, S25 e S35 tiveram seus TCps positivamente influenciadas pelas concentrações de fósforo e apresentaram os maiores valores de TCps com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo em S25 ($27,54\% \text{ dia}^{-1}$), seguido por S35 ($24,21\% \text{ dia}^{-1}$) e S15 ($24,12\% \text{ dia}^{-1}$). As plântulas mantidas em S10 apresentaram menores valores de TCps e não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de fósforo utilizadas. TCps similares são encontrados na literatura para plântulas de outras espécies de *Ulva*; por exemplo, $16,1\% \text{ dia}^{-1}$ em *U. fasciata* (Mantri et al., 2011), $25,28\% \text{ dia}^{-1}$ em *U. rigida* (Gao et al.,

2017c), 22,18% dia⁻¹ em *U. intestinalis* (Ruangchuay et al., 2012). Entretanto, a maioria dos trabalhos induz a liberação de células reprodutivas em uma condição específica e, após a liberação, aplica os tratamentos. Neste trabalho, mantivemos as células reprodutivas nas mesmas condições em que ocorreu a indução da reprodução. Os resultados obtidos demonstraram taxas de crescimento superiores nas plântulas em todos tratamentos. Este resultado pode ser uma seleção das linhagens esporofíticas que melhor se aclimataram as condições utilizadas. Além do fato que, esporófitos (2n) poderiam ter melhores taxas de crescimento por possuírem uma quantidade de material genético maior que gametófitos (n) (Kondrashov e Crow, 1991). Hannach e Santelices (1985) observaram, para *Iridaea laminariodes*, crescimento maior do esporófito nas primeiras semanas de desenvolvimento em relação ao gametófito.

3.5. Conclusão

A produção de plântulas através da indução artificial da reprodução em talos adultos de *U. ohnoi* foi investigada. Uma abordagem bi-fatorial foi utilizada com o intuito de encontrar melhores combinações entre salinidade e fósforo que otimizem o processo de obtenção das plântulas. Para todas as condições experimentais testadas, o tratamento com salinidade 25 e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo obteve os maiores valores de indução da reprodução, número de gametas liberados, e taxa de crescimento das plântulas. Para taxa de germinação, maior valor foi observado em salinidade 25 e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. No geral, os resultados evidenciam um grande potencial de produção de biomassa utilizando técnicas de indução da reprodução e semeadura para obtenção de plântulas de *U. ohnoi*. De fato, a utilização desta técnica poderia otimizar o processo de obtenção de plântulas para um programa de biotecnologia de remediação e produção de biomassa de *Ulva*, assim como em testes de antiincrustação e testes toxicológicos laboratoriais. Além disso, nossos resultados colaboram para a compreensão da formação das marés verdes causadas por *U. ohnoi*.

CAPÍTULO 4

SELEÇÃO DE LINHAGENS EM *Ulva ohnoi* (Chlorophyta, Ulvales)

RESUMO

A produção industrial de macroalgas necessita de previsibilidade e controle dos processos produtivos; desta forma, a busca por linhagens com características desejadas, aliada a altos níveis de produção, torna-se uma necessidade lógica. *Ulva ohnoi* é uma espécie de macroalga verde com alta tolerância aos fatores abióticos e crescimento rápido, sendo utilizada na biorremediação de efluentes da aquicultura e remoção de metais traço. O presente estudo teve como objetivo selecionar linhagens gametofíticas e esporofíticas que apresentassem tolerância a salinidades reduzidas com alta eficiência de absorção de fósforo. As linhagens esporofíticas LE01-25 e LE02-25 apresentaram altos valores de eficiência de absorção de fósforo, com média de $98,80 \pm 2,31\%$ e $97,66 \pm 5,39\%$, respectivamente. As linhagens gametofíticas apresentaram os menores valores de eficiência na absorção de fósforo. A linhagem LG01-25 apresentou melhor velocidade de absorção de fósforo entre as linhagens gametofíticas, com $28,53 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ absorvido na concentração de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo nos primeiros 15 min de incubação. Nas linhagens esporofíticas, LE01-25 apresentou maior velocidade de absorção, com $67,45 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ absorvido na concentração de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Os resultados demonstraram diferenças nas taxas de crescimento entre linhagens do mesmo estágio do ciclo de vida e entre linhagens que estavam nas mesmas condições. LE01-25 apresentou TC de $34,31 \pm 1,51\% \text{ dia}^{-1}$ quando incubada com $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. As linhagens esporofíticas também apresentaram maior conteúdo de fósforo nos tecidos. Em geral, os resultados demonstram a possibilidade de seleção de linhagens, por meio de células reprodutivas, para obter algas adaptadas às condições desejadas de salinidade com uma boa eficiência e velocidade de absorção de fósforo, resultando em produção de biomassa.

Palavras-chave: Seleção de linhagens, *Ulva ohnoi*, remoção de fósforo

ABSTRACT

Commercial production of macroalgae requires predictability and control of the productive processes, in this way, the search for strains with desired characteristics coupled with high levels of production become a logical necessity. In this way, *Ulva ohnoi* is a species of green macroalgae with high tolerance to abiotic factors and fast growth, being used in bioremediation of aquaculture effluents and removal of trace metals. In view of these facts, the present study had as objective to select gametophytic and sporophytic strains that presented tolerance to reduced salinities with high phosphorus absorption efficiency. The sporophytic strains LE01-25 and LE02-25 presented high values of phosphorus absorption efficiency, with a mean of $98,80 \pm 2,31\%$ and $97,66 \pm 5,39\%$, respectively. The gametophytic strains had the lowest values of phosphorus absorption efficiency. The LG01-25 strain presented a better phosphorus absorption rate between the gametophytic strains, with $28.53 \mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ absorbed at the concentration of $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus at 15 min incubation. In the sporophytic strains, LE01-25 presented a higher absorption rate, with $67,45 \mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ absorbed at the concentration of $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus. The results demonstrated differences in growth rates between strains of the same life cycle stage and between strains that were under the same conditions. LE01-25 presented GR of $34.31 \pm 1.51\% \text{ day}^{-1}$ when incubated with $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ of phosphorus. Sporophytic strains also had higher phosphorus content in the tissues. In general, the results demonstrate the possibility of selection of strains, through reproductive cells, to obtain adapted macroalgae the desired salinity conditions with a good efficiency of phosphorus absorption rate, resulting in biomass production.

Keywords: Strain selection, *Ulva ohnoi*, removal of phosphorus

4.1.Introdução

A produção industrial de macroalgas necessita de previsibilidade e controle dos processos produtivos e, portanto, a busca por linhagens com características desejadas, aliada aos altos níveis de produção, tornam-se uma necessidade lógica (Levy e Friedlander, 1990a, b). Enquanto o desenvolvimento de técnicas e melhoramentos genéticos para obtenção de linhagens em plantas agrícolas alcançou um sucesso notável nas últimas décadas, por outro lado, a seleção de linhagens de macroalgas marinhas ainda é um campo novo que tem despertado grande interesse (Robinson et al., 2013). Ao longo dos últimos anos, diversos programas de seleção de linhagens de macroalgas foram implementados na busca de variantes com características específicas mais pronunciadas em relação as linhagens selvagens (Meneses e Santelices, 1999). As principais características alvo têm sido o crescimento (Paula et al., 1999), morfologias mais atraentes (Li et al., 1999), resistência do talo (Mollion e Braud, 1993) e tolerância às variações abióticas (Yan et al., 2010).

Para obtenção destas características, tradicionalmente utiliza-se um pool de indivíduos de uma ou mais populações e, com experimentações em condições naturais e/ou laboratoriais, seleciona-se indivíduos que melhor expressem as características desejadas (Bulboa et al., 2008; Lawton et al., 2013). Recentemente, novas técnicas tem surgido com o principal objetivo de aumentar a variabilidade genética da produção, entretanto, são de difícil execução e com alto custo (Cheney et al., 1998; Reddy et al., 2008). Por outro lado, a seleção a partir de células reprodutivas (esporos ou gametas) tem apresentado bons resultados (Paula et al., 1999) permitindo uma variabilidade genética alta e reprodução seletiva contínua (Robinson et al., 2013).

Fatores abióticos, como temperatura e salinidade, podem influenciar na germinação das células reprodutivas e no crescimento das plântulas (Song et al., 2015) funcionando como uma barreira, selecionando linhagens que toleram as novas condições impostas, e formando ecótipos (Yan et al., 2010). Diante deste problema, macroalgas verdes do gênero *Ulva* realizam a liberação em massa, tanto de esporos como de gametas, aumentando as chances de surgimento de uma linhagem adaptada às novas condições (Carl et al., 2014a). Esta estratégia coloca espécies deste gênero como oportunistas, ocupando diversas regiões com características abióticas diferentes (Lawton et al., 2013).

Ulva ohnoi é uma espécie de crescimento rápido, com alta tolerância aos fatores abióticos, sendo responsável pela formação de marés verdes na costa do Japão (Hiraoka et al., 2004b). Esta alga tem sido

utilizada para biorremediação de efluentes da aquicultura (Masaló et al., 2016) e remoção de metais traço (Bastos et al., 2019), além de sua biomassa produzir o polissacarídeo ulvana e outros bioprodutos (ácidos graxos, fibras solúveis, aminoácidos) (Angell et al., 2014; Mata et al., 2016; Glasson et al., 2017). A espécie possui ciclo de vida com alternância de gerações isomórficas, onde esporófito diplóide produz zoósporos por meiose e gametófitos haplóides produzem gametas por mitose. Além deste ciclo, existe registro de reprodução por partenogênese quando gametófitos ficam isolados (Hiraoka et al., 2004b). No capítulo 3 desta tese, observamos que a redução da salinidade em conjunto com diferentes concentrações de fósforo estimularam a reprodução desta espécie e as novas gerações foram tolerantes as condições de salinidade impostas às algas progenitoras. Diante destes fatos, o presente estudo possui como objetivo selecionar linhagens gametofíticas e esporofíticas que apresentem tolerância às salinidades reduzidas e apresentem alta eficiência de absorção de fósforo.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Condições Pré-experimentais

Espécimes de *Ulva ohnoi* utilizadas neste estudo foram coletadas e identificadas por Bastos et al. (2019). As algas foram cultivadas por 24 meses no Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina - Brasil, antes da realização dos experimentos. No laboratório, *U. ohnoi* foi mantida utilizando água do mar esterilizada (salinidade 35) enriquecida com meio von Stoch (8 mL L^{-1}) (Edwards, 1970), temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), aeração e irradiância ($120 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com 4 lâmpadas fluorescentes, Osran 30w DayLight) constantes com 12h de fotoperíodo. A irradiância foi medida com LI-COR LI-1400 DataLogger e sensor UnderWater UWQ8815. A água do mar foi esterilizada com filtro mecânico (5 e 10 μm) e exposta, em fluxo contínuo, à radiação ultravioleta *c*. O meio de cultivo foi trocado semanalmente e as algas pesadas para manter a densidade de 5g (biomassa úmida) por litro. A identificação do estágio do ciclo de vida foi realizada no capítulo 3 desta tese.

4.2.2. Obtenção das Linhagens

A seleção de linhagens esporofíticas foi realizada induzindo a reprodução dos talos gametofíticos modificando a salinidade (15, 25 e 35)

e aumentando a concentração de fósforo ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) no meio de cultura. A indução e liberação dos gametas foi realizada mantendo-se as algas adultas isoladas em frascos erlenmeyer de 500 mL. Foram utilizados 5 talos de indivíduos diferentes em cada salinidade para a obtenção dos gametas. Após a liberação, os talos foram removidos, o meio de cultura homogeneizado e uma alíquota de 50 mL foi removida de cada erlenmeyer. As alíquotas de mesma salinidade foram misturadas para ocorrer a fecundação, totalizando 250 mL de meio de cultivo com gametas para cada salinidade. A germinação dos zigotos foi realizada utilizando 3 placas de Petri para cada salinidade contendo 50 mL de meio de cultura com gametas. Após a adição dos gametas, as placas de Petri foram colocadas no escuro por 2 horas para estimular a fixação dos zigotos nas placas. As placas foram cultivadas por 60 dias nas mesmas condições descritas acima, modificando-se a salinidade e a concentração de fósforo para cada tratamento utilizado. O meio de cultura foi renovado a cada 7 dias e as placas ficaram sob agitação constante fornecida por um agitador linear. Após 60 dias, foram selecionadas aleatoriamente 10 plântulas por placa de Petri e medido o comprimento do talo. Foi selecionada a plântula que apresentava maior comprimento do talo em cada placa de Petri, totalizando 3 plântulas por salinidade. As plântulas foram cultivadas isoladas em laboratório para obtenção de biomassa necessária para os próximos experimentos.

A seleção de linhagens gametofíticas foi realizada induzindo a reprodução de talos esporofíticos obtidos anteriormente na salinidade 35. Os zoósporos foram liberados separadamente a partir de 3 algas e os procedimentos seguintes foram idênticos aos descritos para a obtenção de linhagens esporofíticas.

4.2.3. Absorção de Fósforo

A análise da absorção do fósforo foi realizada utilizando 5g de algas em frascos erlenmeyer de 1 litro com água do mar com baixos teores de amônia ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$), nitrato ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fósforo (indetectável). Esta água do mar foi enriquecida com 6 concentrações (1, 5, 10, 15, 30, $70 \mu\text{mol L}^{-1}$) diferentes de fósforo. As concentrações foram obtidas diluindo uma solução concentrada de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7782-85-6) na água do mar utilizada. Também foi adicionado solução von Stoch (8 mL L^{-1}) sem Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ e NaNO_3 , assim como, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de amônio e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrato em cada frasco para evitar limitação por falta de nitrogênio durante os experimentos (Luo et al., 2012). Foram utilizados 3 frascos para cada salinidade e concentração de fósforo

contendo apenas água do mar enriquecida do mesmo modo que os frascos com alga para servir como controle. Foram utilizados 4 erlenmeyer para cada tratamento de salinidade, fósforo e linhagem de *U. ohnoi* selecionada.

Uma amostra de 10 mL de cada frasco foi retirada após 15, 30, 60, 120, 180 e 1440 minutos para monitorar as concentrações de fósforo e avaliar a redução das concentrações ao longo do tempo. A determinação do fósforo foi realizada utilizando o método do azul de molibdênio e quantificado como ortofosfato (P-PO_4^{3-}) segundo Strickland e Parsons (1972).

A eficiência de absorção (%) foi calculada avaliando as mudanças nas concentrações de fósforo após 1440 min de exposição. Foi utilizada a seguinte fórmula: Eficiência de absorção (%) = $100 - [(C_f \times 100) \div C_i]$, onde C_i representa a concentração inicial de fósforo; e C_f representa a concentração de fósforo após 1440 min de exposição. Os valores obtidos foram expressos em %.

A velocidade de absorção (V) foi calculada utilizando as mudanças nas concentrações do fósforo durante cada intervalo de tempo amostrado, utilizando a fórmula: $V = [(C_t \cdot V_t) - (C_{t+1} \cdot V_{t+1})] / (B \cdot \Delta_t)$, onde C_t representa a concentração inicial de fósforo; V_t representa o volume de água inicial; C_{t+1} representa a concentração de fósforo após $t + 1$; V_{t+1} representa o volume após $t + 1$; B representa a biomassa seca utilizada; e Δ_t representa o intervalo de tempo entre t e $t + 1$. Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol P-PO}_4^{3-} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m foram calculados com regressão não linear segundo equação de Michaelis-Menten: $1/V = (K_m/V_{max}) \times (1/[C]) + (1/V_{max})$, onde V representa a velocidade de absorção de fósforo calculada a cada amostragem; V_{max} representa a velocidade máxima de absorção e K_m a concentração do fósforo, onde a absorção ocorre na metade da taxa máxima; e C representa a concentração de fósforo. A relação V_{max}/K_m também foi avaliada como sendo um índice de afinidade pelo fósforo (Li et al., 2016). Os cálculos foram realizados com as curvas de velocidade de absorção obtidas após 15 min e 1440 min de incubação. Foi utilizado o programa SigmaPlot 11 para analisar as curvas e realizar os cálculos de V_{max} e K_m .

4.2.4. Taxa de Crescimento

As taxas de crescimento (TC) das linhagens de *U. ohnoi* foram calculadas registrando a biomassa fresca no início do experimento e após 24h. Amostras (500 mg) para análise de fósforo no tecido foram removidas, a biomassa restante foi registrada e retornada para cultivo por 6 dias nas mesmas condições anteriores sem haver troca de meio. Após 6 dias, as algas foram pesadas novamente. Para o registro da biomassa fresca, as algas foram secas superficialmente utilizando papel toalha até os talos não apresentarem água aderida. A biomassa fresca foi registrada utilizando uma balança analítica (BioPrecisa FA-2104N) e os resultados utilizados para calcular a taxa de crescimento seguindo fórmula: $TC (\% \text{ dia}^{-1}) = [(B_t/B_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde B_i = biomassa inicial fresca, B_t = biomassa fresca após t = tempo experimental em dias.

4.2.5. Concentração de Fósforo no Tecido

O conteúdo de fósforo total no tecido das linhagens de *U. ohnoi*, foi avaliado através da digestão da biomassa com ácido clorídrico segundo Aspila et al. (1976). Amostras contendo 500 mg de biomassa fresca foram secas em estufa a 60°C até peso constante. Para análise de fósforo, foram utilizadas 100 mg de biomassa seca trituradas com auxílio de nitrogênio líquido, almofariz e pistilo. As amostras foram digeridas com 13 mL de ácido clorídrico 1 N por 16 horas em agitação constante com agitador orbital. Após digestão, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante analisado segundo método do azul de molibdênio (Strickland e Parsons, 1972). As análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso em % de fósforo em relação ao peso seco.

4.2.6. Análises Estatísticas

Os efeitos interativos das linhagens selecionadas e as concentração de fósforo em *U. ohnoi* foram analisados por ANOVA. Análises de normalidade e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran) foram realizadas para verificar se as premissas foram atendidas. ANOVA fatorial foi usada para detectar diferenças significativas entre as linhagens selecionadas e as concentrações de fósforo e suas interações na eficiência de absorção de fósforo e nas concentrações de fósforo encontradas na biomassa. Utilizou-se ANOVA com medidas repetidas para detectar diferenças entre as linhagens e o tempo de exposição ao fósforo para

V_{max} , K_m e V_{max}/K_m e, para taxas de crescimento para detectar diferenças entre concentração de fósforo, linhagens e o tempo de exposição ao fósforo. Nesta análise, o tempo foi considerado como outro fator. Quando diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$), o teste de comparação múltipla post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) foi aplicado. As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 12 (StatSoft Inc., 2011).

4.3. Resultados

4.3.1. Absorção de Fósforo

Os resultados de remoção (Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21) e eficiência de absorção (%) (Tabela 8) do fósforo demonstraram uma heterogeneidade de respostas entre as linhagens e as concentrações de fósforo utilizadas com interação significativa entre estes fatores ($F = 17,77$; $p < 0,05$). Em todas as linhagens foi observado uma relação dose dependente com maior remoção em menores concentrações de fósforo no meio. Os maiores valores ocorreram nas linhagens esporofíticas (Figuras 16, 17 e 18) sem diferenças significativas segundo SNK ($p > 0,05$) para as concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado (Tab. 8). As linhagens LE01-25 e LE02-25 apresentaram valores de eficiência de absorção semelhantes em todas as concentrações de fósforo utilizadas (média $98,80 \pm 2,31\%$ e $97,66 \pm 5,39\%$, respectivamente), não apresentando diferenças significativas entre as concentrações e linhagens segundo análise SNK ($p > 0,05$) (Tab.8). As linhagens gametofíticas apresentaram valores de eficiência de absorção baixos, principalmente nas concentrações iguais ou superiores à 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Os maiores valores foram encontrados na linhagem LG01-25, com valores superiores à 80% nas concentrações entre 1 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo e redução em 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo ($44,08 \pm 4,31\%$ e $28,10 \pm 3,64\%$, respectivamente).

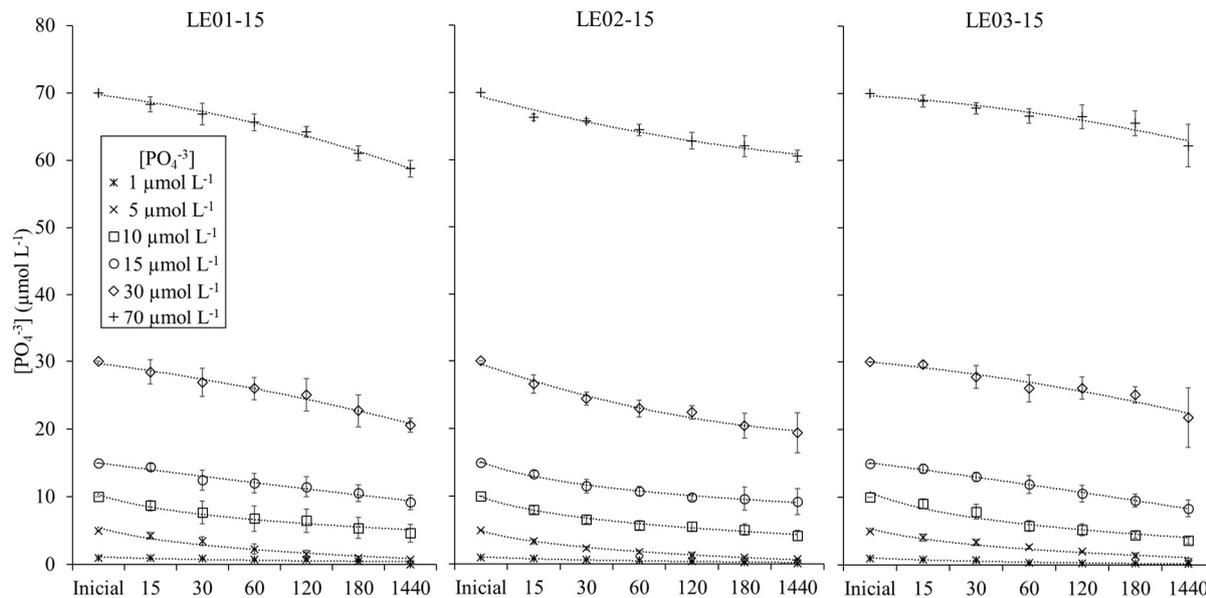


Figura 16 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 15. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

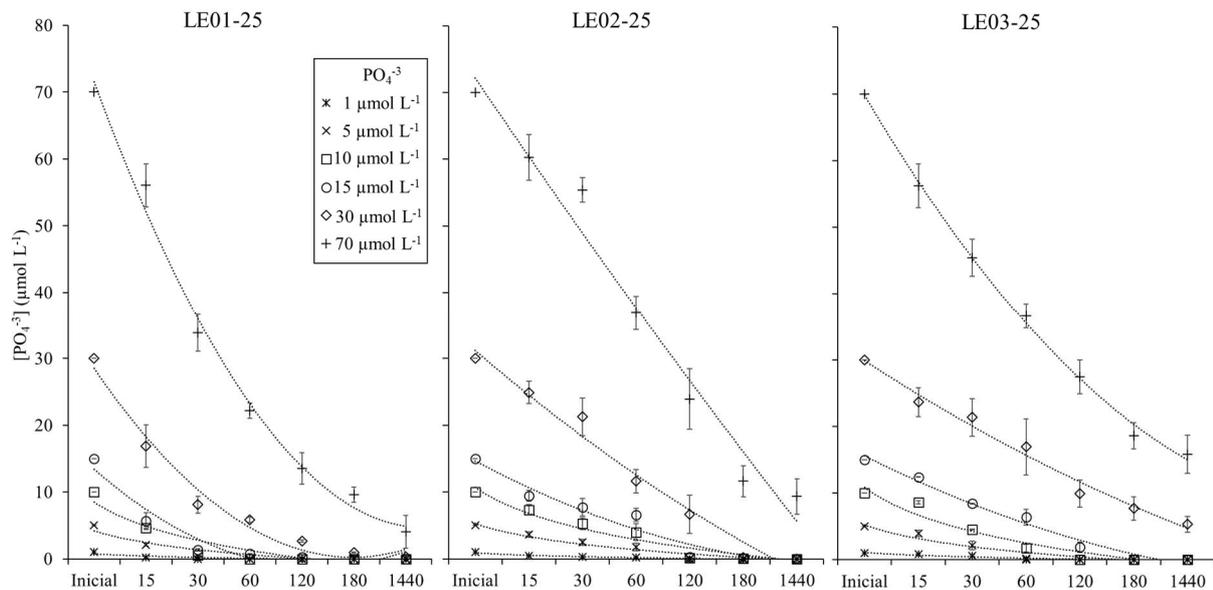


Figura 17 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporotíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 25. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

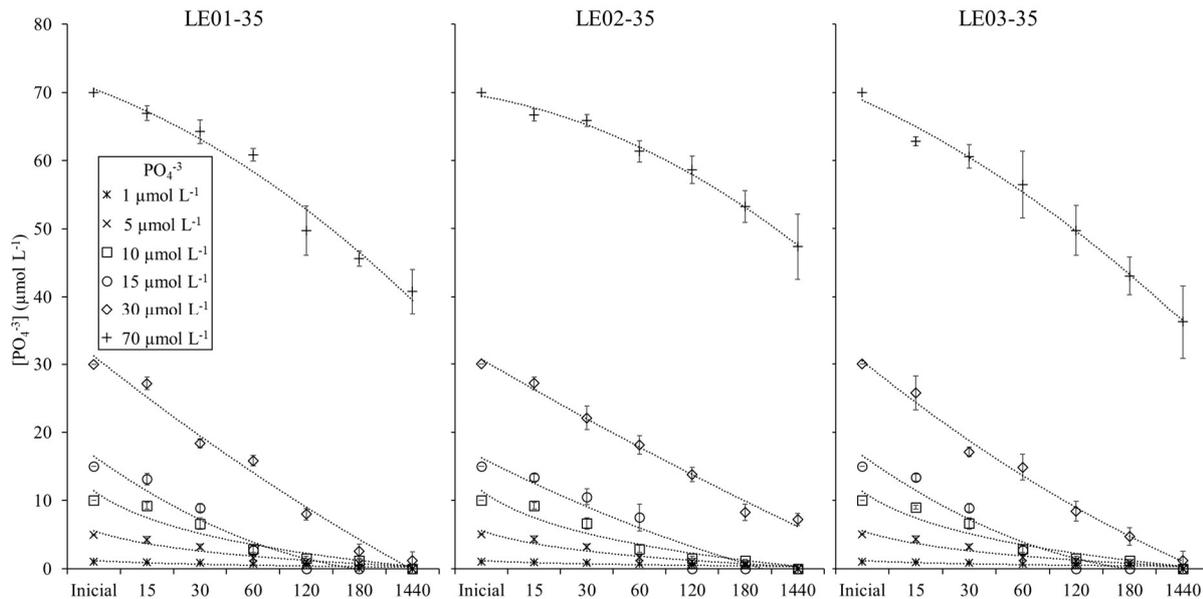


Figura 18 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos esporofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 35. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

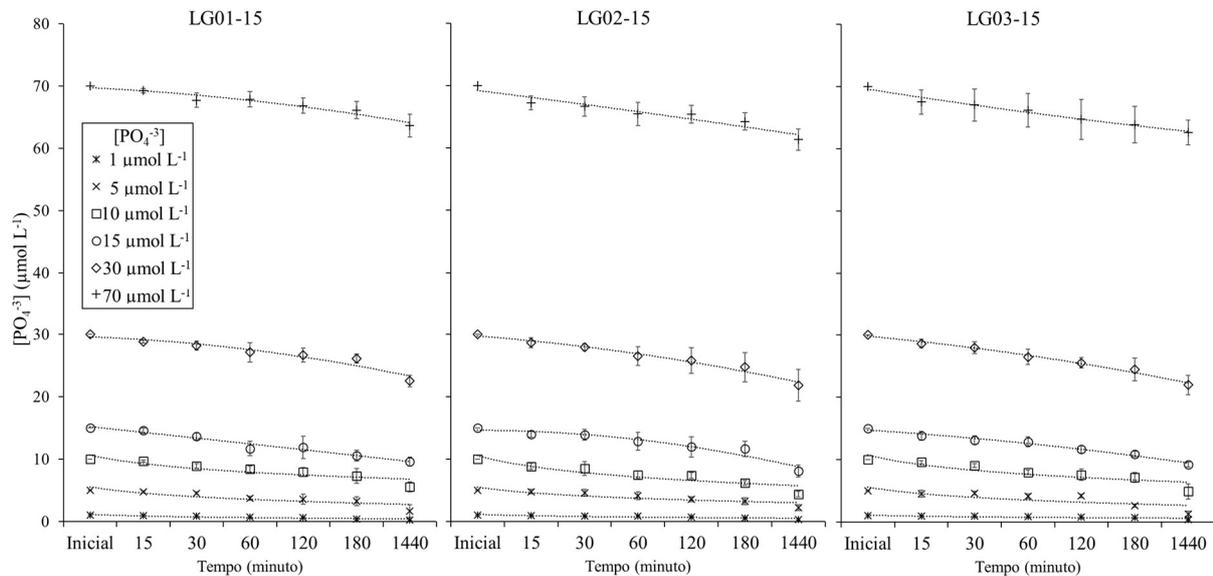


Figura 19 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 15. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

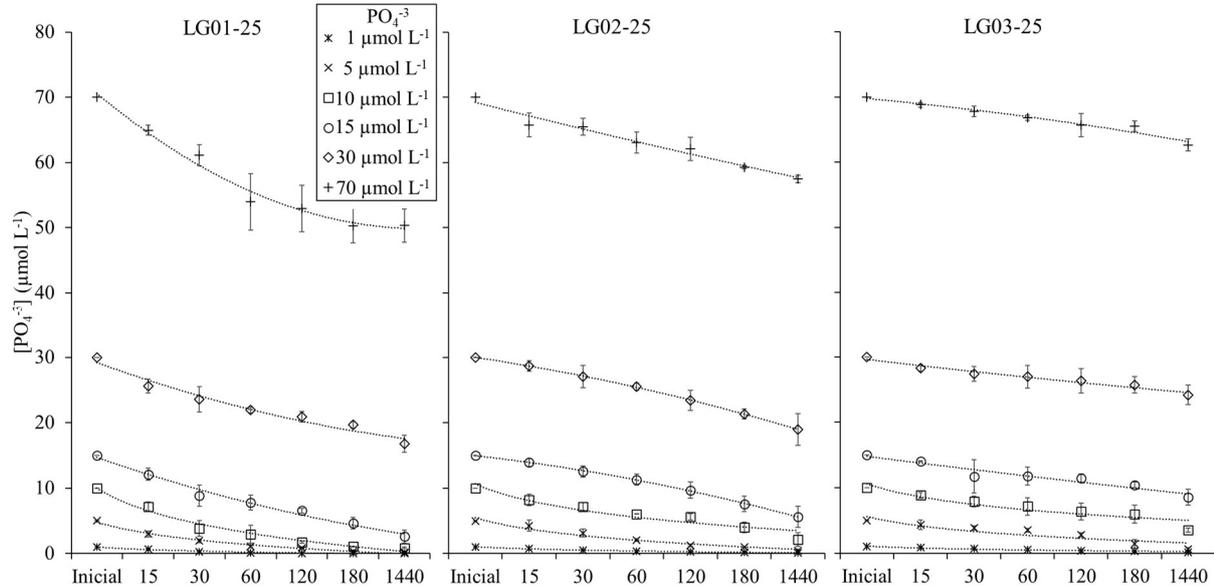


Figura 20 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 25. Dados representam médias \pm DP. n=4.

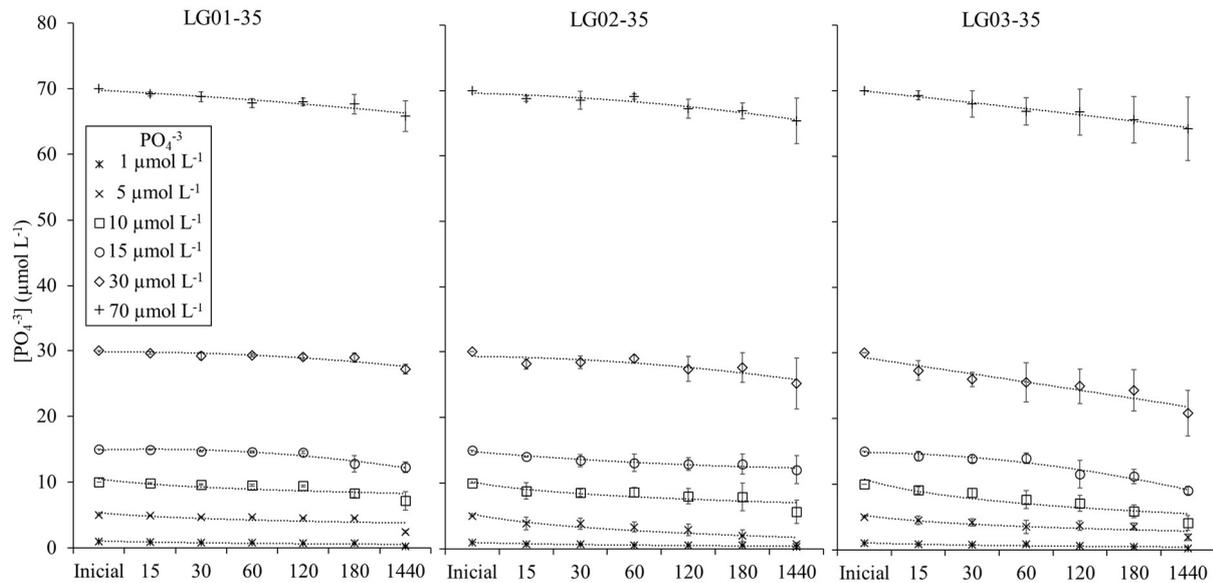


Figura 21 - Cinética da redução do fósforo no meio por diferentes linhagens de talos gametofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 minutos de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e salinidade 35. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

Tabela 8 - Eficiência de absorção (%) do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 1440 min de exposição. Letras e símbolos diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA fatorial e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). $n = 4$.

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LG01-15	LG02-15	LG03-15
1	80,00 \pm 5,67 vxyz	73,39 \pm 3,46 sv	63,73 \pm 7,64 rstu
5	77,41 \pm 1,90 vwxy	56,14 \pm 9,32 opqr	74,43 \pm 9,42 stuvw
10	44,40 \pm 8,07 jklmno	56,28 \pm 4,02 opqr	50,95 \pm 12,20 mnopqr
15	35,98 \pm 4,77 ghijkl	46,34 \pm 6,39 klmnopq	38,44 \pm 2,67 ghijklm
30	24,93 \pm 3,07 bcdefg	27,29 \pm 8,50 defghi	26,85 \pm 5,06 cdefgh
70	9,11 \pm 2,62 a	12,36 \pm 2,42 ab	10,52 \pm 2,84 a

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LG01-25	LG02-25	LG03-25
1	99,78 \pm 0,38 Δ	89,70 \pm 1,25 xyz Δ	87,67 \pm 4,30 vxyz Δ
5	97,06 \pm 0,91 Δ	91,42 \pm 0,82 yz Δ	87,38 \pm 4,36 vxyz Δ
10	91,51 \pm 1,28 yz Δ	78,95 \pm 10,53 vxy	64,78 \pm 3,51 rtuw
15	82,80 \pm 6,57 vxyz Δ	62,68 \pm 10,75 rst	42,93 \pm 8,00 jklmno
30	44,08 \pm 4,31 jklmnop	36,80 \pm 8,20 ghijklm	19,40 \pm 5,00 abcdef
70	28,10 \pm 3,64 defghi	17,87 \pm 0,77 abcde	10,55 \pm 1,33 a

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LG01-35	LG02-35	LG03-35
1	76,60 \pm 8,05 vxy	82,39 \pm 3,32 vxyz Δ	82,74 \pm 4,70 vxyz Δ
5	51,00 \pm 3,96 mnopqr	84,83 \pm 3,81 vxyz Δ	61,79 \pm 9,97 rst
10	28,36 \pm 14,27 defghi	43,48 \pm 17,77 jklmno	59,26 \pm 11,31 qr
15	18,16 \pm 5,17 abcde	19,73 \pm 14,35 abcdef	39,77 \pm 3,95 hijklmn
30	9,48 \pm 2,40 a	15,97 \pm 12,94 abcd	30,76 \pm 11,48 cdefghj
70	5,94 \pm 3,37 a	6,65 \pm 4,99 a	8,31 \pm 6,91 a

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LE01-15	LE02-15	LE03-15
1	94,94 \pm 4,99 z Δ	89,10 \pm 1,58 xyz Δ	86,98 \pm 5,46 vxyz Δ
5	84,95 \pm 3,37 vxyz Δ	84,87 \pm 1,58 vxyz Δ	89,85 \pm 10,29 xyz Δ
10	53,66 \pm 13,15 nopqr	57,90 \pm 7,54 pqr	63,83 \pm 4,82 rst
15	38,68 \pm 7,19 ghijklm	38,67 \pm 12,89 ghijklm	44,24 \pm 8,25 jklmnop
30	31,31 \pm 3,44 cdefghj	35,31 \pm 9,91 ghijkl	27,36 \pm 14,67 cdefghi
70	16,09 \pm 1,81 abed	13,54 \pm 1,28 abc	11,13 \pm 4,51 a

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LE01-25	LE02-25	LE03-25
1	99,83 \pm 0,10 Δ	99,88 \pm 0,05 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
5	99,97 \pm 0,02 Δ	99,77 \pm 0,03 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
10	99,98 \pm 0,01 Δ	99,80 \pm 0,08 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
15	99,99 \pm 0,01 Δ	99,87 \pm 0,05 Δ	99,99 \pm 0,00 Δ
30	98,86 \pm 0,08 Δ	99,99 \pm 0,00 Δ	82,20 \pm 3,92 vxyz Δ
70	94,17 \pm 3,49 z Δ	86,67 \pm 3,75 vxyz Δ	77,38 \pm 4,05 vxy

[P- PO_4^{3-}] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LE01-35	LE02-35	LE03-35
1	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
5	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
10	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
15	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ	100,00 \pm 0,00 Δ
30	96,11 \pm 4,50 Δ	75,88 \pm 2,94 uvwx	96,11 \pm 4,50 Δ
70	41,71 \pm 4,65 jklmn	32,36 \pm 6,81 fghijk	48,22 \pm 7,68 lmnopq

Velocidades de absorção (V) do fósforo foram maiores nos primeiros 15 minutos de incubação para as linhagens gametofíticas (Tabela 9). Após 15 min, ocorre uma considerável queda nas velocidades de absorção. Valores máximos foram encontrados para linhagem LG01-25 nos 15 min iniciais na concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo e superiores com valor máximo de 28,53 $\mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na concentração de 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo (Tabela 9). Para linhagens esporofíticas, os valores das velocidades de absorção foram superiores aos encontrados para linhagens gametofíticas (Tabela 9). Ao longo do tempo, redução nas velocidades são observadas em todas as concentrações após 60 min de incubação. Os maiores valores foram observados para LE01-25 (67,45 $\mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na concentração de 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores máximos das velocidades de absorção (V) do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15, 30, 60, 120, 180 e 1440 min de exposição. Valores em $\mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ seguido da linhagem que apresentou maior valor do grupo.

[P-PO ₄ ⁻³] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Linhagem Gametofítica					
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	1440 min
1	1,87 LG01-25	2,54 LG01-25	0,75 LG01-25	0,69 LG01-25	0,95 LG02-15	0,04 LG01-35
5	12,00 LG01-25	6,78 LG02-25	5,62 LG01-25	2,19 LG01-25	5,97 LG01-15	0,14 LG01-15
10	17,49 LG01-25	8,76 LG02-25	7,12 LG01-25	2,90 LG01-25	8,27 LG01-15	0,23 LG03-25
15	18,70 LG01-25	8,78 LG01-25	9,26 LG01-25	4,35 LG02-15	9,76 LG01-35	0,25 LG02-15
30	23,42 LG01-25	11,69 LG01-25	12,67 LG01-25	5,01 LG02-15	10,50 LG01-25	0,52 LG02-15
70	28,53 LG01-25	14,78 LG01-25	16,84 LG01-25	6,07 LG02-15	14,92 LG01-25	0,50 LG02-15

[P-PO ₄ ⁻³] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Linhagem esporofítica					
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	1440 min
1	3,79 LE01-25	1,88 LE03-25	1,91 LE03-25	0,85 LE01-35	0,62 LE01-35	0,07 LE02-35
5	15,11 LE01-25	17,96 LE01-25	19,90 LE01-25	2,67 LE02-25	6,26 LE01-15	0,11 LE03-15
10	36,41 LE01-25	27,84 LE01-25	28,36 LE01-25	6,82 LE03-25	7,80 LE01-35	0,11 LE02-25
15	51,42 LE01-25	30,55 LE01-25	36,69 LE01-25	9,34 LE02-25	12,00 LE01-35	0,16 LE03-15
30	57,38 LE01-25	44,66 LE01-25	44,56 LE01-25	11,42 LE01-35	15,50 LE01-35	0,56 LE03-15
70	67,45 LE01-25	61,86 LE01-25	52,12 LE01-25	16,47 LE03-35	18,96 LE01-35	1,02 LE03-35

Com base nos valores dos parâmetros cinéticos (V_{max} , K_m e V_{max}/K_m) obtidos das curvas de velocidade de absorção, foi observado que diferenças significativas em relação às linhagens e entre os tempos de 15 e 1440 min (Tabela 10). As linhagens esporofíticas obtiveram valores de V_{max} , K_m e V_{max}/K_m significativamente maiores que linhagens gametofíticas em 15 min (Tabela 11). Redução em todos os parâmetros e

linhagens foram observados quando comparados os tempos de 15 min com 1440 min (Tabela 11).

Tabela 10 - Resumo da análise ANOVA com medidas repetidas para os parâmetros cinéticos de absorção de fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15 e 1440 min de exposição. Tratamentos significativos estão em negrito ($p < 0,05$).

	V_{max}		K_m		V_{max}/K_m	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Linhagem	364,07	<0,05	298,92	<0,05	105,28	<0,05
Tempo	4173,88	<0,05	206,42	<0,05	1914,55	<0,05
Linhagem X Tempo	189,95	<0,05	167,55	<0,05	95,76	<0,05

Dentre as linhagens esporofíticas, valores de V_{max} variaram entre $5,27 \pm 0,38 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na linhagem LE03-15 até o valor máximo de $76,54 \pm 1,95 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para linhagem LE03-25. Estes valores reduzem em 1440 min, variando de $0,49 \pm 0,08 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LE03-15 e máximo de $12,00 \pm 2,11 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LE02-25. Para linhagens gametofíticas, os valores variaram entre $5,87 \pm 1,67 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LG01-15 e máximo de $28,12 \pm 2,57 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LG01-25. Em 1440 min, variaram de $0,27 \pm 0,02 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LG01-35 e máximo de $1,23 \pm 0,04 \mu\text{mol P-PO}_4^{-3} \text{ g (peso seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para LG01-25 (Tabela 11). Valores de K_m foram constantes para grande parte das linhagens e, ao longo do tempo, sem apresentar diferenças significativas segundo SNK (Tabela 11). Em média, as linhagens esporofíticas apresentaram os menores valores quando o tempo de incubação foi de 15min, invertendo quando o tempo passa para 1440 min. Algumas linhagens apresentaram valores distintos das demais. Valores máximos foram encontrados para LG02-25 e LE03-35 ($37,70 \pm 4,12 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $30,82 \pm 7,63 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) para 15 min e LG01-25 e LE03-35 ($19,70 \pm 2,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $32,53 \pm 9,42 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) para 1440 min. Os menores valores encontrados foram em LG03-25 e LE03-15 para os tempos analisados (Tabela 11). Como é mostrado na Tabela 11, os valores da relação V_{max}/K_m é consideravelmente diferente entre as linhagens e durante os tempos analisados. Seus valores máximos estão relacionados com linhagens que apresentaram altos valores de V_{max} (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de absorção do fósforo por linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 15 e 1440 min de exposição. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com ANOVA com medidas repetidas e teste post hoc SNK ($p < 0,05$). $n = 4$.

	15 min			1440 min		
	V_{\max}	K_m	V_{\max}/K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}/K_m
LG01-15	5,87 ± 1,67 bc	11,72 ± 3,81 ab	0,51 ± 0,09 bce	0,42 ± 0,05 a	8,54 ± 2,32 ab	0,05 ± 0,01 ab
LG02-15	15,95 ± 1,14 g	35,25 ± 5,71 e	0,46 ± 0,05 abc	0,48 ± 0,03 a	9,12 ± 2,20 ab	0,05 ± 0,01 ab
LG03-15	10,60 ± 0,67 def	10,19 ± 2,31 ab	1,08 ± 0,25 gh	0,43 ± 0,02 a	6,82 ± 1,18 ab	0,06 ± 0,02 ab
LG01-25	28,12 ± 2,57 i	11,53 ± 5,41 ab	3,39 ± 0,43 l	1,23 ± 0,04 a	19,70 ± 2,02 abcd	0,07 ± 0,01 ab
LG02-25	26,71 ± 0,72 i	37,70 ± 4,12 e	0,91 ± 0,40 fgh	0,70 ± 0,04 a	9,47 ± 1,66 ab	0,08 ± 0,02 a
LG03-25	8,35 ± 2,45 cde	9,58 ± 6,28 ab	1,00 ± 0,30 fgh	0,37 ± 0,04 a	3,45 ± 1,08 a	0,10 ± 0,03 a
LG01-35	5,89 ± 1,63 bc	29,87 ± 4,66 cde	0,24 ± 0,04 ab	0,27 ± 0,02 a	7,53 ± 2,30 ab	0,04 ± 0,01 ab
LG02-35	9,08 ± 2,19 cdef	15,08 ± 7,72 abc	0,66 ± 0,15 cef	0,31 ± 0,04 a	3,93 ± 1,30 a	0,10 ± 0,02 a
LG03-35	7,77 ± 1,65 cd	9,88 ± 3,97 ab	0,83 ± 0,17 cefg	0,51 ± 0,04 a	10,89 ± 0,78 ab	0,04 ± 0,01 ab
LE01-15	7,64 ± 0,26 cd	7,36 ± 1,77 ab	1,00 ± 0,16 fgh	0,54 ± 0,07 a	14,99 ± 3,12 abc	0,04 ± 0,00 ab
LE02-15	20,59 ± 2,78 h	8,15 ± 3,05 ab	2,52 ± 0,45 k	0,55 ± 0,03 a	9,30 ± 1,68 ab	0,06 ± 0,01 ab
LE03-15	5,27 ± 0,38 bc	2,55 ± 0,47 a	2,11 ± 0,31 j	0,49 ± 0,08 a	6,66 ± 2,20 ab	0,07 ± 0,01 ab
LE01-25	70,81 ± 2,67 k	14,11 ± 6,22 abc	6,11 ± 0,49 m	3,57 ± 0,47 ab	18,07 ± 3,90 abcd	0,21 ± 0,01 ab
LE02-25	38,64 ± 2,67 j	17,81 ± 2,81 abcd	1,68 ± 0,42 i	12,00 ± 2,11 f	14,12 ± 25,12 g	0,05 ± 0,00 ab
LE03-25	76,54 ± 1,95 l	22,91 ± 4,87 f	1,23 ± 0,11 gh	11,44 ± 1,01 ef	20,21 ± 27,27 g	0,05 ± 0,00 ab
LE01-35	21,27 ± 4,86 h	14,49 ± 1,81 abc	1,32 ± 0,16 h	1,83 ± 0,18 a	19,34 ± 1,21 abcd	0,10 ± 0,00 a
LE02-35	19,69 ± 2,19 h	23,95 ± 4,23 bcde	0,83 ± 0,09 efg	1,21 ± 0,12 a	16,12 ± 3,03 abc	0,08 ± 0,01 ab
LE03-35	26,07 ± 5,65 i	30,82 ± 7,63 cde	1,17 ± 0,15 gh	1,84 ± 0,11 a	32,53 ± 9,42 de	0,06 ± 0,01 ab

4.3.2. Taxa de Crescimento

Os valores de TC foram influenciados pelas linhagens, concentrações de fósforo e pelo tempo (Tabela 12). Observou-se, em média, maiores valores de TC para as linhagens esporofíticas em ambos os tempos analisados (Figura 23 e 22). Em ambos estádios do ciclo de vida, as maiores TCs foram observados na salinidade 25. Valores semelhantes foram encontrados entre as salinidades 15 e 35 para linhagens esporofíticas em ambos os tempos. Para linhagens gametofíticas, médias com valores maiores de TCs foram para salinidade 35 em 24 h e igualando os valores com salinidade 15 após 6 dias (Figura 22). Diferenças entre as linhagens também foram observadas. A linhagem LE01-25 apresentou as maiores TCs, com $34,31 \pm 1,51\%$ dia⁻¹ em 24h e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo, seguido por $26,11 \pm 1,23\%$ dia⁻¹ ao final dos 6 dias com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado. Estes valores foram superiores em 56% (24h) e 55% (6 dias) em relação a LE03-25 e 36% (24h) e 31% (6 dias) em relação a LE02-25 (Figura 23). Para linhagens gametofíticas, os maiores valores também foram registrados para salinidade 25. A linhagem LG01-25 apresentou valores de $25,23 \pm 1,80\%$ dia⁻¹ em 24h e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo, seguido por $20,14 \pm 0,62\%$ dia⁻¹ ao final de 6 dias com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado (Figura 23). As diferenças entre linhagens da mesma salinidade são menores em relação às linhagens esporofíticas (Figura 23).

Tabela 12 - Resultados da ANOVA com medidas repetidas comparando a taxa de crescimento (TC) de linhagens gametofíticas e esporofíticas de *Ulva ohnoi* incubadas em três salinidades (15, 25 e 35) e seis concentrações de fósforo (1, 5, 10, 15, 30 e $70 \mu\text{mol L}^{-1}$) depois de 24 horas e 6 dias. Efeitos significativos estão em negrito ($p < 0,05$).

	TC (dia ⁻¹)	
	F	p
[PO ₄ ⁻³]	213,34	< 0,001
Tempo	0,79	> 0,05
Linhagem	414,65	< 0,001
[PO ₄ ⁻³]*Tempo	31,77	< 0,001
[PO ₄ ⁻³]*Linhagem	5,52	< 0,001
Tempo*Linhagem	20,55	< 0,001
[PO ₄ ⁻³]*Tempo*Linhagem	5,10	< 0,001

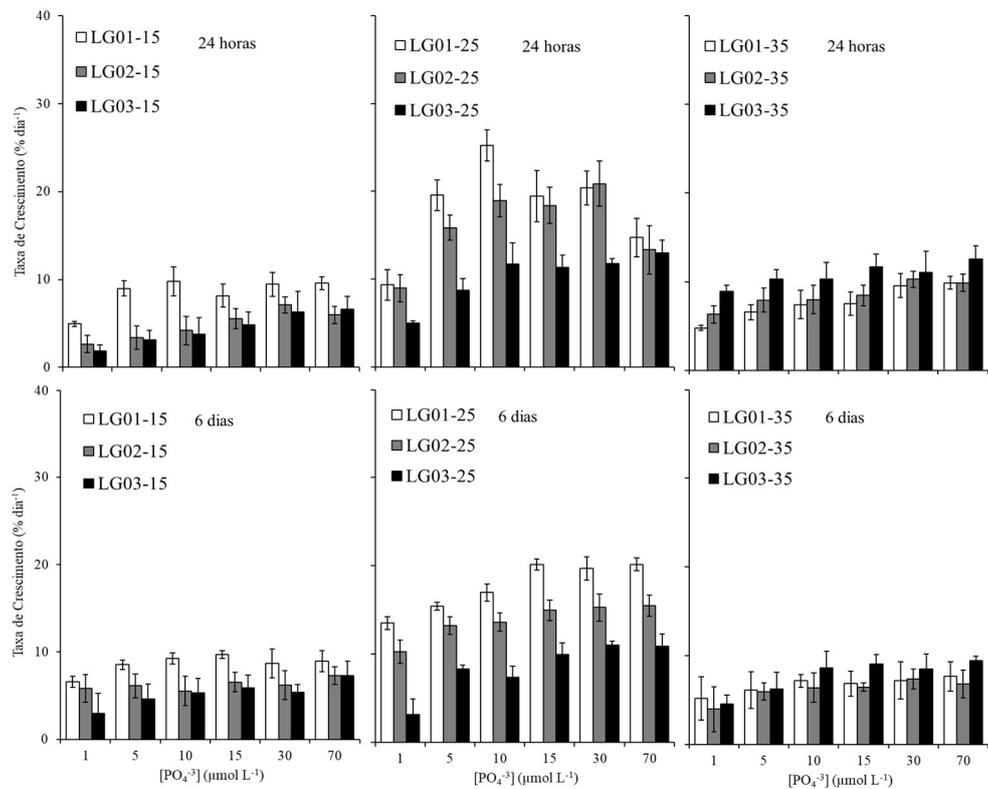


Figura 22 - Taxa de crescimento de diferentes linhagens de talos gametofíticos de *Ulva ohnoi* durante 24 horas e 6 dias de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

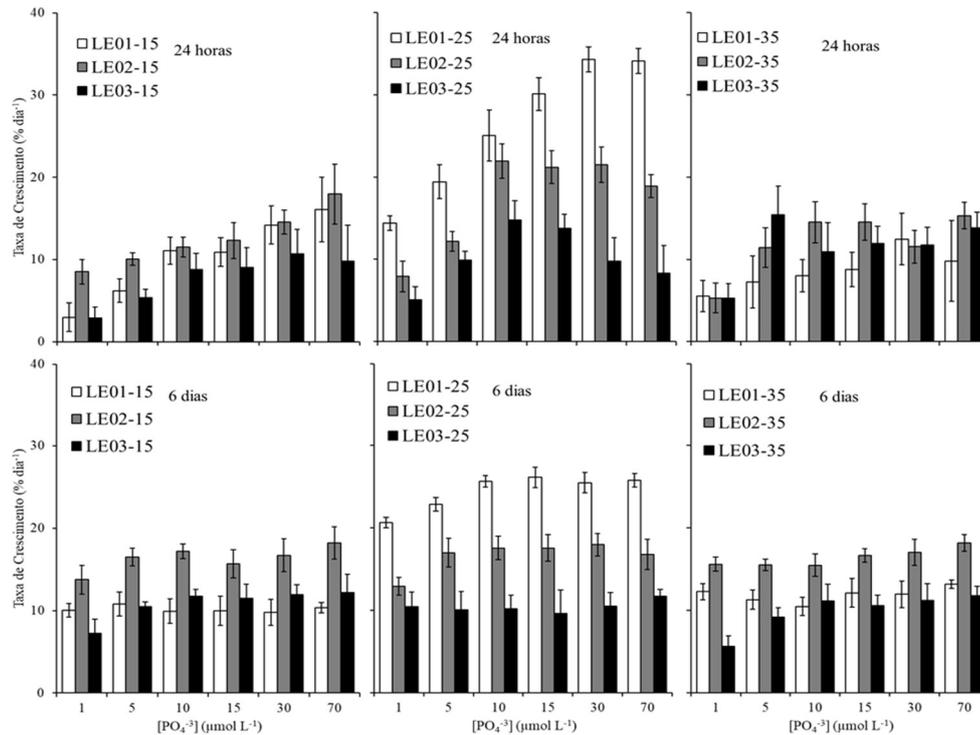


Figura 23 - Taxa de crescimento de diferentes linhagens de talos esporofíticos de *Ulva ohnoi* durante 24 horas e 6 dias de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 μmol L⁻¹ de fósforo. Dados representam médias ± DP. n = 4.

4.3.3. Concentração de Fósforo no Tecido

As concentrações de fósforo no tecido de *U. ohnoi* foram influenciadas pela interação das concentrações utilizadas e pelas linhagens estudadas ($F = 26,71$, $p < 0,001$). Em média, teores de fósforo foram 45,59% maiores nas linhagens esporofíticas em relação as gametofíticas. Os maiores valores foram encontrados nas linhagens esporofíticas com salinidade 25 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado ao meio (Figura 24). A linhagem LE01-25 apresentou maior porcentagem de fósforo na biomassa, 0,87%, seguida por LE02-25 (0,73%) e LE03-25 (0,52%). Por outro lado, nas linhagens gametofíticas os maiores valores foram encontrados em LG01-25 (0,41%), seguida por LG03-25 (0,35%) e LG02-25 (0,17%) (Figura 24).

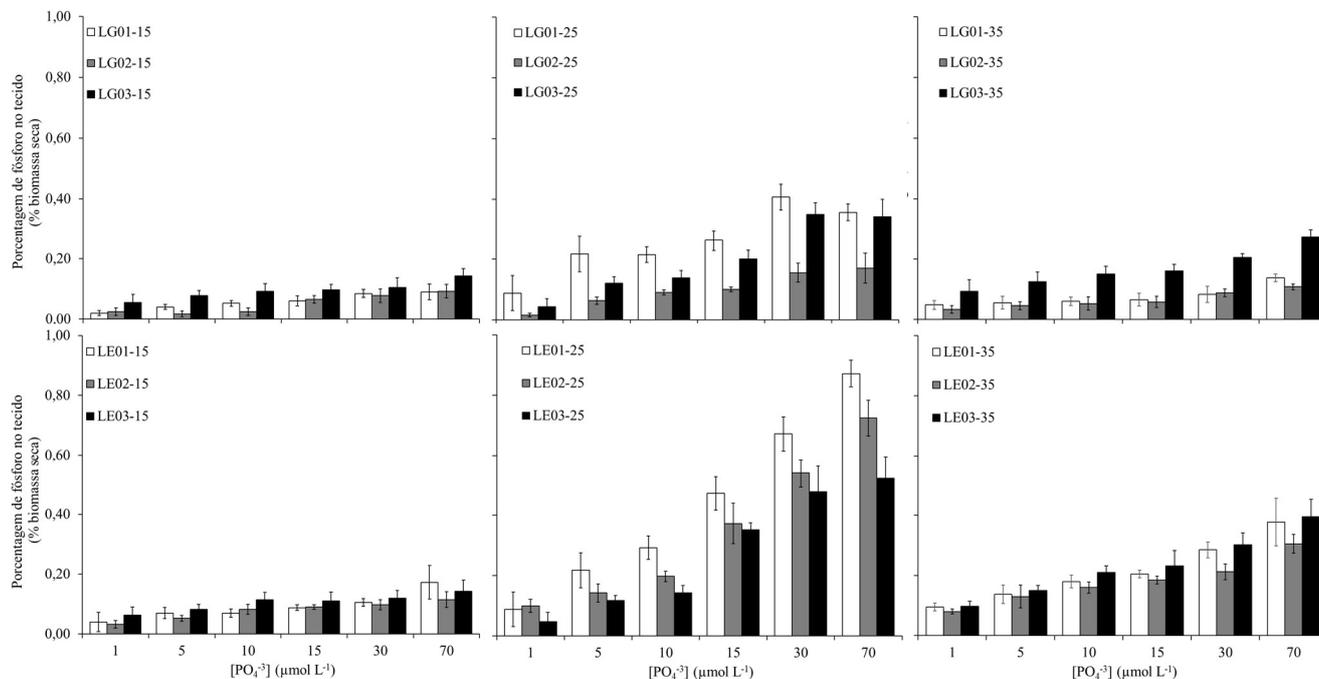


Figura 24 - Concentração de fósforo no tecido (%) de diferentes linhagens de talos gametofíticos e esporofíticos de *Ulva ohnoi* durante 1440 min de incubação nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo. Dados representam médias \pm DP. n = 4.

4.4. Discussão

As linhagens de *U. ohnoi* selecionadas neste trabalho apresentaram heterogeneidade de respostas em relação aos estádios de ciclo de vida e condições de salinidade que foram submetidas desde a liberação dos esporos e gametas. As taxas de eficiência de absorção permaneceram acima de 60% em pelo menos uma concentração de fósforo utilizada em todas as linhagens. Para linhagens gametofíticas, essa eficiência de absorção foi encontrada, principalmente, nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, embora para LG01-25 e LG02-25 a eficiência de absorção foi de $82,80 \pm 6,57\%$ e $62,68 \pm 10,35\%$, respectivamente, para a concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, nas maiores concentrações utilizadas, a eficiência de absorção do fósforo reduziu consideravelmente, alcançando o máximo de $28,10 \pm 3,64\%$ em LG01-25 na concentração de 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo adicionado ao meio. Para linhagens esporofíticas, a eficiência foi superior a 90% para LE01-25, 80% para LE02-25 e 70% para LE03-25 quando foi adicionado 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Apesar de que a eficiência de absorção possa ser influenciada por diversos fatores (ex. condições de cultivo, idade do talo, iluminação e agitação), nossos resultados, no geral, apresentaram valores comparáveis ou maiores que as taxas de eficiência de absorção encontradas para outras espécies do gênero *Ulva* e outras espécies utilizadas para biorremediação em estudos de laboratórios ou ao ar livre, por exemplo, *U. clathrata* (50%, Copertino et al., 2009), *U. rotundata* (96,2%, Hernandez et al., 2002), *U. intestinalis* (citada como *Enteromorpha intestinalis*, 99,6%, Hernandez et al., 2002), *U. lactuca* (50%, Tsagkamilis et al., 2010 e 14,4% Tremblay-Gratton et al., 2018), *Kappaphycus alvarezii* (26,76%, Hayashi et al., 2008b), *Gracilaria gracilis* (98,0%, Hernandez et al., 2002) e *Gracilaria chilensis* (53,9% Buschmann et al., 1996).

Os parâmetros cinéticos da absorção de fósforo são importantes ferramentas para auxiliar na escolha de espécies e/ou linhagens com fins de biorremediação (Luo et al., 2012). Neste ponto, observamos que as linhagens obtidas apresentaram diferentes velocidades de absorção (V) de fósforo com maiores valores para linhagens esporofíticas mantidas em salinidade 25, especialmente LE01-25 que apresentou maior valor nos primeiros 15 minutos de incubação e manteve o padrão até 60 minutos. Resultados semelhantes também foram obtidos na velocidade máxima (V_{max}), onde LE03-25 apresentou velocidade de $76,54 \pm 1,95 \mu\text{mol g}^{-1}$ (biomassa seca) h^{-1} , seguido por LE01-25 com $70,81 \pm 2,67 \mu\text{mol g}^{-1}$ biomassa seca h^{-1} nos primeiros 15 minutos de incubação, indicando alta

habilidade destas linhagens em absorver fósforo em altas concentrações. Estes valores reduziram quando calculados em relação ao tempo máximo utilizado para a curva cinética (1440 minutos). Este fato pode ser explicado pela alta concentração de fósforo utilizada neste experimento e uma rápida absorção inicial que resultaram em declínio em V após os primeiros 60 minutos e em V_{max} após 1440 minutos indicando possível saturação. Outra possível explicação é a remoção quase total ou total do fósforo do meio, que ocorreu em algumas concentrações e linhagens, o que provocaria redução em V e V_{max} em função da falta do nutriente. Estas explicações são apoiadas pelos altos valores de K_m apresentados aos 15 e 1440 minutos, indicando que a alta concentração estaria ativando um sistema de baixa afinidade ao fósforo devido as altas concentrações externas e internas de fósforo (Lobban e Harrison, 1994). O contrário foi observado por Hernandez et al., (2002), onde baixos valores de V_{max} e K_m foram registrados para *U. rotundata* ($V_{max} = 2.86 \pm 1.01 \mu\text{mol g}^{-1}$ (biomassa seca) h^{-1} e $K_m = 0.45 \pm 0.83 \mu\text{M}$) e *U. intestinalis* (citada como *Enteromorpha intestinalis*) ($V_{max} = 2,64 \pm 0.89 \mu\text{mol g}^{-1}$ (biomassa seca) h^{-1} e $K_m = 0.63 \pm 0.39 \mu\text{M}$) quando cultivadas em baixa concentração de fósforo no meio ($0.8 \mu\text{mol l}^{-1}$). A relação V_{max}/K_m apresentou, em média, valores mais baixos em linhagens gametofíticas, com menores valores para LG01-35 e LG02-15. Estes resultados indicam que as linhagens gametofíticas teriam vantagens competitivas e uma maior afinidade ao fósforo quando utilizada em concentrações menores de fósforo. Os resultados obtidos por Luo et al., (2012) para *U. prolifera* (2,71) e *U. linza* (2,35) são semelhantes aos encontrados para linhagens esporofíticas de *U. ohnoi* neste trabalho, enquanto, em algumas linhagens gametofíticas, estes valores podem ser 50% menores. Desta forma, os resultados obtidos pela cinética de absorção do fósforo evidenciam o caráter oportunista de *U. ohnoi* e demonstra as diferenças entre estádios do ciclo de vida e variações dentro dos próprios estádios, tornando este tipo de estudo uma ferramenta para escolha de linhagens intraespecíficas com mais habilidades na remoção de fósforo.

Como as taxas de crescimento são determinadas, especialmente, pelas taxas de absorção de nutrientes (Ale et al., 2011), nossos resultados com enriquecimento de fósforo apresentaram aumento nas TCs de *U. ohnoi*. As TCs foram relativamente altas para todas as linhagens e concentrações de fósforo utilizadas, tornando-se maiores com o aumento das concentrações em grande parte das linhagens. Foi registrado TC de 34,31 e 34,13% dia^{-1} para LE01-25 quando incubada por 24 horas nas concentrações de 30 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fósforo, respectivamente. Este valor

foi 26,47% maior que o valor mais alto de TC encontrada nas linhagens gametofíticas (LG01-25, 25,23% dia⁻¹) em 24 horas de incubação. Após 6 dias de incubação sem adição de nutrientes, foi observado redução nas TCs; entretanto, ainda são consideradas altas, especialmente as TCs das linhagens cultivadas em salinidade 25 (LG01-25, 20,17% dia⁻¹; LE01-25, 26,11% dia⁻¹). Isto demonstra que algumas linhagens possuem melhor habilidade em armazenar internamente o fósforo e nitrogênio nos primeiros minutos de exposição, sendo capazes de crescer por vários dias sem suprimentos adicionais. Estes resultados são compatíveis ou superiores aos encontrados em outras espécies de *Ulva* em experimentos relacionando nutrientes e TC, exemplo *U. prolifera* (16.9% dia⁻¹, Luo et al., 2012), *U. linza* (11.6% dia⁻¹, Luo et al., 2012), *U. clathrata* (30% dia⁻¹, Copertino et al., 2009), *U. fenestrata* (32% dia⁻¹, Bjornsater e Wheeler, 1990) e *U. intestinalis* (18% dia⁻¹, Bjornsater e Wheeler, 1990).

A eficiência de remoção do fósforo do meio e o acúmulo no tecido foi validada com os dados de concentração de fósforo no tecido de *U. ohnoi* após 24 horas incubadas nas diferentes concentrações. Variações de conteúdo de fósforo na biomassa foram encontrados nos estádios do ciclo de vida, bem como dentro das linhagens do mesmo estágio do ciclo de vida. Maiores porcentagens de fósforo no tecido foram encontradas nas linhagens que apresentaram maior eficiência de remoção, velocidades de absorção e taxas de crescimento. Este fato demonstra a importância de estudos direcionados para melhorar as linhagens utilizadas em programas de biorremediação e/ou produção de biomassa, levando-se em consideração as possíveis diferenças genotípicas entre elas, assim como a seleção por efeito de estressores abióticos. Quando comparado com dados da literatura, observa-se que *U. ohnoi* apresentou, em algumas linhagens selecionadas neste estudo, valores superiores ao encontrado; por exemplo, em *U. reticulata* (0.07 ± 0.01 %, Buapet et al., 2008), *U. fenestrata* (0,51 ± 0,07% e *U. intestinalis* (citada como *Enteromorpha intestinalis*) (0,56 ± 0,10% (Bjornsater e Wheeler, 1990).

Diferenças entre linhagens provenientes de diferentes populações de *U. ohnoi* já haviam sido reportadas por Lawton et al. (2013). Os autores encontraram respostas antagônicas entre as populações quando expostas a diferentes temperaturas. Isso ocorre, possivelmente, por existir considerável variação genotípica em indivíduos de populações diferentes ou, até mesmo, na mesma população da espécie (Innes, 1988, 1984). Esta variação é ainda mais expressiva em espécies que ocupam áreas marinhas litorâneas e estuarinas (Innes, 1984). Portanto, observamos no capítulo 3 desta Tese e neste capítulo que, em *U. ohnoi*, a salinidade e aumento nas concentrações de fósforo são mecanismo de gatilho para indução e

liberação de células reprodutivas. A liberação ocorre em grande quantidade e, possivelmente, contendo grande variabilidade genética e células reprodutivas tolerantes as novas condições experimentais. Aqui neste capítulo demonstramos, também, que esses novos indivíduos respondem de forma diferente às concentrações de fósforo utilizadas, demonstrando, de certa forma, a possibilidade de seleção de linhagens que melhor se adequem às condições desejadas para um programa de biorremediação e produção de biomassa.

4.5. Conclusão

A seleção de linhagens adaptadas à salinidade reduzida e com alta eficiência de absorção de fósforo utilizando células reprodutivas de *U. ohnoi* foi investigada. Respostas distintas às condições impostas foram observadas nas linhagens, inclusive linhagens do mesmo estágio do ciclo de vida e condição imposta. No geral, os melhores resultados foram encontrados para as linhagens LE01-25 e LE02-25. Entretanto, nossos resultados vão além disso e demonstram a possibilidade de seleção de linhagens, por meio de células reprodutivas, para obter algas adaptadas às condições desejadas de salinidade com uma boa eficiência e velocidade de absorção de fósforo, resultando em produção de biomassa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram realizadas pesquisas investigando o potencial de uso da espécie de macroalga verde *Ulva ohnoi*, recentemente registrada no Brasil, para fins de remediação de poluentes e produção de biomassa. Assim, avaliamos, com utilização de modernas técnicas, os efeitos da interação de fatores abióticos (temperatura e salinidade) na fisiologia desta espécie, investigando aspectos da fotobiologia para melhor entender os impactos destes fatores em sistemas primordiais para o organismo, que de certa forma, irão influenciar nas taxas de crescimento e na produção da biomassa. Da mesma forma, quando introduzimos um metal traço ao estudo, podemos observar, com mais clareza, como ocorre os efeitos e as respostas desta espécie frente as interações dos fatores. Estes resultados indicam que existe a possibilidade de uso da espécie para a remoção do metal cádmio de zonas marinhas ou estuarinas impactadas por este metal, assim como em efluentes que apresentam condições de salinidade e temperatura próximos aos testados aqui.

Buscando melhorar técnicas de propagação existentes para o gênero *Ulva*, estudamos a influência da salinidade e do fósforo em questões relacionadas a reprodução de *U. ohnoi*. O entendimento da manipulação de fatores que controlem o ciclo reprodutivo é de fundamental importância para programas de pesquisa que tenham como objetivo o uso desta espécie, ou mesmo deste gênero, para projetos de biorremediação e/ou produção de biomassa. Os dados obtidos aqui, nos ajudam a entender também os possíveis mecanismos usados pela espécie para se aclimatar às novas condições, visto que plântulas obtidas de células reprodutivas liberadas em diferentes condições de salinidade, demonstraram ótimas taxas de crescimento, diferentemente das progenitoras. Observamos que, ao selecionar estas linhagens podemos obter indivíduos com alta capacidade para remoção de fósforo e produção de biomassa. Estes resultados dão a possibilidade de novos estudos buscando os limites de aclimatação de novas gerações, e desta forma, melhorando características desejáveis para programas de biorremediação de poluentes, como resistência e alto crescimento.

Por outro lado, embora pouco discutido nos capítulos, sabe-se que esta espécie provoca florações em zonas eutrofizadas, principalmente na costa do Japão. Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores e condições que desencadeiam este processo, apenas, especula-se, que variações ambientais podem promover a produção de micropropágulos que

permanecem flutuantes. Demonstramos aqui que a espécie responde muito bem as variações da salinidade, transformando quase 100% do talo em estruturas reprodutivas e liberando uma considerável quantidade de células que germinaram e geraram novas algas. Desta forma, estes dados podem auxiliar no entendimento destes processos e estimular novos estudos com objetivo de mitigar os danos causados por estas florações.

Em resumo, o presente estudo demonstrou a possibilidade de utilizar *U. ohnoi* para absorver poluentes em diversas condições e combinações. Do mesmo modo, demonstramos técnicas para obtenção de plântulas para serem utilizadas em processos de semeadura ou outros sistemas de cultura. Assim como, a seleção de linhagens induzindo novas condições promoveu a otimização do crescimento e absorção de poluentes. Estas descobertas podem se tornar contribuições tangíveis para futuros programas de biorremediação e produção de biomassa utilizando esta espécie ou outras do mesmo gênero.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, S.C., 2009. Factors affecting spore germination in algae - review. *Folia Microbiol. (Praha)*. 54, 273–302.
<https://doi.org/10.1007/s12223-009-0047-0>
- Al-Hafedh, Y.S., Alam, A., Buschmann, A.H., 2015. Bioremediation potential, growth and biomass yield of the green seaweed, *Ulva lactuca* in an integrated marine aquaculture system at the Red Sea coast of Saudi Arabia at different stocking densities and effluent flow rates. *Rev. Aquac.* 7, 161–171.
<https://doi.org/10.1111/raq.12060>
- 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>
- Alencar, J.R. de, Junior, P.A.H., Celino, J.J., 2010. Cultivo de Camarão Branco *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) com a Macro- alga *Ulva Lacuata* Linneaus (Chlorophyta) no Tratamento de Efluentes em Sistema Fechado de Recirculação. *Rev. Biol. E Ciências Da Terra* 10
- Alveal, K., Romo, H., Werlinger, C., Oliveira, E.C., 1997. Mass cultivation of the agar-producing alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) from spores. *Aquaculture* 148, 77–83.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01415-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01415-9)
- Amado Filho, G.M., Karez, C.S., Andrade, L.R., Yoneshigue-Valentin, Y., Pfeiffer, W.C., 1997. Effects on growth and accumulation of zinc in six seaweed species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 223–228. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1541>
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2015. Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 51, 536–545.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12300>
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2014. Variation in amino acid content and its relationship to nitrogen content and growth rate in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 50, 216–226.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12154>
- Araújo, L., Gonçalves, A.E., Stadnik, M.J., 2014. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica* 42, 631–640.

- <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0404-7>
- Araujo, L., Stadnik, M.J., 2013. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases - doi: 10.4025/actasciagron.v35i3.16174. *Acta Sci. Agron.* 35, 287–293. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.16174>
- Areco, M.M., Hanela, S., Duran, J., dos Santos Afonso, M., 2012. Biosorption of Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II) by dead biomasses of green alga *Ulva lactuca* and the development of a sustainable matrix for adsorption implementation. *J. Hazard. Mater.* 213–214, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.073>
- Arnold, K.E., Murray, S.N., 1980. Relationships between irradiance and photosynthesis for marine benthic green algae (Chlorophyta) of differing morphologies. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 43, 183–192. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(80\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0022-0981(80)90025-8)
- Aspila, K.I., Agemian, H., Chau, A.S.Y., 1976. A semi-automated method for the determination of inorganic, organic and total phosphate in sediments. *Analyst* 101, 187. <https://doi.org/10.1039/an9760100187>
- Babich, H., Stotzky, G., 1978. Effects of Cadmium on the Biota: Influence of Environmental Factors, in: *Advances in Applied Microbiology*. pp. 55–117. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70065-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70065-0)
- Barwick, M., Maher, W., 2003. Biotransference and biomagnification of selenium copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from Lake Macquarie Estuary, NSW, Australia. *Mar. Environ. Res.* 56, 471–502. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00028-X)
- Bastos, E., Schneider, M., de Quadros, D.P.C., Welz, B., Batista, M.B., Horta, P.A., Rörig, L.R., Barufi, J.B., 2019. Phytoremediation potential of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): Influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.130>
- Batista, M.B., Anderson, A.B., Sanches, P.F., Polito, P.S., Silveira, T.C.L., Velez-Rubio, G.M., Scarabino, F., Camacho, O., Schmitz, C., Martinez, A., Ortega, L., Fabiano, G., Rothman, M.D., Liu, G., Ojeda, J., Mansilla, A., Barreto, L.M., Assis, J., Serrão, E.A., Santos, R., Horta, P.A., 2018. Kelps' long-distance dispersal: Role of Ecological/Oceanographic processes and implications to marine forest conservation. *Diversity* 10.

- <https://doi.org/10.3390/d10010011>
- Baumann, H.A., Morrison, L., Stengel, D.B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.10.010>
- Bertrand, M., Poirier, I., 2005. Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43, 345–353. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0058-2>
- Bjornsater, B.R., Wheeler, P.A., 1990. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth and tissue composition of *Ulva fenestrata* and *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 26, 603–611. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00603.x>
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R., 2010. Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 2897–912. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>
- Bouard, D., Sandrin, V., Boson, B., Nègre, D., Thomas, G., Granier, C., Cosset, F.-L., 2007. An Acidic Cluster of the Cytoplasmic Tail of the RD114 Virus Glycoprotein Controls Assembly of Retroviral Envelopes. *Traffic* 8, 835–847. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00581.x>
- Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2010. Is Global Warming Involved in the Success of Seaweed Introductions in the Mediterranean Sea?, in: Seckbach, J., Einav, R., Israel, A. (Eds.), *Seaweeds and Their Role in Globally Changing Environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer, Dordrecht, pp. 31–50. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8569-6_3
- Bouzon, Z.L., Ferreira, E.C., dos Santos, R., Scherner, F., Horta, P.A., Maraschin, M., Schmidt, É.C., 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. *Protoplasma* 249, 637–650. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0301-6>
- Brito, G.B., de Souza, T.L., Bressy, F.C., Moura, C.W.N., Korn, M.G.A., 2012. Levels and spatial distribution of trace elements in macroalgae species from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2238–2244. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.022>
- Brito, L.O., Arantes, R., Magnotti, C., Derner, R., Pchara, F., Olivera, A., Vinatea, L., 2014. Water quality and growth of Pacific white

- shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. *Aquac. Int.* 22, 497–508. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9659-0>
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C., Jensen, P.D., 2011. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresour. Technol.* 102, 2595–2604. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.010>
- Buapet, P., Hiranpan, R., Ritchie, R.J., Prathep, A., 2008. Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. *ScienceAsia* 34, 245–252. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.245>
- Buchholz, C.M., Krause, G., Buck, B.H., 2012. *Seaweed Biology, Ecological Studies*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9>
- Bulboa, C., Macchiavello, J., Oliveira, E., Véliz, K., 2008. Growth rate differences between four Chilean populations of edible seaweed *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Aquac. Res.* 39, 1550–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02028.x>
- Bulboa, C.R., Macchiavello, J.E., Veliz, K., Macaya, E.C., Oliveira, E.C., 2007. In vitro recruitment of *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. on gametophytic and tetrasporophytic thalli of four populations of *Chondracanthus chamissoi* from Chile. *J. Appl. Phycol.* 19, 247–254. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9130-y>
- Buschmann, A.H., Troell, M., Kautsky, N., Kautsky, L., 1996. Integrated tank cultivation of salmonids and *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326–327, 75–82. <https://doi.org/10.1007/BF00047789>
- Carl, C., De Nys, R., Lawton, R.J., Paul, N.A., 2014a. Methods for the induction of reproduction in a tropical species of filamentous *Ulva*. *PLoS One* 9, 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097396>
- Carl, C., de Nys, R., Paul, N.A., 2014b. The Seeding and Cultivation of a Tropical Species of Filamentous *Ulva* for Algal Biomass Production. *PLoS One* 9, e98700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098700>
- Caruso, A., Cosentino, C., Tranchina, L., Brai, M., 2011. Response of benthic foraminifera to heavy metal contamination in marine sediments (Sicilian coasts, Mediterranean Sea). *Chem. Ecol.* 27,

- 9–30. <https://doi.org/10.1080/02757540.2010.529076>
- Carvalho, C.E. V., Lacerda, L.D., Gomes, M.P., 1991. Heavy metal contamination of the marine biota along the Rio de Janeiro coast, SE-Brazil. *Water. Air. Soil Pollut.* 57–58, 645–653. <https://doi.org/10.1007/BF00282928>
- Castelar, B., Reis, R.P., dos Santos Calheiros, A.C., 2014. *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: recruitment, growth, and ulvan yield. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0329-z>
- Celis-Plá, P.S.M., Brown, M.T., Santillán-Sarmiento, A., Korbee, N., Sáez, C.A., Figueroa, F.L., 2018. Ecophysiological and metabolic responses to interactive exposure to nutrients and copper excess in the brown macroalga *Cystoseira tamariscifolia*. *Mar. Pollut. Bull.* 128, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.005>
- Chan, K.-Y., Ting, Y.F., Chiu, Y.M., Wong, P.K., 1979. The comparison of sewage effluent and sludge extract in cultivating *Linn.* *Chemosphere* 8, 205–216. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(79\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(79)90071-7)
- Chapman, V.J., Chapman, D.J., 1980. *Seaweeds and their Uses*, Igarss 2014. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5806-7>
- Chávez-Sánchez, T., Piñón-Gimate, A., Serviere-Zaragoza, E., López-Bautista, J.M., Casas-Valdez, M., 2018. *Ulva* blooms in the southwestern Gulf of California: Reproduction and biomass. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 200, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.11.007>
- Chen, L.C.M., Morgan, K., Simpson, F.J., 1982. Selection of Tetrasporophytes of Irish Moss. *Bot. Mar.* 25, 35–39. <https://doi.org/10.1515/botm.1982.25.1.35>
- Cheney, D., Rudolph, B., Wang, L.Z., Metz, B., Watson, K., Roberts, K., Levine, I., 1998. *New Developments in Marine Biotechnology*, New Developments in Marine Biotechnology. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5983-9>
- Chiellini, F., Morelli, A., 2011. Ulvan: A Versatile Platform of Biomaterials from Renewable Resources, in: *Biomaterials - Physics and Chemistry*. InTech, pp. 75–98. <https://doi.org/10.5772/24901>
- Choi, T.-S., Kang, E.-J., Kim, J.-H., Kim, K.-Y., 2010. Effect of salinity on growth and nutrient uptake of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) from an eelgrass bed. *ALGAE* 25, 17–26. <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.1.017>

- Cohen, I., Neori, A., 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents. I. Ammonia Uptake Kinetics and Nitrogen Content. Bot. Mar. 34, 104–113. <https://doi.org/10.1515/botm.1991.34.6.475>
- Collén, J., Pinto, E., Pedersén, M., Colepicolo, P., 2003. Induction of Oxidative Stress in the Red Macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by Pollutant Metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 337–342. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0196-0>
- CONAMA, 2005. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005 [WWW Document]. CONAMA (Conselho Nac. do Meio Ambient. URL <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (accessed 6.28.18).
- Connan, S., Stengel, D.B., 2011. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. Interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. Aquat. Toxicol. 104, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.015>
- Copertino, M.D.S., Tormena, T., Seeliger, U., 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Chlorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. J. Appl. Phycol. 21, 31–45. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9357-x>
- Costa, Giulia B., Simioni, C., Pereira, D.T., Ramlov, F., Maraschin, M., Chow, F., Horta, P.A., Bouzon, Z.L., Schmidt, É.C., 2016. The brown seaweed *Sargassum cymosum*: changes in metabolism and cellular organization after long-term exposure to cadmium. Protoplasma 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0992-9>
- Cui, J., Shi, J., Zhang, J., Wang, L., Fan, S., Xu, Z., Huo, Y., Zhou, Q., Lu, Y., He, P., 2018. Rapid expansion of *Ulva* blooms in the Yellow Sea, China through sexual reproduction and vegetative growth. Mar. Pollut. Bull. 130, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.036>
- Dan, A., Hiraoka, M., Ohno, M., Critchley, A.T., 2002. Observations on the effect of salinity and photon fluence rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh (Chlorophyta, Ulvales). Fish. Sci. 68, 1182–1188. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00553.x>
- Dawes, C.J., Orduña-Rojas, J., Robledo, D., 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. J. Appl. Phycol. 10, 419–425. <https://doi.org/10.1023/A:1008021613399>
- Delgado, D.Z., de Freitas, M.B., Stadnik, M.J., 2013. Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular

- leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). Crop Prot. 47, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.01.003>
- Dillehay, T.D., Ramírez, C., Pino, M., Collins, M.B., Rossen, J., Pino-Navarro, J.D., 2008. Monte Verde: Seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. Science (80). 320, 784–786. <https://doi.org/10.1126/science.1156533>
- Drude L., L., Laneuville Teixeira, V., Davée Guimarães, J.R., 1985. Seasonal Variation of Heavy Metals in Seaweeds from Conceição de Jacareí (R. J.), Brazil. Bot. Mar. 28, 339–343. <https://doi.org/10.1515/botm.1985.28.8.339>
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., Egwurugwu, J.N., 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. Int J Phys Sci 2, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.09.146>
- Edwards, P., 1970. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Port Aransas, Texas.
- Egan, S., James, S., Holmström, C., Kjelleberg, S., 2001. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. FEMS Microbiol. Ecol. 35, 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00112-4)
- Eggert, A., 2012. Seaweed Responses to Temperature. Seaweed Biol. 47–66. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9>
- Elekwachi, C.O., Andresen, J., Hodgman, T.C., 2014. Global Use of Bioremediation Technologies for Decontamination of Ecosystems Bioremediation & Biodegradation. J. Bioremediation Biodegrad. 5, 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000225>
- Fan, X., Xu, D., Wang, Y., Zhang, X., Cao, S., Mou, S., Ye, N., 2014. The effect of nutrient concentrations, nutrient ratios and temperature on photosynthesis and nutrient uptake by *Ulva prolifera*: implications for the explosion in green tides. J. Appl. Phycol. 26, 537–544. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0054-z>
- FAO, 2019. Global Aquaculture Production. Online query [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en> (accessed 3.22.19).
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.50-5350>
- Farooq, U., Kozinski, J.A., Khan, M.A., Athar, M., 2010. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents - A review of the recent literature. Bioresour. Technol. 101, 5043–5053. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.030>
- Favero, N., Cattalini, F., Bertaggia, D., Albergoni, V., 1996. Metal

- accumulation in a biological indicator (*Ulva rigida*) from the lagoon of Venice (Italy). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 9–18. <https://doi.org/10.1007/BF00203902>
- Felix, M.R. de L., Osorio, L.K.P., Ouriques, L.C., Farias-Soares, F.L., Steiner, N., Kreuzsch, M., Pereira, D.T., Simioni, C., Costa, G.B., Horta, P.A., Chow, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z.L., Schmidt, É.C., 2014. The Effect of Cadmium Under Different Salinity Conditions on the Cellular Architecture and Metabolism in the Red Alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales). Microsc. Microanal. 20, 1411–1424. <https://doi.org/10.1017/S1431927614012768>
- Ferreira, A.C., Costa, A.C.S., Korn, M. das G.A., 2004. Preliminary evaluation of the cadmium concentration in seawater of the Salvador City, Brazil. Microchem. J. 78, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2004.03.014>
- Finlay, J.A., Fletcher, B.R., Callow, M.E., Callow, J.A., 2008. Effect of background colour on growth and adhesion strength of *Ulva* sporelings. Biofouling 24, 219–225. <https://doi.org/10.1080/08927010802040693>
- Fjeld, A., LØVLIE, A., 1976. Genetics of multicellular marine algae, in: Lewin, R.A. (Ed.), The Genetics of Algae. Oxford: Blackwell Scientific, pp. 219–235
- Flagella, M.M., Andreakis, N., Hiraoka, M., Verlaque, M., Buia, M.C., 2010. Identification of cryptic *Ulva* species (Chlorophyta, Ulvales) transported by ballast water. J. Biol. Res. 13, 47–57
- Floreto, E.A.T., Hirata, H., Ando, S., Yamasaki, S., 1993. Effects of Temperature, Light Intensity, Salinity and Source of Nitrogen on the Growth, Total Lipid and Fatty Acid Composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). Bot. Mar. 36, 149–158. <https://doi.org/10.1515/botm.1993.36.2.149>
- Fonseca, A., Braga, E.S., 2006. Temporal Dynamic of the Dissolved Nutrients and the Eutrophication Processes in a Southern Brazilian Coastal Lagoon, Conceição Lagoon Temporal Dynamic of the Dissolved Nutrients and the Eutrophication Processes in a Southern. J. Coast. Res. 1229–1233
- Fort, A., Lebrault, M., Allaire, M., Esteves-Ferreira, A.A., McHale, M., Lopez, F., Farinas-Franco, J.M., Alseekh, S., Fernie, A.R., Sulpice, R., 2019. Extensive variations in diurnal growth patterns and metabolism amongst *Ulva* spp strains. Plant Physiol. pp.01513.2018. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01513>
- Fortes, M.D., Lüning, K., 1980. Growth rates of North Sea macroalgae

- in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 34, 15–29.
<https://doi.org/10.1007/BF01983538>
- Freitas, M.B. de, Medugno, C.C., Schons, R.F., Stadnik, M.J., 2011. Eficiência de formulações de ulvana em induzir resistência em *Phaseolus vulgaris* contra *Colletotrichum lindemuthianum*. *Trop. Plant Pathol.* 36, 45–49.
- Freitas, M.B., Stadnik, M.J., 2015. Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 90, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.03.002>
- Gao, G., 2016. Developing systems for the commercial culture of *Ulva* species in the UK. Newcastle University.
- Gao, G., Clare, A.S., Rose, C., Caldwell, G.S., 2018. *Ulva rigida* in the future ocean: potential for carbon capture, bioremediation and biomethane production. *GCB Bioenergy* 10, 39–51.
<https://doi.org/10.1111/gcbb.12465>
- Gao, G., Clare, A.S., Rose, C., Caldwell, G.S., 2017a. Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios. *Mar. Pollut. Bull.* 114, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.003>
- Gao, G., Clare, A.S., Rose, C., Caldwell, G.S., 2017b. Reproductive sterility increases the capacity to exploit the green seaweed *Ulva rigida* for commercial applications. *Algal Res.* 24, 64–71.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.008>
- Gao, G., Clare, A.S., Rose, C., Caldwell, G.S., 2017c. Non-cryogenic preservation of thalli, germlings, and gametes of the green seaweed *Ulva rigida*. *Aquaculture* 473, 246–250.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.012>
- Gao, S., Chen, X., Yi, Q., Wang, G., Pan, G., Lin, A., Peng, G., 2010. A Strategy for the Proliferation of *Ulva prolifera*, Main Causative Species of Green Tides, with Formation of Sporangia by Fragmentation. *PLoS One* 5, e8571.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008571>
- Ghnaya, T., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Ghorbel, M.H., Abdelly, C., 2007. Effects of Cd²⁺ on K⁺, Ca²⁺ and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: Consequences on growth. *Chemosphere* 67, 72–79.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.064>
- Ghoneim, M.M., El-Desoky, H.S., El-Moselhy, K.M., Amer, A., Abou

- El-Naga, E.H., Mohamedein, L.I., Al-Prol, A.E., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution using marine green algae, *Ulva lactuca*. Egypt. J. Aquat. Res. 40, 235–242.
<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.08.005>
- Gil, M.N., Torres, A.I., Esteves, J.L., 2005. Uptake of sewage derived nitrogen by *Ulva rigida* (Chlorophyceae) in Bahía Nueva (Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina). Hydrobiologia 532, 39–43.
<https://doi.org/10.1007/s10750-004-8770-7>
- Glasson, C.R.K., Sims, I.M., Carnachan, S.M., de Nys, R., Magnusson, M., 2017. A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. Algal Res. 27, 383–391.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.001>
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. Methods of seawater analysis, 2nd ed. Weinheim, New York.
[https://doi.org/10.1016/0304-4203\(78\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0304-4203(78)90045-2)
- Grzymiski, J., Johnsen, G., Sakshaug, E., 1997. The significance of intracellular self-shading on the biooptical properties of brown, red, and green macroalgae. J. Phycol. 33, 408–414.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00408.x>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2019. AlgaeBase [WWW Document]. Natl. Univ. Ireland, Galway. URL <http://www.algaebase.org> (accessed 2.10.19).
- Gustavs, L., Schumann, R., Eggert, A., Karsten, U., 2009. In vivo growth fluorometry: Accuracy and limits of microalgal growth rate measurements in ecophysiological investigations. Aquat. Microb. Ecol. 55, 95–104. <https://doi.org/10.3354/ame01291>
- Guttman, L., Boxman, S.E., Barkan, R., Neori, A., Shpigel, M., 2018. Combinations of *Ulva* and periphyton as biofilters for both ammonia and nitrate in mariculture fishpond effluents. Algal Res. 34, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.002>
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1–11.
<https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.1>
- Han, T., Choi, G.-W., 2005. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). Aquat. Toxicol. 75, 202–212.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.003>
- Han, T., Han, Y.-S., Park, C.Y., Jun, Y.S., Kwon, M.J., Kang, S.-H., Brown, M.T., 2008. Spore release by the green alga *Ulva*: A quantitative assay to evaluate aquatic toxicants. Environ. Pollut. 153, 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.09.001>

- Han, T., Kong, J.-A., Han, Y.-S., Kang, S.-H., Häder, D.-P., 2004. UV-a/ blue light-induced reactivation of spore germination in UV-b irradiated *Ulva pertusa* (chlorophyta). *J. Phycol.* 40, 315–322. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03069.x>
- Hannach, G., Santelices, B., 1985. Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of *Indaea* (Rhodophyta, Gigartinales). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 22, 291–303. <https://doi.org/10.3354/meps022291>
- Hashim, M., 2004. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. *Chem. Eng. J.* 97, 249–255. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(03\)00216-X](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(03)00216-X)
- Hayashi, L., Paula, E.J., Chow, F., 2007. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *J. Appl. Phycol.* 19, 393–399. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9135-6>
- Hayashi, L., Yokoya, N.S., Kikuchi, D.M., Oliveira, E.C., 2008a. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *J. Appl. Phycol.* 20, 653–659. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9234-z>
- Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereira, R.T.L., Braga, E.S., Oliveira, E.C., 2008b. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture* 277, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.024>
- Hayden, H.S., Blomster, J., Maggs, C.A., Silva, P.C., Stanhope, M.J., Waaland, J.R., 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.* 38, 277–294. <https://doi.org/10.1080/1364253031000136321>
- Hayden, H.S., Waaland, J.R., 2004. A molecular systematic study of *Ulva* (Ulvaceae, Ulvales) from the northeast Pacific. *Phycologia* 43, 364–382. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-4-364.1>
- Henriques, B., Rocha, L.S., Lopes, C.B., Figueira, P., Monteiro, R.J.R., Duarte, A.C., Pardal, M.A., Pereira, E., 2015. Study on bioaccumulation and biosorption of mercury by living marine macroalgae: Prospecting for a new remediation biotechnology applied to saline waters. *Chem. Eng. J.* 281, 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.013>
- Henriques, B., Lopes, C.B., Figueira, P., Rocha, L.S., Duarte, A.C., Vale, C., Pardal, M.A., Pereira, E., 2017. Bioaccumulation of Hg,

- Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate. *Chemosphere* 171, 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.086>.
- Hernandez, I., Martinez-Aragon, J.F., Tovar, A., Terez-Llorens, J.L., Vergara, J.J., 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by the three species of estuarine macroalgae with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 2. Ammonium. *J. Appl. Phycol.* 14, 375–384. <https://doi.org/10.1023/A:1022134701273>
- Hiraoka, M., Enomoto, S., 1998. The induction of reproductive cell formation of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). *Phycol. Res.* 46, 199–203. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1998.tb00114.x>
- Hiraoka, M., Ohno, M., Kawaguchi, S., Yoshida, G., 2004a. Crossing test among floating *Ulva* thalli forming 'green tide' in Japan. *Hydrobiologia* 512, 239–245. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020332.12641.a2>
- Hiraoka, M., Oka, N., 2008. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new "germling cluster" method. *J. Appl. Phycol.* 20, 97–102. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9186-3>
- Hiraoka, M., Shimada, S., Ohno, M., Serisawa, Y., 2003. Asexual life history by quadriflagellate swimmers of *Ulva spinulosa* (Ulvales, Ulvophyceae). *Phycol. Res.* 51, 29–34. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2003.00290.x>
- Hiraoka, M., Shimada, S., Uenosono, M., Masuda, M., 2004b. A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycol. Res.* 52, 17–29. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2004.tb00311.x>
- Ho, Y.B., 1990. *Ulva lactuca* as bioindicator of metal contamination in intertidal waters in Hong Kong. *Hydrobiologia* 203, 73–81. <https://doi.org/10.1007/BF00005615>
- Howarth, R., Anderson, D., Cloern, J., Elfring, C., Hopkinson, C., Lapointe, B., Malone, T., Marcus, N., McGlathery, K., Sharpley, A., Walker, D., 2000. Nutrient Pollution of Coastal Rivers, Bays, and Seas. *Issues Ecol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1092-8987>
- Hu, S., Tang, C.H., Wu, M., 1996. Cadmium accumulation by several seaweeds. *Sci. Total Environ.* 187, 65–71. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05143-1](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05143-1)
- Huan, L., Su, H.X., Duan, C.X., Gao, S., Xie, X.J., Wang, G.C., 2018. *Ulva prolifera* (Chlorophyta): a suitable material to remove Cd²⁺ from aquatic environments. *Water Environ. J.* 32, 26–33.

- <https://doi.org/10.1111/wej.12286>
- Imchen, T., 2012. Recruitment Potential of a Green Alga *Ulva flexuosa* Wulfen Dark Preserved Zoospore and Its Development. PLoS One 7, e32651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032651>
- Innes, D.J., 1988. Genetic differentiation in the intertidal zone in populations of the alga *Enteromorpha linza* (Ulvales: Chlorophyta). Mar. Biol. 97, 9–16. <https://doi.org/10.1007/BF00391240>
- Innes, D.J., 1984. Genetic differentiation among populations of marine algae. Helgoländer Meeresuntersuchungen 38, 401–417. <https://doi.org/10.1007/BF02027689>
- Jassby, A.D., Platt, T., 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 21, 540–547. <https://doi.org/10.4319/lo.1976.21.4.0540>
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M.-T., Dumas, B., 2010. Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2010/525291>
- Jiang, H., Gao, B., Li, W., Zhu, M., Zheng, C., Zheng, Q., Wang, C., 2013. Physiological and Biochemical Responses of *Ulva prolifera* and *Ulva linza* to Cadmium Stress. Sci. World J. 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/289537>
- Kalita, T.L., Titlyanov, E.A., 2011. The effect of temperature on infradian rhythms of reproduction in *Ulva fenestrata* postels et ruprecht, 1840 (Chlorophyta: Ulvales). Russ. J. Mar. Biol. 37, 52–61. <https://doi.org/10.1134/S106307401101007X>
- Kalita, T.L., Tytlianov, E.A., 2003. Effect of Temperature and Illumination on Growth and Reproduction of the Green Alga *Ulva fenestrata*. Russ. J. Mar. Biol. 29, 316–322. <https://doi.org/10.1023/A:1026361627982>
- Kamer, K., Fong, P., 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) link. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 254, 53–69. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00262-8)
- Kang, K.H., Sui, Z., 2010. Removal of eutrophication factors and heavy metal from a closed cultivation system using the macroalgae, *Gracilaria* sp. (Rhodophyta). Chinese J. Oceanol. Limnol. 28, 1127–1130. <https://doi.org/10.1007/s00343-010-9902-8>

- Karez, C.S., Magalhaes, V.F., Pfeiffer, W.C., Amado Filho, G.M., 1994. Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. *Environ. Pollut.* 83, 351–356. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90157-0)
- Karsten, U., 2012. Seaweed Acclimation to Salinity and Desiccation Stress, in: *Seaweed Biology*. Berlin, Heidelberg, pp. 87–107. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9>
- Kawai, H., Shimada, S., Hanyuda, T., Suzuki, T., Gamagori City Office, G.C.O., 2007. Species Diversity and Seasonal Changes of Dominant *Ulva* Species (Ulvales, Ulvophyceae) in Mikawa Bay, Japan, Deduced from ITS2 rDNA Region Sequences. *ALGAE* 22, 221–228. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2007.22.3.221>
- Kazi, M.A., Kavale, M.G., Singh, V. V., 2016. Morphological and molecular characterization of *Ulva chaugulii* sp. nov., *U. lactuca* and *U. ohnoi* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from India. *Phycologia* 55, 45–54. <https://doi.org/10.2216/15-11.1>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kim, J.-H., Kang, E.J., Park, M.G., Lee, B.-G., Kim, K.Y., 2011. Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea. *J. Appl. Phycol.* 23, 421–432. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9590-y>
- Kirkendale, L., Saunders, G.W., Winberg, P., 2013. A Molecular Survey of *Ulva* (Chlorophyta) in Temperate Australia Reveals Enhanced Levels of Cosmopolitanism. *J. Phycol.* 49, 69–81. <https://doi.org/10.1111/jpy.12016>
- Kirst, C.O., 1989. Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 21–53.
- Kolwalkar, J.P., Sawant, S.S., Dhargalkar, V.K., 2007. Fate of *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen) J. Agardh and its spores in darkness: Implications for ballast water management. *Aquat. Bot.* 86, 86–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.09.014>
- Kondrashov, A.S., Crow, J.F., 1991. Haploidy or diploidy: which is better? *Nature* 351, 314–315. <https://doi.org/10.1038/351314a0>
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa, F.L., Aguilera, J., Karsten, U., 2005. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two

- Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). Mar. Biol. 146, 645–654. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1484-6>
- Kraan, S., Guiry, M.D., 1998. Strain selection in the edible brown seaweed *Alaria esculenta*: Genetic fingerprinting and hybridization studies under laboratory conditions. Mar. Res. Meas. (Operational Program. Fish. 1994-1999) 37
- Kučera, T., Horáková, H., Šonská, A., 2008. Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. Photosynthetica 46, 481–489 <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0083-z>
- Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Anisha, P.A., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2010. Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). BioMetals 23, 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9290-8>
- Lacerda, L.D., Fernandez, M.A., Calazans, C.F., Tanizaki, K.F., 1992. Bioavailability of heavy metals in sediments of two coastal lagoons in Rio de Janeiro, Brazil. Hydrobiologia 228, 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF00006477>
- Lahaye, M., Robic, A., 2007. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. Biomacromolecules 8, 1765–1774. <https://doi.org/10.1021/bm061185q>
- Lanari, M., Copertino, M., 2017. Drift macroalgae in the Patos Lagoon Estuary (southern Brazil): effects of climate, hydrology and wind action on the onset and magnitude of blooms. Mar. Biol. Res. 13, 36–47. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1225957>
- Lane, T.W., Morel, F.M.M., 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 4627–4631 <https://doi.org/10.1073/pnas.090091397>
- Lapointe, B.E., Littler, M.M., Littler, D.S., 1992. Nutrient Availability to Marine Macroalgae in Siliciclastic versus Carbonate-Rich Coastal Waters. Estuaries 15, 75. <https://doi.org/10.2307/1352712>
- Lawton, R.J., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2013. Algal Bioremediation of Waste Waters from Land-Based Aquaculture Using *Ulva*: Selecting Target Species and Strains. PLoS One 8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077344>
- Le Gall, L., Pien, S., Rusig, A.M., 2004. Cultivation of *Palmaria palmata* (Palmariales, Rhodophyta) from isolated spores in semi-controlled conditions. Aquaculture 229, 181–191 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00390-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00390-9)
- Lee, W., Wang, W.-X., 2001. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and

- phosphate. *Sci. Total Environ.* 278, 11–22
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00884-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00884-6)
- Levy, Israel, Beer, S., Friedlander, M., 1990a. Strain selection in *Gracilaria* spp. 2. Selection for high and low temperature resistance in *G. verrucosa* sporelings. *J. Appl. Phycol.* 2, 163–17.
<https://doi.org/10.1007/BF00023378>
- Levy, I, Beer, S., Friedlander, M., 1990b. Growth , photosynthesis and agar in wild-type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (Gracilariales , Rhodophyta), as a strain selection experiment 381–387
- Levy, I, Friedlander, M., 1990c. Strain Selection in *Gracilaria* spp. I. Growth, Pigment, and Carbohydrates Characterization of Strains of *G. conferta* and *G. verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 33, 339–345 <https://doi.org/10.1515/botm.1990.33.4.339>
- Li, D., Zhou, Z., Liu, H., Wu, C., 1999. A new method of *Laminaria japonica* strain selection and sporeling raising by the use of gametophyte clones. *Hydrobiologia* 473–476.
- Li, H., Zhang, Y., Han, X., Shi, X., Rivkin, R.B., Legendre, L., 2016. Growth responses of *Ulva prolifera* to inorganic and organic nutrients: Implications for macroalgal blooms in the southern Yellow Sea, China. *Sci. Rep.* 6, 26498.
<https://doi.org/10.1038/srep26498>
- Li, S., Yu, K., Huo, Y., Zhang, J., Wu, H., Cai, C., Liu, Y., Shi, D., He, P., 2016. Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on growth and photosynthetic assimilation of carbon in a green tide-forming species (*Ulva prolifera*) in the Yellow Sea. *Hydrobiologia* 776, 161–171. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2749-z>
- Lin, A.-P., Wang, C., Pan, G.-H., Song, L.-Y., Gao, S., Xie, X.-J., Wang, Z.-Y., Niu, J.-F., Wang, G.-C., 2011. Diluted seawater promoted the green tide of *Ulva prolifera* (Chlorophyta, Ulvales). *Phycol. Res.* 59, 295–304 <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00629.x>
- Lis, J.T., Schleif, R., 1975. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res.* 2, 383–390. <https://doi.org/10.1093/nar/2.3.383>
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., 1994. Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511626210>
- Lotze, H.K., Schramm, W., Schories, D., Worm, B., 1999. Control of macroalgal blooms at early developmental stages: *Pilayella littoralis* versus *Enteromorpha* spp. *Oecologia* 119, 46–54.

- <https://doi.org/10.1007/s004420050759>
- Loughnane, C.J., McIvor, L.M., Rindi, F., Stengel, D.B., Guiry, M.D., 2008. Morphology, rbc L phylogeny and distribution of distromatic *Ulva* (Ulvothyceae, Chlorophyta) in Ireland and southern Britain. *Phycologia* 47, 416–429
<https://doi.org/10.2216/PH07-61.1>
- Løvlie, A., Bryhni, E., 1978. On the Relation Between Sexual and Parthenogenetic Reproduction in Haplo-Diplontic Algae. *Bot. Mar.* 21, 155–164. <https://doi.org/10.1515/botm.1978.21.3.155>
- Lu, I.-F., Sung, M.-S., Lee, T.-M., 2006. Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata*. *Mar. Biol.* 150, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0323-3>
- Lüning, K., Kadel, P., Pang, S., 2008. Control of reproduction rhythmicity by environmental and endogenous signals in *Ulva pseudocurvata* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 44, 866–873.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00535.x>
- 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>
- Macchiavello, J., 1998. Growth rate responses of five commercial strains of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales) to temperature and light. *J. World Aquac. Soc.* 29, 259–266.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00986.x>
- Macler, B.A., 1988. Salinity Effects on Photosynthesis, Carbon Allocation, and Nitrogen Assimilation in the Red Alga, *Gelidium coulteri*. *Source Plant Physiol.* 88, 690–694.
<https://doi.org/10.1104/pp.88.3.690>
- Maia, E. de P., Alves Modesto, G., Brito, L.O., Olivera Galvez, A., Vasconcelos Gesteira, T.C., 2016. Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei* in commercial ponds with zero water exchange and addition of molasses and probiotics. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51, 61–67. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100006>
- Manhart, J.R., 1994. Phylogenetic analysis of green plant rbcL sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1994.1014>
- Mantri, V.A., Singh, R.P., Bijo, A.J., Kumari, P., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2011. Differential response of varying salinity and temperature on zoospore induction, regeneration and daily growth rate in *Ulva fasciata* (Chlorophyta, Ulvales). *J. Appl. Phycol.* 23, 243–250.
<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9544-4>

- Markham, J.W., Kremer, B.P., Sperling, K.-R., 1980. Cadmium effects on growth and physiology of *Ulva lactuca*. Helgoländer Meeresuntersuchungen 33, 103–110.
<https://doi.org/10.1007/BF02414739>
- Martins, C.D.L., Arantes, N., Faveri, C., Batista, M.B., Oliveira, E.C., Pagliosa, P.R., Fonseca, A.L., Nunes, J.M.C., Chow, F., Pereira, S.B., Horta, P. a, 2012. The impact of coastal urbanization on the structure of phytobenthic communities in southern Brazil. Mar. Pollut. Bull. 64, 772–8.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.031>
- Masaló, I., Oca, J., Ferrer, J., Cremades, J., Pintado, J., Jiménez, P., 2016. Influence of growing conditions on *Ulva ohnoi* composition cultivated in an IMTA-RAS system, in: Aquaculture Europe 16. pp. 6–8.
- Mata, L., Magnusson, M., Paul, N.A., de Nys, R., 2016. The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. J. Appl. Phycol. 28, 365–375. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0561-1>
- McGlathery, K., Marino, R., Howarth, R., 1994. Variable rates of phosphate uptake by shallow marine carbonate sediments: Mechanisms and ecological significance. Biogeochemistry 25, 127–146. <https://doi.org/10.1007/BF00000882>
- McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry, FAO Fisheries Technical Paper. FAO, Roma.
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2005. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 25, 113–152.
<https://doi.org/10.1080/07388550500248571>
- Melton, J., Collado-Vides, L., Lopez-Bautista, J., 2016a. Molecular identification and nutrient analysis of the green tide species *Ulva ohnoi* M. Hiraoka & S. Shimada, 2004 (Ulvophyceae, Chlorophyta), a new report and likely nonnative species in the Gulf of Mexico and Atlantic Florida, USA. Aquat. Invasions 11, 225–237. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.3.01>
- Melton, J., Garcia-soto, G.C., Lopez-bautista, J.M., 2016b. A new record of the bloom-forming green algal species *Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) in the Caribbean Sea. Algas 51, 62–64.
- Meneses, I., Santelices, B., 1999. Strain selection and genetic variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 11, 241–246. <https://doi.org/10.1023/A:1008075509917>
- Meng, W., Qin, Y., Zheng, B., Zhang, L., 2008. Heavy metal pollution

- in Tianjin Bohai Bay, China. *J. Environ. Sci.* 20, 814–9.
- Miladi, R., Manghisi, A., Armeli Minicante, S., Genovese, G., Abdelkafi, S., Morabito, M., 2018. A DNA Barcoding Survey of *Ulva* (Chlorophyta) in Tunisia and Italy Reveals the Presence of the Overlooked Alien *U. ohnoi*. *Cryptogam. Algol.* 39, 85–107. <https://doi.org/10.7872/crya/v39.iss1.2018.85>
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, in: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). IEEE, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mohsen, A.F., Khaleata, A.F., Hashem, M.A., Metwalli, A., 1974. Effect of Different Nitrogen Sources on Growth, Reproduction, Amino Acid, Fat and Sugar Contents in *Ulva fasciata* Delile (Part III). *Bot. Mar.* 17, 218–222. <https://doi.org/10.1515/botm.1974.17.4.218>
- Mollion, J., Braud, J.-P., 1993. A *Eucheuma* (Solieriaceae, rhodophyta) cultivation test on the south-west coast of Madagascar. *Hydrobiologia* 260–261, 373–378. <https://doi.org/10.1007/BF00049043>
- Munda, I.M., 1984. Salinity Dependent Accumulation of Zn, Co and Mn in *Scytosiphon lomentaria* (Lyngb.) Link and *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link from the Adriatic Sea. *Bot. Mar.* 27, 371–376. <https://doi.org/10.1515/botm.1984.27.8.371>
- Muñoz, J., Freile-Peigrín, Y., Robledo, D., 2004. Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. *Aquaculture* 239, 161–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.043>
- Nakanishi, K., Nishijima, M., Nishimura, M., Kuwano, K., Saga, N., 1996. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (chlorophyta) grown under axenic conditions. *J. Phycol.* 32, 479–482. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00479.x>
- Naldi, M., Wheeler, P.A., 1999. Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *J. Phycol.* 35, 70–77. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3510070.x>
- Nardelli, A.E., Chiozzini, V.G., Braga, E.S., Chow, F., 2018. Integrated multi-trophic farming system between the green seaweed *Ulva lactuca*, mussel, and fish: a production and bioremediation solution. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1581-4>
- Neori, A., Cohen, I., Gordin, H., 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for

- Marine Fishpond Effluents. II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. *Bot. Mar.* 34, 483–490.
<https://doi.org/10.1515/botm.1991.34.6.483>
- Netto, S.A., Pagliosa, P.R., Colling, A., Fonseca, A.L., Brauko, K.M., 2018. Benthic Estuarine Assemblages from the Southern Brazilian Marine Ecoregion, in: Lana, P. da C., Bernardino, A.F. (Eds.), *Brazilian Marine Biodiversity*. Springer International Publishing, Cham, pp. 177–212. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77779-5_6
- Niesenbaum, R.A., 1988. The ecology of sporulation by the macroalga *Ulva lactuca* L. (chlorophyceae). *Aquat. Bot.* 32, 155–166.
[https://doi.org/10.1016/0304-3770\(88\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0304-3770(88)90095-2)
- Nixon, S.W., Pilson, M.E.Q., 1983. Nitrogen in estuarine and coastal marine ecosystems, in: Carpenter, E.J., Capone, D.G. (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, Stony Brook, New York, pp. 565–648. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-160280-2.50024-9>
- NOAA, 2015. (National Oceanic and Atmospheric Administration) Sea Surface Temperatures maps [WWW Document]. URL <http://www.ospo.noaa.gov/Products/ocean/index.html> (accessed 4.13.15).
- Notoya, M., 1999. Utilization of *Ulva* spp. and environmental restoration. Seizandou, Tokyo.
- O’Kelly, C.J., Kurihara, A., Shipley, T.C., Sherwood, A.R., 2010. Molecular assessment of *Ulva* spp. (ulvophyceae, chlorophyta) in the Hawaiian Islands. *J. Phycol.* 46, 728–735.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00860.x>
- Ohno, M., 2006. Recent developments in the seaweed cultivation and industry in Japan. *Advances in seaweed cultivation and utilisation.*, in: *Asia: Proceedings of a Workshop Held in Conjunction with the 7th Asian Fisheries Forum*. University of Malaya, Penang. Kuala Lumpur, pp. 1–20.
- Ohno, M., 1988. Seasonal Changes of the Growth of Green Algae, *Ulva* sp. in Tosa Bay, Southern Japan. *Mar. fouling* 7, 13–17.
<https://doi.org/10.4282/sosj1979.7.13>
- Oliveira, V.P., Martins, N.T., Guedes, P.D.S., Pollery, R.C.G., Enrich-Prast, A., 2016. Bioremediation of nitrogenous compounds from oilfield wastewater by *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Bioremediat. J.* 20, 1–9. <https://doi.org/10.1080/10889868.2015.1114463>
- Oliveira, E.C. De, 1997. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explotado pelo Brasil. *Panor. da Aqüicultura* 7, 24–26.
- Oliveira, E.C., Paula, E.J., Plastino, E.M., Petti, R., 1995. Metodologias

- para Cultivo no Axenico de Macroalgas Marinhas in Vitro, in: Alveal, K., Ferrario, M., Oliveire, E.C., Sar, E. (Eds.), *Material e Metodos Ficologicos*. Universidad de Concepcion, Concepcion, Chile, pp. 429–447.
- Pagliosa, P.R., Fonseca, A., Barbosa, F.A., 2006. Evidence of systemic changes in trace metal concentrations in subtropical estuarine sediments as a result of urbanization. *J. Coast. Res.* 1078–1083.
- Pallaoro, M.F., do Nascimento Vieira, F., Hayashi, L., 2016. *Ulva lactuca* (Chlorophyta, Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. *J. Appl. Phycol.* 28, 3659–3665.
<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0843-2>
- Paradas, W.C., Amado Filho, G.M., 2007. Are metals of antifouling paints transferred to marine biota? *Brazilian J. Oceanogr.* 55, 51–56. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592007000100006>
- Paula, E.J., Pereira, R.T.L., Ohno, M., 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *J. Appl. Phycol.* 11, 111–121
<https://doi.org/10.1023/A:1008085614360>
- Parmar, P., Kumari, N., Sharma, V., 2013. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot. Stud.* 54, 45. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-45>
- Pellizzari, F., Oliveira, E.C., Yokoya, N.S., 2008. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. *J. Appl. Phycol.* 20, 75–82.
<https://doi.org/10.1007/s10811-007-9183-6>
- Pengzhan, Y., Quanbin, Z., Ning, L., Zuhong, X., Yanmei, W., Zhi'en, L., 2003. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. *J. Appl. Phycol.* 15, 21–27. <https://doi.org/10.1023/A:1022997622334>
- Perreault, F., Dionne, J., Didur, O., Juneau, P., Popovic, R., 2011. Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II. *Photosynth. Res.* 107, 151–157.
<https://doi.org/10.1007/s11120-010-9609-x>
- Peters, E.C., Gassman, N.J., Firman, J.C., Richmond, R.H., Power, E. A., 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 12–40. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160103>
- Pilatti, F.K., Ramlov, F., Schmidt, E.C., Costa, C., Oliveira, E.R. de, Bauer, C.M., Rocha, M., Bouzon, Z.L., Maraschin, M., 2017.

- Metabolomics of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) exposed to oil fuels: Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis as tools for metabolic fingerprint. *Mar. Pollut. Bull.* 114, 831–836. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.006>
- Pilatti, F.K., Ramlov, F., Schmidt, E.C., Kreuzsch, M., Pereira, D.T., Costa, C., de Oliveira, E.R., Bauer, C.M., Rocha, M., Bouzon, Z.L., Maraschin, M., 2016. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline - Biochemical and morphological alterations. *Chemosphere* 156, 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.126>
- Pinchetti, J. L G, Del Campo Fernández, E., Moreno Díez, P., García Reina, G., 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 10, 383–389. <https://doi.org/10.1023/A:1008008912991>
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and Heavy-Metal Pollution. *Biol. Rev.* 56, 99–151. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1981.tb00345.x>
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2008. *Biology of Plants*, 5^a edition. ed, Biology of Plants.
- Reddy, C.R.K., Jha, B., Fujita, Y., Ohno, M., 2008. Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. *J. Appl. Phycol.* 20, 609–617. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9205-4>
- Reddy, C.R.K., Migita, S., Fujita, Y., 1989. Protoplast Isolation and Regeneration of Three Species of *Ulva* in Axenic Culture. *Bot. Mar.* 32, 483–490. <https://doi.org/10.1515/botm.1989.32.5.483>
- Richir, J., 2016. Trace Elements in Marine Environments: Occurrence, Threats and Monitoring with Special Focus on the Coastal Mediterranean. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 06, 621–625. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000349>
- Robinson, N., Winberg, P., Kirkendale, L., 2013. Genetic improvement of macroalgae: status to date and needs for the future. *J. Appl. Phycol.* 25, 703–716. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9950-x>
- Ruangchuay, R., Dahamat, S., Chirapat, A., Notoya, M., 2012. Effects of culture conditions on the growth and reproduction of Gut Weed, *Ulva intestinalis* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34, 501–507.
- Rusig, A.-M., Cosson, J., 2001. Plant regeneration from protoplasts of *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta, Ulvophyceae) as seedstock for macroalgal culture. *J. Appl. Phycol.* 13, 103–108.

- <https://doi.org/10.1023/A:1011136712938>
- Rybak, A., Messyasz, B., Łęska, B., 2013. The accumulation of metal (Co, Cr, Cu, Mn and Zn) in freshwater *Ulva* (Chlorophyta) and its habitat. *Ecotoxicology* 22, 558–573.
<https://doi.org/10.1007/s10646-013-1048-y>
- Saleh, B., 2015. Physiological Response of the Green Algae *Ulva lactuca* (Chlorophyta) to Heavy Metals Stress. *J. Stress Physiol. Biochem.* 11, 38–51.
- Sampaio S., C., Guimarães da Luz, J.A., Macedo, S., Montes, M.D.J.F., Mafalda, P., 2013. Chlorophyll a and nutrient distribution around seamounts and islands of the tropical south-western Atlantic. *Mar. Freshw. Res.* 64, 168. <https://doi.org/10.1071/MF12075>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- 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>
- Scherner, F., Bastos, E., Rover, T., de Medeiros Oliveira, E., Almeida, R., Itokazu, A.G., Bouzon, Z.L., Rörig, L.R., Pereira, S.M.B., Horta, P.A., 2018. *Halimeda jolyana* (Bryopsidales, Chlorophyta) presents higher vulnerability to metal pollution at its lower temperature limits of distribution. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1395-6>
- Scherner, F., Bonomi Barufi, J., Horta, P.A., 2012. Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: Evidence of selection of pollution-tolerant species. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2380–2390.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.012>
- Scherner, F., Horta, P.A., de Oliveira, E.C., Simonassi, J.C., Hall-Spencer, J.M., Chow, F., Nunes, J.M.C., Pereira, S.M.B., 2013. Coastal urbanization leads to remarkable seaweed species loss and community shifts along the SW Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.09.019>
- Schneider, M., de Quadros, D.P.C., Welz, B., Carasek, E., de Oliveira Bastos, D., Rorig, L.R., 2017. A novel extraction-based procedure for the determination of cadmium in marine macro-algae using HR-CS GF AAS. *Anal. Methods* 9, 5400–5406.
<https://doi.org/10.1039/C7AY01283G>
- Sigfridsson, K.G.V., Bernát, G., Mamedov, F., Styring, S., 2004.

- Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1659, 19–31.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.07.003>
- Silva-Aciaries, F., Riquelme, C., 2008. Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electron. J. Biotechnol.* 11, 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue1-fulltext-12>
- Silva, B.N.T., Amancio, C.E., Oliveira Filho, E.C., 2010. Exotic Marine Macroalgae on the Brazilian Coast: a Revision. *Oecologia Aust.* 14, 403–414. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1402.05>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J. Pharmacol.* 43, 246.
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Smetacek, V., Zingone, A., 2013. Green and golden seaweed tides on the rise. *Nature* 504, 84–88. <https://doi.org/10.1038/nature12860>
- Sode, S., Bruhn, A., Balsby, T.J.S., Larsen, M.M., Gotfredsen, A., Rasmussen, M.B., 2013. Bioremediation of reject water from anaerobically digested waste water sludge with macroalgae (*Ulva lactuca*, Chlorophyta). *Bioresour. Technol.* 146, 426–35.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.062>
- Song, W., Peng, K., Xiao, J., Li, Y., Wang, Z., Liu, X., Fu, M., Fan, S., Zhu, M., Li, R., 2015. Effects of temperature on the germination of green algae micro-propagules in coastal waters of the Subei Shoal, China. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 163, 63–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.08.007>
- Sousa, A.I., Martins, I., Lillebø, A.I., Flindt, M.R., Pardal, M.A., 2007. Influence of salinity, nutrients and light on the germination and growth of *Enteromorpha* sp. spores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.020>
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- Suzuki, Y., Kametani, T., Maruyama, T., 2005. Removal of heavy metals from aqueous solution by nonliving *Ulva* seaweed as biosorbent. *Water Res.* 39, 1803–1808.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.020>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

- Tamura, T., 1966. Marine aquaculture, 2nd editio. ed. Springfield, VA, USA.
- Tanner, C.S., 1981. Chlorophyta: Life Histories, in: Lobban, C.S., Wynne, M.J. (Eds.), The Biology of the Seaweeds. Botanical Monographs. Blackwell. Oxford, pp. 218–247.
- 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>
- Tonon, A.P., Oliveira, M.C., Soriano, E.M., Colepicolo, P., 2011. Absorption of metals and characterization of chemical elements present in three species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) Greville: a genus of economical importance. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 355–360. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000058>.
- Tremblay-Gratton, A., Boussin, J.C., Tamigneaux, Vandenberg, G.W., Le François, N.R., 2018. Bioremediation efficiency of *Palmaria palmata* and *Ulva lactuca* for use in a fully recirculated cold-seawater naturalistic exhibit: effect of high NO₃ and PO₄ concentrations and temperature on growth and nutrient uptake. *J. Appl. Phycol.* 30, 1295–1304. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1333-x>
- Tsagakamilis, P., Danielidis, D., Dring, M.J., Katsaros, C., 2010. Removal of phosphate by the green seaweed *Ulva lactuca* in a small-scale sewage treatment plant (Ios Island, Aegean Sea, Greece). *J. Appl. Phycol.* 22, 331–339.
<https://doi.org/10.1007/s10811-009-9463-4>
- Tseng, C.K., 1987. *Laminaria* mariculture in China, in: Doty M. S., Caddy J. F., S.B. (Ed.), Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy, pp. 239–263.
- Twigg, M.S., Tait, K., Williams, P., Atkinson, S., Cámara, M., 2014. Interference with the germination and growth of *Ulva* zoospores by quorum-sensing molecules from *Ulva*-associated epiphytic bacteria. *Environ. Microbiol.* 16, 445–453.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12203>
- van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1996. Algae: an introduction to phycology. Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.2307/1468159>
- Vecchia, F.D., Marzocchi, M., Maistro, S., Moro, I., 2012. Morpho-

- physiological effects of cadmium on two *Ulva* species. Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud. 138, 13–25.
<https://doi.org/10.1127/1864-1318/2012/0003>
- Vermaat, J.E., Sand-Jensen, K., 1987. Survival, metabolism and growth of *Ulva lactuca* under winter conditions: a laboratory study of bottlenecks in the life cycle. Mar. Biol. 95, 55–61.
<https://doi.org/10.1007/BF00447485>
- Villares, R., Puente, X., Carballeira, A., 2001. *Ulva* and *Enteromorpha* as indicators of heavy metal pollution. Hydrobiologia 462, 221–232. <https://doi.org/10.1023/A:1013154821531>
- Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. Hydrometallurgy 59, 203–216.
[https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00160-2)
- Webster, E.A., Gadd, G.M., 1996. Cadmium replaces calcium in the cell wall of *Ulva lactuca*. BioMetals 9, 241–244.
<https://doi.org/10.1007/BF00817922>
- Webster, E.A., Gadd, G.M., 1992. Cadmium as an uncoupler of respiration in *Ulva lactuca*. Environ. Toxicol. Water Qual. 7, 189–200. <https://doi.org/10.1002/tox.2530070209>
- Webster, E.A., Murphy, A.J., Chudek, J.A., Gadd, G.M., 1997. Metabolism-independent binding of toxic metals by *Ulva lactuca*: cadmium binds to oxygen-containing groups, as determined by NMR. Biometals 10, 105–117.
<https://doi.org/10.1023/A:1018379106700>
- Wichard, T., Oertel, W., 2010. Gametogenesis and gamete release of *Ulva mutabilis* and *Ulva lactuca* (Chlorophyta): Regulatory effects and chemical characterization of the “Swarming Inhibitor.” J. Phycol. 46, 248–259. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00816.x>
- Wong, M., Lau, K., 1979. Cultivation of in sewage. Chemosphere 8, 217–224. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(79\)90072-9](https://doi.org/10.1016/0045-6535(79)90072-9)
- Woodhead, P., Moss, B., 1975. The effects of light and temperature on settlement and germination of *Enteromorpha*. Br. Phycol. J. 10, 269–272. <https://doi.org/10.1080/000716175000650281>
- Wu, H., Zhang, J., Yarish, C., He, P., Kim, J.K., 2018. Bioremediation and nutrient migration during blooms of *Ulva* in the Yellow Sea, China. Phycologia 57, 223–231. <https://doi.org/10.2216/17-32.1>
- Wu, T., Hsu, Y., Lee, T., 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciata*. Bot. Stud. 50, 25–34.

- Xiao, J., Zhang, Xiaohong, Gao, C., Jiang, M., Li, R., Wang, Z., Li, Y., Fan, S., Zhang, Xuelei, 2016. Effect of temperature, salinity and irradiance on growth and photosynthesis of *Ulva prolifera*. *Acta Oceanol. Sin.* 35, 114–121. <https://doi.org/10.1007/s13131-016-0891-0>
- Yabe, T., Ishii, Y., Amano, Y., Koga, T., Hayashi, S., Nohara, S., Tatsumoto, H., 2009. Green tide formed by free-floating *Ulva* spp. at Yatsu tidal flat, Japan. *Limnology* 10, 239–245. <https://doi.org/10.1007/s10201-009-0278-4>
- Yan, X.H., Lv, F., Liu, C.J., Zheng, Y.F., 2010. Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 22, 511–516. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9486-x>
- Yokoya, N.S., Oliveira, E.C., 1992. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. *J. Appl. Phycol.* 4, 339–345. <https://doi.org/10.1007/BF02185791>
- Yokoyama, H., Ishihi, Y., 2010. Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm - potential role in integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 310, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.018>
- Zhang, C., Li, X., Kim, S., 2012. Application of marine biomaterials for nutraceuticals and functional foods. *Food Sci. Biotechnol.* 21, 625–631. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0081-6>
- Zhang, J., Huo, Y., Yu, K., Chen, Q., He, Q., Han, W., Chen, L., Cao, J., Shi, D., He, P., 2013. Growth characteristics and reproductive capability of green tide algae in Rudong coast, China. *J. Appl. Phycol.* 25, 795–803. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9972-4>