



MÁSTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

III MÁSTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canarias, España 2012-2014

EFFECTO DEL APORTE DE NUTRIENTES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MACROALGAS EN CONDICIONES DE CO-CULTIVO. CRECIMIENTO, BIOFILTRACIÓN Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.

JESÚS GUZMÁN DE VERA SOTO

Las Palmas de Gran Canaria a 29 de Julio 2014



MÁSTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

III MÁSTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Organizado conjuntamente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gobierno de Canarias) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), a través del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

EFFECTO DEL APORTE DE NUTRIENTES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MACROALGAS EN CONDICIONES DE CO-CULTIVO. CRECIMIENTO, BIOFILTRACIÓN Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.

Trabajo realizado en el Banco Español de Algas (BEA) de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección del Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti y la codirección del Dr. Ricardo Haroun Tabraue

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).

Director

Fdo: Dr.....

Director

Fdo: Dr.....

Autor

Fdo: Dr.....

Agradecimientos:

En primer lugar agradecer a mis padres (Domingo y Elena), mi hermano (Oscar), mi cuñada (Jimena) y mi sobrina (Luna), porque sin ellos y su apoyo incondicional, estos dos años no hubieran sido posibles. Porque en los momentos más bajos, han sido ellos los que han conseguido que me levante y siga luchando por lo que quería. Agradecer a mi tutor Juan Luis, por darme la oportunidad de realizar la tesis en lo que realmente me gustaba y quería, poniendo a mi disposición las instalaciones del BEA y coordinando mi trabajo. A mi co-tutor Ricardo por interesarse por mi trabajo y ofrecerse a formar parte de él. Como olvidarme de mi familia canariona, Samira e Iván que desde el minuto uno conectamos y hasta el día de hoy. A Ruth, que llevamos años siguiéndonos y ha sido una persona muy importante estos dos años en esta isla. A Fini, porque aunque pasen los años y hayan distanciamiento, me ha acogido en su familia como uno más. Olympia, porque aunque te conocí hace relativamente poco, has conseguido congeniar conmigo como poca gente en mi vida. Tampoco me puedo olvidar del personal del BEA, con los que he compartido el día a día durante este último año. Especialmente Fernando y Ana Peñuela, me faltarían páginas para agradecerles, porque ante cualquier inconveniente han estado en el lugar y el momento adecuado, ha sido un placer trabajar con profesionales como ustedes. Gracias a Yolanda por transmitirme sus conocimientos, a Juampe por las horas de solajero en el invernadero en pleno agosto. A Loli, porque se agradece una sonrisa a las 7 de la mañana cada día. A Agueda por todo lo aportado, tanto profesional como personalmente. Finalmente y no menos importantes, a mis amigos, Juani y Dessi, por esas charlas interminables de chocolate y dulces, Yanira porque aunque apenas nos veamos, los ratos juntos se agradecen. Serhat, por los momentos vividos, amigo siempre era un placer hacer planes contigo. Luis, aunque la mayoría de las veces te mataría, en el fondo hay un hueco aquí para ti. Sara, Emma, Orchena y Jéssica porque aunque estos dos años, haya estado en la distancia, sé que siempre están ahí. También agradecer a profesores y resto de compañeros, por los conocimientos aportados y las vivencias durante los dos cursos compartidos con ustedes.

Lista de contenidos:

Listas de figuras	i
Lista de tablas	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas	v
1. Introducción	1
1.1 Problemas medioambientales relacionados con la acuicultura	2
1.2 Sistemas integrados en acuicultura	3
1.3 Cultivo intensivo de macroalgas	6
1.4 Co-cultivo alga	8
1.5 Valoración y aplicación de la biomasa	10
1.5.1 Recursos para acuicultura	11
1.5.2 Pigmentos	12
1.5.3 Antioxidantes	15
1.5.4 Otros productos derivados de macroalgas	16
1.5.5 Biorefinería	17
2. Objetivos	20
3. Material y métodos	21
3.1 Especies, sistemas y condiciones experimentales de cultivo	21
3.1.1 Taxonomía de las especies	21
3.1.2 Localización de los cultivos originales	28
3.1.3 Sistema de Cultivo	29
3.1.4 Condiciones experimentales	30
3.2 Determinación de la producción y tasa de crecimiento	32
3.3 Biofiltración de amonio y fosfato	33
3.4 Determinación del rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) del PSII como indicador de estrés. (Medidas de fluorescencia de clorofila)	34

3.5	Procesado y análisis de biomasa	35
3.5.1	Determinación de pigmentos	35
3.5.2	Determinación de la actividad antioxidante (Ensayo de DPPH)	36
3.6	Estadística	36
4.	Resultados	37
4.1	Evaluación de la producción y tasa de crecimiento	37
4.2	Biofiltración de amonio y fosfato	46
4.3	Análisis del rendimiento cuántico óptimo del PSII (Fv/Fm) como indicador de estrés.	47
4.4	Valoración de pigmentos	50
4.4.1	Experimento A	50
4.4.2	Experimento B	53
4.5	Valoración de la actividad antioxidante	57
5.	Discusión	59
6.	Conclusiones	64
7.	Referencias	66
8.	Anexo	85

Lista de figuras

Figura 1- Producción mundial de macroalgas cultivadas. (FAO, 2012).	1
Figura 2- Procesos metabólicos y residuos generados asociados al cultivo de peces.	2
Figura 3- Esquema representativo de los flujos de nutrientes en Acuicultura Multitrófica Integrada.	5
Figura 4- Localización de las zonas de recolección de las especies ensayadas en la costa del Municipio de Telde.	28
Figura 5- Diseño experimental.	30
Figura 6- Producción por tanques, irradiancia y temperatura. Experimento A.	38
Figura 7- Producción por tanques, irradiancia y temperatura. Experimento B.	39
Figura 8- Producción frente a dosis de irradiancia. Experimento A.	41
Figura 9- Producción frente a dosis de irradiancia. Experimento B.	42
Figura 10- Producción frente a presencia/ausencia de nutrientes para las diferentes especies cultivadas. Experimento A.	43
Figura 11- Producción frente a presencia/ausencia de nutrientes para las diferentes especies cultivadas. Experimento B.	45
Figura 12- Eficiencia fotosintética óptima (F_v/F_m) de cada una de las especies para los diferentes tratamientos del Experimento A.	48
Figura 13- Eficiencia fotosintética óptima (F_v/F_m) de cada una de las especies para los diferentes tratamientos del Experimento B.	48
Figura 14- Cambios morfológicos en los diferentes tratamientos.	55

Lista de tablas

Tabla I- Aplicaciones actuales de las algas rojas.	10
Tabla II- Aplicaciones de los carotenoides.	13
Tabla III Otras utilidades de la biomasa de las algas rojas.	17
Tabla IV- Taxonomía <i>Ulva rigida</i> .	22
Tabla V- Taxonomía <i>Hydropuntia cornea</i> .	23
Tabla VI- Taxonomía <i>Grateloupia turuturu</i> .	24
Tabla VII- Taxonomía <i>Grateloupia imbricata</i> .	25
Tabla VIII- Taxonomía <i>Hypnea musciformis</i> .	26
Tabla IX- Taxonomía <i>Palisada corallopsis</i> .	27
Tabla X- Tasa de crecimiento. Experimento A.	40
Tabla XI- Tasa de crecimiento. Experimento B.	40
Tabla XII- Datos de biofiltración del Experimento A.	46
Tabla XIII- Datos de biofiltración del Experimento B.	47
Tabla XIV: ETR relativo (μmol de electrones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en presencia y ausencia de nutrientes.	49
Tabla XV: Pigmentos liposolubles. Experimento A.	50
Tabla XVI: Pigmentos hidrosolubles. Experimento A.	52
Tabla XVII: Pigmentos liposolubles. Experimento B.	53
Tabla XVIII: Pigmentos hidrosoluble. Experimento B.	54
Tabla XIX: Actividad antioxidante pigmentos liposolubles. Experimento A.	57
Tabla XX: Actividad antioxidante pigmentos liposolubles. Experimento B.	58

Resumen:

En el presente estudio se han establecido sistemas de co-cultivo en tanque de 90L de varias especies de algas rojas (*Hypnea musciformis*, *Grateloupia turuturu*, *Grateloupia dichotoma*, *Hydropuntia cornea* y *Palisada corallopsis*) y del alga verde (*Ulva rígida*) para el crecimiento de forma simultánea, con biomásas equilibradas en el mismo tanque y con el objetivo de identificar posibles relaciones alelopáticas. Este experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Banco Español de Algas (Muelle de Taliarte, Telde, Gran Canaria), con la organización de periodos semanales de aporte y ausencia de nutrientes (N-amonio y P-fosfatos). Se evaluaron las capacidades de crecimiento (producción), biofiltración de N-amonio y P-fosfato la capacidad fotosintética / fisiológica, de forma comparativa con cultivos unialgales considerados como sostenibles bajo las condiciones experimentales (*Hydropuntia cornea*). Con la biomasa obtenida se realizaron extracciones para la valoración de pigmentos y actividad antioxidante bajo el concepto de biorefinería.

Los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos, revelan la fuerte interrelación de la dinámica de nutrientes sobre la producción (máximos superiores a $30 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y calidad de la biomasa recolectada en las unidades de biofiltración (p.e. NUE superiores al 50%).

En cuanto a la valoración de la biomasa, los valores máximos de pigmentos liposolubles en algas rojas fueron de $4,1 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ de clorofila a y $1,0 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ de carotenoides. Los valores máximos de pigmentos hidrosolubles fueron $25,9 \pm 0,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ de ficoeritrina y $0,4 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ de ficocianina, en el periodo de aporte de nutrientes. La actividad antioxidante presentó sus valores máximos en ausencia de nutrientes, con unos valores $20 \pm 3,9\%$ de inhibición.

Abstract

Establishment of co-culture systems in tank 90L of several species of red algae (*Hypnea musciformis*, *Grateloupia turuturu*, *Grateloupia dichotoma*, *Hydropuntia cornea* y *Palisada corallopsis*) and green algae (*Ulva rigida*) for simultaneous growth, with equilibrated biomasses at the same tank generating allelopathic relationships. This study was carried out in culture facilities Spanish Bank of Algae, located on Taliarte (Telde-Gran Canaria), weeks in absence and input of nutrients (N- ammonium and P-phosphate). Growth capabilities were evaluated (production), N-ammonium biofiltration and photosynthetic capacity/ physiological, comparatively with unialgal cultures considered sustainable under the experimental conditions (*Hydropuntia cornea*). The biomass obtained assessment of pigments and antioxidant activity was performed.

The results obtained from the different treatments, reveal the strong interrelation of nutrient dynamics on production (higher maximum to 30 g PS m⁻² d⁻¹) and quality of the harvested biomass biofiltration units (f.e.NUE above the 50%). Regarding the evaluation of the biomass, the maximum values of lipo-soluble pigments in red algae were 4,1±0,3 mg g⁻¹PS chlorophyll a and 1,0±0,1 mg g⁻¹PS carotenoid. The maximum values of water-soluble pigments were 25,9 ± 0,9 mg g⁻¹PS phycoerythrin and 0,4 ±0,02 mg g⁻¹PS phycocyanin, in the period of contribution of nutrients. Antioxidant activity presented its maximum in the absence of nutrients, with values closed to 20±3,9 % inhibition.

Lista de abreviaturas

AMTI – Acuicultura Multitrófica Intergrada

DNH- Tratamiento Aporte de Nutrientes

DSW- Tratamiento Limitación de Nutrientes (Agua de mar)

ETRr- Tasa De Transporte De Electrones relativo

Fv/Fm – Índice estimador de la integridad del fotosistema II

NUE – Nitrogen Uptake Efficiency

NUR – Nitrogen Uptake Rate

PAR – Photosynthetic Active Radiation

PF – Peso Fresco Escurrido

PS – Peso Seco

PSII – Fotosistema II

PUE – Phosphate Uptake Efficiency

PUR - Phosphate Uptake Rate

TC – Tanque Control (*Hydropuntica cornea*)

TCC2- Tanque co-cultivo dos especies (*Ulva rígida* y *Grateloupia turuturu*)

TCC3- Tanque co-cultivo tres especies (*Hydropuntia cornea*, *Grateloupia imbricata* e *Hypnea musciformis*)

TCCH- Tanque co-cultivo (*Hydropuntia cornea* y *Palisada corallopsis*)

TCCU- Tanque co-cultivo (*Ulva rígida* y *Palisada corallopsis*)

1. Introducción

El manejo sostenible de los recursos naturales junto con la necesidad de obtención de nuevas fuentes de materia prima ha incrementado el interés por la optimización y mejora de las técnicas de producción de los vegetales marinos. Éstos constituyen una fuente importante de recursos, no sólo por su utilización directa, por ejemplo para consumo humano, sino por la cantidad de productos derivados que se obtienen de la biomasa producida (Neori *et al.*, 2004). Además, el cultivo de algas ofrece nuevas posibilidades medioambientales en el tratamiento y la biofiltración de efluentes (Neori *et al.*, 2004).

La tendencia en la producción de macroalgas cultivadas a nivel mundial ha aumentado en forma continuada en los últimos 10 años a un promedio del 10 % anual (FAO, 2012). La producción de especies de algas pardas y rojas supera de forma significativa la de algas verdes. Cabe señalar que la producción de algas rojas aumentó drásticamente.

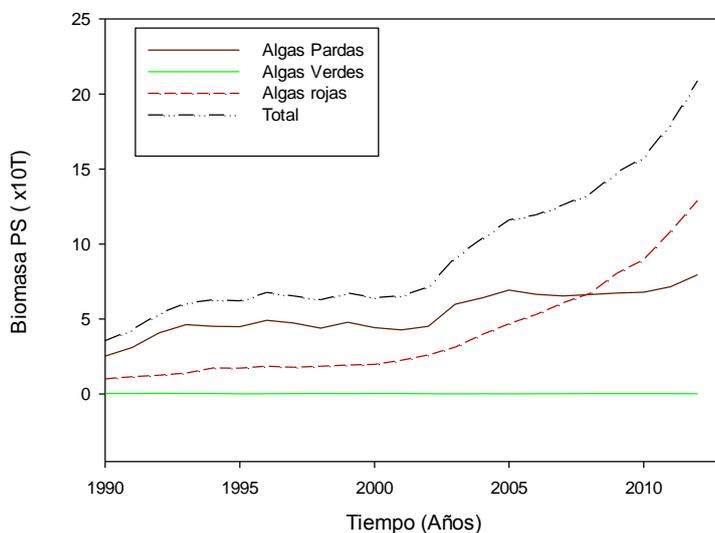


Figura 1: Producción mundial de macroalgas cultivadas. (F.A.O, 2012)

Para las algas pardas, sólo dos especies, *Laminaria japonica* y *Undaria pinnatifida*, representan más del 40 % del total. Para las algas rojas, *Eucheuma* spp, *Kappaphycus* spp y *Gracilaria* spp, representan aproximadamente el 40 %. En contraste, la cantidad de producción de

algas verdes es insignificante. (FAO, 2012). China, Corea, Japón, Indonesia y Filipinas, son los productores directos de macroalgas (FAO, 2012). Estos países representan el 95 % de la oferta mundial. Teniendo en cuenta el cultivo actual y la demanda del mercado, la tecnología basada en la biorefinería de macroalgas debe centrarse en la utilización de las algas pardas y rojas en lugar de las algas verdes.

1.1 Problemas medioambientales relacionados con la acuicultura

Los beneficios de la acuicultura se ven afectados por numerosos impactos. Una de las consecuencias del desarrollo de esta actividad es la descarga de nutrientes, principalmente N y P. (Barrington *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2011). Los peces carnívoros excretan entre el 50 y el 80 % del nitrógeno y del 35 al 85 % del fósforo del alimento consumido (Abreu *et al.*, 2011). Esto, por lo general, representa una pérdida económica, tanto en términos de nutrientes como en el gasto adicional para el tratamiento de los efluentes (Schneider *et al.*, 2005).

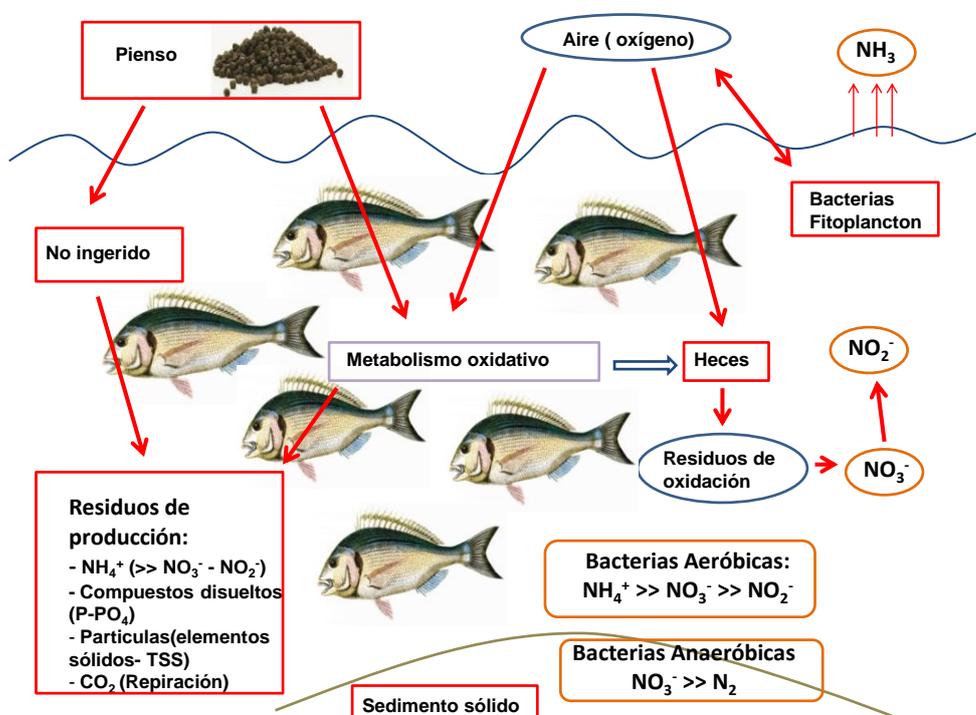


Figura 2: Procesos metabólicos y residuos generados asociados al cultivo de peces.

Los mayores flujos de compuestos químicos liberados son carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P), los cuales son residuos del metabolismo de los peces, existiendo a su vez un gran consumo de oxígeno disuelto debido a la respiración de los peces cultivados. El carbono inorgánico, se origina a partir de pérdida de alimento, heces, excreciones mucosas, escamas, compuestos orgánicos disueltos y peces muertos. El amonio es la forma predominante de N liberado por los peces, mientras que una pequeña parte se libera en forma de compuestos de N orgánicos disueltos y particulados. El fósforo es excretado por los peces como ortofosfato disuelto o como compuestos orgánicos de P, observándose a menudo un pico de fósforo sedimentario alrededor de las granjas de peces. Esto se relaciona parcialmente con la abundancia de P en las harinas de pescado y en los huesos de los peces (UICN, 2007).

Para ayudar a resolver este problema, estos nutrientes podrían ser utilizados para hacer crecer algas con alto valor (Costa- Pierce, 2010; Abreu *et al.*, 2011). Los sistemas de Acuicultura Multitrófica Integrada (AMTI) en tierra tienen un gran potencial para minimizar el impacto ambiental debido a que todos los productos de desecho presentan una gestión eficaz (Thorarensen y Farrell, 2011). Además, a diferencia de la acuicultura en mar abierto, donde los efluentes se diluyen directamente en el medio ambiente, los efluentes en sistemas de cultivo basados en tanques pueden ser controlados, dirigidos y tratados hasta que los estándares de calidad del agua puedan ser favorables (Sumagaysay-Chavoso *et al.*, 2004).

1.2 Sistemas Integrados en Acuicultura

En los sistemas AMTI (Acuicultura Multi-Trófica Integrada), al igual que ocurre en los sistemas de recirculación, o en los sistemas de poli- o co-cultivo, diferentes organismos, desarrollando procesos diferenciados, son cultivados en el mismo flujo de agua y tiempo. Los desechos producidos por cada componente independiente se convierten en un recurso aprovechable para el siguiente nivel trófico, estableciéndose un sistema de producción bien equilibrado (Chávez-Crooker y Obrequé-Contreras, 2010).

Una manera eficiente y de bajo coste para el tratamiento de efluentes de cultivo de peces es a través de la acuicultura integrada de peces y algas, donde las algas pueden extraer el exceso de nutrientes disueltos en los efluentes y utilizarlo para el crecimiento (Troell *et al.*, 1999; Troell, 2009). Esta técnica de cultivo permite un control periódico y la gestión de efluentes. Se puede adaptar de acuerdo a las necesidades fisiológicas de las algas, mientras hay una optimización de los costes operacionales del sistema (Carton-Kawagoshi *et al.*, 2014). Las altas tasas de efluentes aumentan el crecimiento de algas debido al suministro de nutrientes inorgánicos disueltos y de carbono en el sistema de cultivo (Msuya y Neori, 2008; Carton-Kawagoshi *et al.*, 2014).

El desarrollo de una industria de la acuicultura de algas marinas puede fomentar el desarrollo de otras especies cultivadas que se encuentran en la parte superior de la cadena trófica. Las algas son organismos bioextractivos, que asumen el exceso de nutrientes generados por otras especies, como los peces o crustáceos. Los sistemas AMTI son modelos basados en la combinación de organismos bioextractivos inorgánicos (algas) con organismos bioextractivos heterótrofos (moluscos, equinodermos,..) para equilibrar el cultivo intensivo de peces y crustaceos, con el fin de producir un desarrollo más sostenible, más limpio y diversificado en sistemas de acuicultura (Neori *et al.*, 2007).

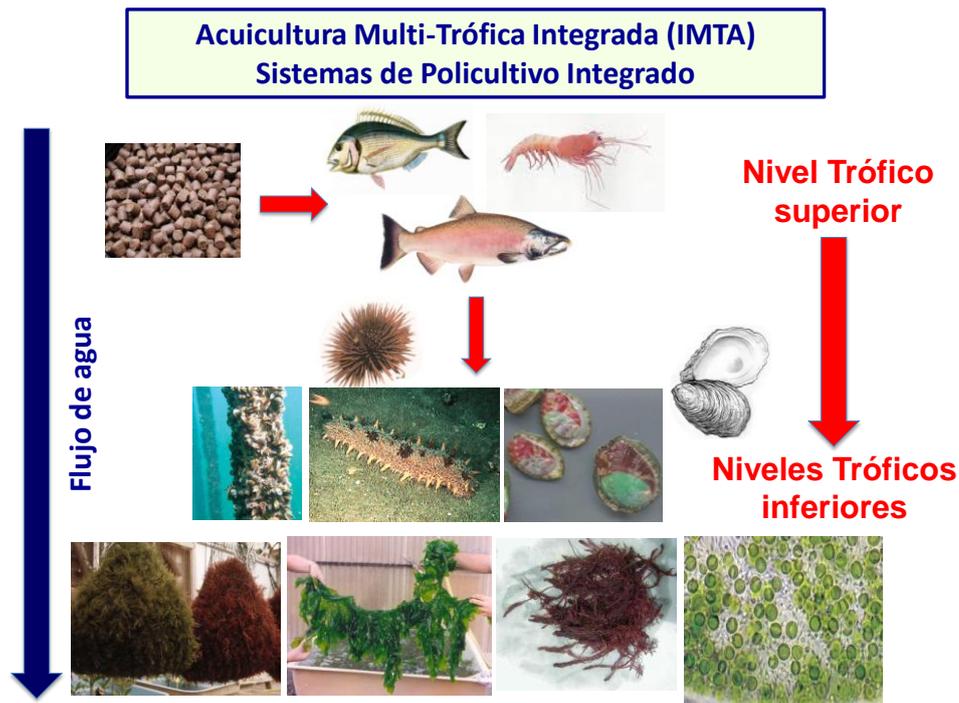


Figura 3: Esquema representativo de los flujos de nutrientes en Acuicultura Multitrófica Integrada. (Gómez Pinchetti, comunicación personal).

La acuicultura integrada recicla los nutrientes en productos rentables, mientras que restaura la calidad del agua. Sistemas de peces/crustáceos- moluscos – algas, tales como el abalón y erizo de mar, tienen una elección de la comercialización de cualquiera de las algas o los moluscos. Los resultados son altos rendimientos e ingresos por tonelada de alimento y por tonelada de agua. Por otra parte, el sistema de cultivo integrado cumple, sin ningún esfuerzo adicional, la práctica totalidad de los requisitos de la acuicultura orgánica (NaturlandR, 2013). Los sistemas AMTI en tierra deberían centrarse en el valor económico añadido de los productos de las algas marinas, en lugar de sólo en la reducción de la degradación ambiental asociada con el cultivo de peces (Kim *et al.*, 2013).

Por ejemplo, una granja de dorada - moluscos- algas en 1 ha de tierra, puede producir 25 toneladas de pescado, 50 toneladas de bivalvos y 30 toneladas de peso fresco de algas al año. Otro modelo de granja puede producir en 1 ha, 55 toneladas de dorada o 92 toneladas de salmón, con 385 o 500 Tm de peso fresco de algas, respectivamente y sin

contaminación (Neori *et al.*, 2004). Por lo tanto, los sistemas integrados en general, y los sistemas basados en algas, en particular, están obligados a jugar un papel importante en la expansión sostenible de la acuicultura mundial. (Neori *et al.*, 2004).

1.3 Cultivo intensivo de macroalgas

La selección de las especies de macroalgas a utilizar como biofiltro depende de dos aspectos fundamentales: su capacidad fisiológica para crecer en las condiciones de cultivo con niveles altos de nutrientes, especialmente amonio y el interés comercial de su biomasa o de los productos derivados de ella (Buschmann *et al.*, 2001; Chopin *et al.*, 2001). Las posibilidades de control de las técnicas de cultivo han sido mejoradas con el objetivo principal de obtener biomásas de algas que presentan cualidades específicas (Lobban y Harrison, 1994).

Los principales problemas del cultivo intensivo en tanques al aire libre son las variables físicas que incluyen la estructura del sistema de cultivo, las características del agua de mar, tales como la velocidad, la aireación y la salinidad de ésta, características de la luz, como la cantidad y la calidad, y por último la temperatura. Las variables químicas incluyen la composición de nutrientes y el régimen de aplicación, así como el carbono inorgánico suministrado a los cambios de pH involucrados. Las variables biológicas incluyen la densidad de algas, la competencia de algas epífitas, pastaje por herbívoros o la contaminación bacteriana. (Friedlander y Levy, 1995).

Los factores físicos y químicos influyen en la composición bioquímica, el estado fisiológico y estructura de micro y macroalgas. El nitrógeno es uno de los nutrientes limitantes más importantes en el medio marino (Hanisak, 1983). El control del nitrógeno es crítico para el cultivo intensivo de algas debido a su papel en el crecimiento, y la regulación del metabolismo (Smit *et al.*, 1997). Por otra parte existe una estrecha relación entre el nitrógeno inorgánico, la fotosíntesis y el metabolismo de carbono (Turpin, 1991). El nitrógeno almacenado previamente en algas se utiliza en el crecimiento cuando N se convierte

en limitante o cuando la luz o la temperatura aumenta (Duke *et al.*, 1986; Coutinho y Zingmark, 1993).

Para poder interpretar los resultados obtenidos en los sistemas de cultivo y biofiltración con macroalgas, conceptos como la eficiencia de asimilación de nutrientes (uptake efficiency - UE) y la tasa de asimilación de nutrientes (uptake rate - UR) deben ser bien entendidos (Buschmann *et al.*, 2001, Troell *et al.*, 2003). La eficiencia de asimilación de un nutriente, por ejemplo, nitrógeno (NUE), se define como la reducción (%) en la concentración del nutriente, mientras que la tasa de asimilación (NUR) es la concentración de un nutriente asimilado/eliminado por unidad de tiempo y superficie/volumen. Ambos conceptos varían dependiendo de las condiciones ambientales que afecten al sistema de cultivo en un periodo determinado, pero también de variables de cultivo como la profundidad del tanque, la densidad de inoculación o la tasa de renovación del medio. La idea es obtener descargas de aguas limpias, la eficiencia de eliminación es un buen indicador, pero si el objetivo es aumentar la producción de biomasa dando como resultado una menor reducción de los nutrientes, la tasa de asimilación/eliminación es el parámetro a controlar (Buschmann *et al.*, 2001; Gómez Pinchetti *et al.*, 2011).

El uso de la fluorescencia de la clorofila es una técnica efectiva para detectar rápidamente diferentes situaciones de estrés en los cultivos de algas. En particular, el rendimiento cuántico óptimo de algas puede ser monitorizado regularmente como una alerta temprana del estrés fisiológico en los cultivos (Figueroa *et al.*, 2006). La actividad fotosintética es uno de los parámetros monitorizados más utilizados en la investigación del estrés de las algas (Schreiber *et al.*, 1986), ya que la tasa fotosintética se ve afectada por la temperatura, alta irradiancia (de PAR), la radiación ultravioleta, salinidad, etc (Franklin y Forster, 1997; Häder y Figueroa, 1997). La medida de la fluorescencia de la clorofila en vivo es una técnica no intrusiva alternativa para la determinación rápida de la actividad fotosintética en plantas superiores (Schreiber *et al.*, 1986). En la actualidad se está utilizando ampliamente en los sistemas de cultivo, tanto de cianobacterias y microalgas, como de macroalgas (Büchel y

Wilhelm, 1993; Schreiber *et al.*, 1995; Flaming y Kromkamp, 1998; Figueroa y Gómez, 2001; Villafane *et al.*, 2003). Mata *et al.* (2006) realizaron mediciones de fluorescencia de clorofila “*in situ*” en los cultivos integrados de macroalgas para la biofiltración de efluentes de estanques piscícolas.

1.4 Co- cultivo de algas

Hay varios factores que influyen en la relación de competencia entre dos especies, incluyendo la nutrición, la temperatura, y nutrientes que generan. La inhibición de la asimilación de nitrógeno durante el co-cultivo o el efecto de la temperatura son elementos determinantes en la capacidad de competir entre dos especies en condiciones eutróficas (Zhang *et al.*, 2013). La explotación y la interferencia de la competencia se han utilizado para explicar la sucesión de algas entre dos especies. El modelo de competencia explotación (exploitation competition model) propone que la competencia por los recursos limitados similares da la sucesión de especies, mientras que el modelo de interferencia propone que los propios competidores causan estos efectos secundarios (Zhang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que muchos factores están involucrados en la competencia de especies tales como la nutrición, la densidad de las especies, luz, temperatura y compuestos orgánicos / inorgánicos en el ecosistema natural del agua.

Aunque muchos factores ambientales podrían afectar a la sucesión de las algas, la relación de competencia entre algas parece inconsistente, incluso contradictorias, debido a la variación de las especies de algas y condiciones de cultivo. La alelopatía (a través de sustancias que generan inhibición o estimulación del crecimiento) se ha observado en diversas interacciones p.e entre las bacterias y el fitoplancton (Imai *et al.*, 2001; Kitaguchi *et al.*, 2001). Existe una variedad de sustancias aleloquímicas liberadas durante el crecimiento de las algas (aminoácidos, enzimas, lípidos, vitaminas y toxinas) que podría influir en el crecimiento de otras especies de algas dentro del mismo entorno (Fogg, 1971; Zheng *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

La idea de que una combinación de organismos (en el mismo sistema al mismo tiempo) es mejor que un único organismo está ganando aceptación. Por ejemplo, cuando se cultiva como monocultivo, las microalgas *Rhodospseudomonas sphaeroides* ni *Chlorella sorokiniana* podrían eliminar simultáneamente propionato, amoníaco, nitrato y fosfato a partir de agua residual sintética, mientras que en un cultivo mixto sí han sido determinadas (Ogbonna *et al.*, 2000).

La disponibilidad de luz y el fotoperiodo representan dos factores importantes que afectan a la productividad. Este último está fuertemente influenciado por la mezcla. La mezcla evita la sedimentación y la estratificación térmica, la formación de nutrientes y gradientes de pH, el agotamiento de dióxido de carbono en la superficie del estanque y la mejora del despojo de sobresaturación de oxígeno (Richmond, 2003). Sin embargo, se espera que el efecto de la mezcla en fotoperiodo sea más relevante en cultivos densos de algas en los que existe un gradiente de luz. Por otra parte, no todos los organismos responden positivamente al aumento de la mezcla (Torzillo *et al.*, 2003). La agitación tiene un efecto positivo en la productividad de la biomasa, pero el aumento de la agitación no influye en la eliminación de cualquiera de P o N. Así mismo, el aumento de la mezcla no afecta a la absorción de amoníaco (Martínez *et al.*, 2000; Silva-Benavides y Torzillo, 2012).

La composición y la dinámica de las comunidades de algas están influenciadas no sólo por factores ambientales físicos y químicos, sino también por las interacciones entre los miembros de estas comunidades. La señalización química compleja, conocida como la alelopatía, incluye una serie de metabolitos secundarios que pueden actuar como reguladores positivos o negativos del crecimiento de especies simpátricas. Como tal, la alelopatía puede ser considerada como una adaptación para lograr una ventaja competitiva sobre otros miembros de la misma comunidad o tanque (Legrand *et al.*, 2003; Gantar *et al.*, 2008).

1.5 Valoración y aplicación de la biomasa:

En los últimos años, a medida que la producción de macroalgas en sistemas de cultivo aumenta, el interés por las posibilidades comerciales/industriales de la biomasa y sus productos derivados ha aumentado tanto en la industria alimentaria y nutracéutica, como en cosmética y biomedicina y los sectores agrícolas y hortícolas. Los compuestos de particular interés comercial incluyen pigmentos, lípidos y ácidos grasos, proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos.

Tabla I: Aplicaciones actuales de las algas rojas.

Especies	Aplicaciones	Referencias
<i>Gracilaria Spp.</i>	Alimento animal (Haliotis) y ficocoloides (agar)	(Redmond <i>et al.</i> , 2014).
<i>Chondrus crispus</i>	Alimentación y ficocoloides (carragenatos)	(Redmond <i>et al.</i> , 2014).
<i>Porphyra/Pyropia</i>	Alimentación humana	(Redmond <i>et al.</i> , 2014).
<i>Grateloupia turuturu</i>	Alimentación y cosmética.	(Denis <i>et al.</i> , 2010).
	Agente antimicrofouling	(Plouguerné <i>et al.</i> , 2008)
	Actividad antiviral	(Hudson <i>et al.</i> , 1999)
	Presencia de PUFAs (EPA). α -tocoferol (vitamina E), fitonadiona (vitamina K1), y escualeno. Presencia fitosteroles, riqueza en glicolípidos.	(Kendel .M <i>et al.</i> , 2013)

1.5.1 Recursos para acuicultura

Además de la evolución reciente de la biomasa de algas como micro o macro nutriente en la alimentación animal (formulado en ganado terrestre y especies de la acuicultura), las microalgas son una fuente de alimentación directa o indirecta importante para las etapas tempranas del desarrollo de muchas especies de peces, crustáceos e invertebrados cultivados. Los criaderos suelen cultivar microalgas. Las diferentes cepas de micro y macroalgas varían su eficacia dentro de los alimentos para animales. Existen evidencias suficientes de buenas propiedades nutricionales para promover la biomasa de algas como fuente de micronutrientes o como piensos a granel. Los altos costes económicos de la biomasa de algas en comparación con los alimentos de productos básicos limitan actualmente su uso comercial para aplicaciones de alimentación de los animales locales; mayor disponibilidad/precio menor (Shields y Lupatsch, 2012).

Los cultivos de microalgas han sido durante mucho tiempo parte integrante de la producción de los criaderos de muchos peces de piscifactoría, crustáceos y otras especies acuícolas de importancia comercial. Por el contrario, las macroalgas son menos utilizadas en la acuicultura aunque sí proporcionan una importante fuente de nutrición para ciertos invertebrados cultivados, como los erizos de mar y el abalón. Los suministros finitos de materias primas de primera calidad (sobre todo harina de pescado y aceite de pescado) y la promesa de una mayor disponibilidad de biomasa de algas hacen de este un punto importante (Shields y Lupatsch, 2012).

Recientes descubrimientos indican un buen potencial para la biomasa de algas como alimento a granel para el formulado en dietas de acuicultura, sin embargo, la futura viabilidad comercial de este dependerá de la cantidad disponible, la calidad (composición) y el coste en relación con los materiales utilizados actualmente en los productos básicos (Shields y Lupatsch, 2012).

Incluso cuando se utiliza en pequeñas cantidades en ganado y alimentos para la acuicultura, las algas han sido descritas como

estimuladoras del sistema inmune (Turner *et al.*, 2002), el metabolismo de los lípidos (Nakagawa, 1997; Güroy *et al.*, 2011), la acción antiviral y antibacteriana, la mejora la función intestinal (Michiels *et al.*, 2012), la resistencia al estrés (Nath *et al.*, 2012; Sheikhzadeh *et al.*, 2012) además de proporcionar una fuente de proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales, y otros fitoquímicos biológicamente activos (Pulz y Gross, 2004 ; Becker, 2004; Gouveia *et al.*, 2008).

El principal problema es la gran cantidad de biomasa necesarias. La biomasa algal no es considerada como una fuente de alimento esencial, sino más bien su incorporación en la mejora de la formulación de alimentos. La biomasa de algas ofrece principalmente una fuente complementaria en lugar de un reemplazo completo de los minerales manufacturados o vitaminas en la alimentación animal. (Shields y Lupatsch, 2012). Por ejemplo, minerales de algas se han incorporado en la dieta del salmón en un 15% en lugar de la vitamina y mineral de la premezcla fabricada (Kraan y Mair, 2010). Diferentes pruebas sugieren que los salmones alimentados con algas parecían ser más sanos, más activos, con mejor sabor y textura, lo que puede haber sido debido a los compuestos bromofenólicos encontrados en las algas marinas. Cuando se añade a los alimentos de las gallinas ponedoras, influye positivamente en el grosor de la cáscara de huevo y el peso del huevo (Michalak *et al.*, 2011).

Un ejemplo de alga roja utilizada en acuicultura es *Palmaria palmata*. Conformar una dieta importante para *H. tuberculata* y *H. discus hannai*. El análisis de ácidos grasos revela que se caracteriza por poseer una gran cantidad de 20:5 *n*-3 (Mai *et al.*, 1996).

1.5.2 Pigmentos

Los procesos de captación de luz de todas las algas fotoautótrofas implican clorofilas (todos los grupos poseen clorofila a) y diversos grupos de pigmentos accesorios que son específicos para determinados grupos de algas, con principales grupos delimitados por la presencia de ficobilinas, y carotenoides. Las algas verdes tiene la misma proporción

de clorofila a y b que las plantas terrestres (Lobban y Wynne, 1981). El color rojo de las algas rojas es principalmente producido por la acumulación de ficoeritrina (Lobban y Wynne, 1981).

Los carotenoides se dividen en carotenos y xantofilas. El caroteno que se encuentra más frecuentemente es el β -caroteno, pero carotenos ϵ - α y están presentes en algunas cianobacterias. Xantófilas comunes incluyen astaxantina, fucoxantina y zeaxantina, todas de alto valor comercial (Prasanna *et al.*, 2007). Varios carotenoides, incluyendo xantófilas, similares a los presentes en las plantas superiores (Demmig-Adams, 1990), están involucrados en la fotoprotección. Las xantófilas varían considerablemente según la luz ambiente (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006; Dimier *et al.*, 2007).

Tabla II: Aplicaciones de los carotenoides.

Pigmento	Actividad	Referencia
Carotenos	Poder antioxidante	(Sachindra <i>et al.</i> , 2007; Prasanna <i>et al.</i> , 2010)
	Actividad anti-cancerígena	(Nishino <i>et al.</i> , 2002; Hosokawa <i>et al.</i> , 2004)
Fucoxantina	Actividad anti-cancerígena	(Hosokawa <i>et al.</i> , 2004)
	Anti-obesidad	(Maeda <i>et al.</i> , 2005)
Luteína, zeaxantina y cantaxantina	Alimentación de aves de corral	(Pulz y Gross, 2004)
Astaxantina	Colorante en la acuicultura	(Pulz y Gross, 2004; Kalinowski Herrera, 2006)
	Salud humana y nutrición	(Hussein <i>et al.</i> , 2006; Vilchez <i>et al.</i> , 2011)

Las ficobiliproteínas (ficoeritrinas, ficocianinas y aloficocianinas) tienen una larga tradición de uso como colorantes en alimentos, cosméticos y como marcadores fluorescentes en la investigación

biomédica. También presentan actividades antioxidantes y de depuración de radicales (varios tipos de tumores), propiedades anti-cáncerígenas y anti-inflamatorias (Eriksen, 2008; Sekar y Chandramohan, 2008; Prasanna *et al.*, 2010;).

En acuicultura, la astaxantina puede utilizarse, por ejemplo, en los peces salmónidos cultivados para lograr el color rosado del filete. Se utilizan carotenoides sintéticos principalmente para este fin en la acuicultura comercial, aunque los carotenoides derivados de algas también pueden generar una pigmentación más eficaz (Choubert y Heinrich, 1993; Soler - Villa *et al.*, 2009). La astaxantina obtenida de *Haematococcus pluvialis* ha sido aprobada como un aditivo de color en los alimentos de salmón y se utiliza normalmente para la producción de salmón con certificado orgánico (Soler - Villa *et al.*, 2009). Aparte de los salmónidos, la mayoría de las especies de peces de piscifactoría presentan pigmentación de la piel, lo que contribuye a su aspecto atractivo y por lo tanto satisface la demanda del cliente. *H. pluvialis* se ha demostrado que tiene éxito en el aumento de la coloración de la piel rojiza del Pargu o bocinegro, *Pagrus pagrus* (Kalinowski Herrera, 2006; Chatzifotis *et al.*, 2011) y también de los peneidos, *Litopenaeus vannamei* (Parisenti *et al.*, 2011). Ambas fuentes naturales y sintéticas de los carotenoides se han utilizado con éxito para aumentar la coloración de la piel amarilla en la dorada (Gomes *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2002). *Chlorella* sp. y *Spirulina* sp. se incorporan habitualmente en los piensos para peces ornamentales, donde la coloración y aspecto saludable es el criterio principal del mercado (Gouveia y Rema, 2005; Sergejevová y Masojídek, 2011; Zatkova *et al.*, 2011).

Las algas son el alimento preferido de los erizos de mar en la naturaleza y en el ambiente de la acuicultura, las fuentes ricas en carotenoides, tales como *Ulva* sp. y *Gracilaria* sp. son necesarias para mejorar el color naranja de las gónadas como los consumidores prefieren (Shpigel *et al.*, 2005).

La biomasa de algas aumenta la pigmentación de la yema de huevo de los pollos de engorde cuando se usa a un nivel de inclusión en la dieta de 15% (Strand *et al.*, 1998). La biomasa de *Chlorella vulgaris* produce

una pigmentación en la yema comparable a otros pigmentos utilizados comercialmente (Gouveia *et al.*, 1996). *Chlorella* no sólo se relaciona con la mejora del estado de salud de las gallinas ponedoras, sino también con la mejora de la calidad del huevo y su pigmentación (Halle *et al.*, 2009). *H. pluvialis* también tiene un buen potencial como un potenciador del pigmento natural en pollos de engorde (Waldenstedt *et al.*, 2003; Shields y Lupatsch, 2012).

1.5.3 Antioxidantes

Las algas marinas han sido descritas como productoras de una amplia variedad de compuestos bioactivos, muchos de los cuales tienen aplicaciones comerciales en productos farmacéuticos, médicos, cosméticos, nutracéuticos, alimentos y la agricultura. Los antioxidantes naturales que se encuentran en muchas algas son compuestos bioactivos que desempeñan un papel importante contra varias enfermedades y procesos de envejecimiento mediante la protección de las células del daño oxidativo (Kelman *et al.*, 2012).

Las algas producen un conjunto diverso de compuestos que funcionan como sistemas de defensa químicos, facilitando su supervivencia en ambientes extremadamente competitivos. Las algas marinas en hábitats de aguas poco profundas pueden estar expuestas a una combinación de luz ultravioleta y aire que conduce fácilmente a la formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de su exposición perjudicial, las algas sanas carecen de daño oxidativo en sus componentes estructurales (es decir, en sus ácidos grasos) y resisten la oxidación durante el almacenamiento, lo que indica la presencia de antioxidantes protectores de sistemas de defensa en sus células. Al donar un electrón, los antioxidantes neutralizan los radicales libres que de otro modo oxidarían las biomoléculas que conducen a la muerte celular y al daño tisular. En consecuencia, el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales de algas se ha incrementado en los últimos años. El objetivo general de este tipo de investigación es el descubrimiento de compuestos que pueden contrarrestar procesos libres de estrés oxidativo inducido por radicales y otros, y al hacerlo, reducir la

incidencia de enfermedades humanas directamente relacionadas con estos procesos (Kelman *et al.*, 2012).

La actividad antioxidante se ha demostrado en numerosos géneros de algas marinas, incluyendo *Ahnfeltiopsis*, *Colpomenia*, *Gracilaria*, *Halymenia*, *Hydroclathrus*, *Laurencia*, *Padina*, *Polysiphonia* y *Turbinaria*. Los compuestos antioxidantes detectados en las algas de estos géneros y otros tienen el potencial anti-envejecimiento, la dieta, anti-inflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, citotóxicos, anti-malaria, anti-proliferativa y propiedades anticancerígenas (Kelman *et al.*, 2012).

Laurencia spp., aunque es una buena fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos, no exhiben alta actividad antioxidante. Las algas pardas son estadísticamente las más activas (Kelman *et al.*, 2012).

1.5.4 Otros productos derivados de macroalgas

Los principales constituyentes de polisacáridos de algas rojas son galactanos tales como carragenina (hasta 75 % en peso seco) y agar (hasta 52 %), siendo los polisacáridos comercialmente más importantes para las algas rojas (Lobban y Wynne, 1981; McHugh, 2003). Los carragenanos se pueden obtener fácilmente mediante la extracción de algas rojas o disolviéndolos en una solución acuosa (McHugh, 2003). Carrageninas comerciales se han originado a partir de *Chondrus*, *Gigartina* y *Eucheuma* sp. (Vera *et al.*, 2011). El agar se produce a partir de *Gracilaria*, *Gelidium* y *Pterocladia* sp. tratándolas con ácido/calor o álcali (McHugh, 2003).

Tabla III: Otras utilidades de la biomasa de algas roja

Productos	Sustancias	Utilidades	Referencias
Polisacáridos	Carragenatos	Formación de solución espesa o gel	(Lobban y Wynne., 1981)
		Ingrediente esencial en la pasta de dientes	(McHugh., 2003)
	Agares	Hidrocoloides en la alimentación, farmacéutica y las industrias biológicas	(Bixler y Porse., 2011)
		Ingredientes alimentarios, laxante en la industria farmacéutica y como un producto químico para probar la presencia de bacterias	(McHugh., 2003)
	carragenina	Aditivos alimentarios para los productos lácteos , la carne, a base de agua y alimentos para mascotas	(McHugh., 2003)
	carragenina y sus oligosacáridos derivados	Aumentan la capacidad inmune de las plantas terrestres contra los patógenos mediante la activación de vías de señales en las plantas	(Vera et al., 2011)
	sulfatado polisacáridos tales como carragenato y galactano	Antitrombótico, antiviral, inmunoinflamatoria, antilipidémica y las actividades antioxidantes	(Jiao et al., 2011).
Ácidos grasos volátiles (AGVs)	Acético, propiónico , láctico, los ácidos butírico	Producción de productos químicos y combustibles	(Chang et al., 2010)
Aminoácidos	Ácido glutámico	Subproductos de biorrefinería	(Lammens et al., 2012)

1.5.5 Biorefinería

En las últimas décadas, el mundo se ha enfrentado a problemas económicos y medioambientales cruciales como el agotamiento de los combustibles fósiles y el cambio climático. Estos problemas han llevado a la expansión de la investigación y el desarrollo (I + D) en energías alternativas, con alta capacidad de renovación y sostenibilidad. Como dirección de la I + D, se ha puesto de relieve la biorefinería como una posible solución para escapar de la economía basada en combustibles fósiles (Ragauskas *et al.*, 2006).

Las macroalgas han atraído recientemente la atención como una posible materia prima para bio-refinería, por contener diversos hidratos de carbono que son claramente diferentes de los de las biomásas

terrestres. Evaluaciones exhaustivas de la refinera con sede en macroalgas son esenciales para determinar si la aplicación de tecnologías de base terrestre de macroalgas o el desarrollo de tecnologías completamente nuevas es factible. Hasta la fecha, las tecnologías de conversión de macroalgas para bioquímicos y biocombustibles demuestran que la bioingeniería molecular contribuiría al éxito de la biorrefinera basada en macroalgas. Se requiere más investigación para el aprovechamiento de macroalgas como una nueva biomasa prometedora para la economía baja en carbono (Jung *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta el cultivo actual y la demanda del mercado, la tecnología basada en la biorefinera de macroalgas debe centrarse en la utilización de las algas pardas y rojas en lugar de las algas verdes (FAO, 2012).

La digestión anaeróbica se puede aplicar a la producción de biogas, en particular del metano procedente de diversas macroalgas (Gupta *et al.*, 2011). La tasa de producción de metano se puede mejorar por la co-digestión de macroalgas (*Ulva* sp.) con estiércol y los desechos de lodos activos (Costa *et al.*, 2012). Mientras que la producción de biogás a partir de macroalgas es técnicamente más viable que para otros combustibles, la producción de biogas aún no es económicamente factible debido al alto coste de las materias primas de macroalgas, que debe ser reducido en un 75 % del nivel actual (Roesijadi *et al.*, 2010).

Las macroalgas tienen diversos hidratos de carbono, tales como almidón, celulosa, laminarina, manitol y el agar. La conversión de carbohidratos a azúcares y la elección de los microorganismos apropiados son fundamentales para el éxito de la fermentación de bioetanol.

El biobutanol puede producirse a partir de macroalgas a través de la fermentación acetona-butanol (AB) utilizando bacterias anaerobias tales como *Clostridium* sp. (Huesemann *et al.*, 2012). Esta especie es capaz de producir butanol, acetona, etanol y ácidos orgánicos a partir de varios sustratos de carbono. Sin embargo, esta bacteria no puede utilizar eficazmente algunos polisacáridos a base de glucosa (tales como

manitol), lo que causa una velocidad de reacción lenta y la baja productividad de los ácidos orgánicos y disolventes totales (Huesemann *et al.*, 2012).

Para comercializar combustibles a base de macroalgas, una de las prioridades debe ser la identificación del microorganismo que puede metabolizar grandes pero únicos carbohidratos de macroalgas. Algunos hidratos de carbono específicos de macroalgas como el alginato y ulvan, no se metabolizan fácilmente por microorganismos fermentativos aplicados comercialmente, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Wegeberg y Felby, 2010). Para superar este inconveniente, algunos investigadores han desarrollado enzimas específicas para hidrolizar los hidratos de carbono de las macroalgas (Jang *et al.*, 2012). La transformación genética y la ingeniería metabólica esperan proporcionar un gran avance en el desarrollo de la tecnología de bioenergía a partir de biomasa en los próximos 10 años (Kim *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013).

2. Objetivos

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el objetivo general planteado en este trabajo es:

- Estudiar la posibilidad de desarrollar sistemas de co-cultivo de macroalgas para generar sistemas de producción de biomasa más eficientes y valorar su capacidad de crecimiento.

Mientras que los objetivos específicos son:

- Analizar el comportamiento en co-cultivo de combinaciones que incluyen las especies de algas rojas (*Hypnea musciformis*, *Hydropuntia cornea*, *Grateloupia turuturu*, *Grateloupia imbricata* y *Palisada corallopsis*) y del alga verde (*Ulva rigida*) creciendo de forma simultánea (biomasas equilibradas en el mismo tanque generando posibles relaciones alelopáticas).
- Estudiar la capacidad de biofiltración de algunas macroalgas cultivables con el planteamiento propuesto de co-cultivo que podrían resolver algunas de las limitaciones que se plantean para el desarrollo de estos sistemas de producción.
- Evaluar la capacidad fotosintética / fisiológica (nivel de estrés) de forma comparativa con cultivos unialgales considerados como sostenibles bajo las condiciones experimentales establecidas (*Hydropuntia cornea*).
- Valorar y cuantificar el contenido en pigmentos y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la biomasa producida en las diferentes condiciones ensayadas.

3. Material y Métodos

3.1 Especies, sistema y condiciones experimentales de cultivo

Las especies de macroalgas utilizadas en este estudio fueron *Ulva rigida* C. Agardh (Ulvaceae; Chlorophyta); *Hydropuntia cornea* (J. Agardh) M.J. Wynne (Gracilariaceae; Rhodophyta), anteriormente descrita como *Gracilaria cornea*; *Grateloupia turuturu* Yamada (Halymeniaceae; Rhodophyta); *Grateloupia imbricata* Holmes (Halymeniaceae; Rhodophyta) e *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux (Cystocloniaceae; Rhodophyta) para el experimento A.

En el experimento B, las macroalgas usadas fueron *Ulva rigida*; *Hydropuntia cornea* y *Palisada corallopsis* (Montagne) Sentíez, Fujii & Díaz, anteriormente descrita como *Laurencia corallopsis*.

3.1.1 Taxonomía de las especies:

En las tablas IV-IX, se observan las características taxonómicas de las especies utilizadas en los ensayos realizados. Las claves utilizadas para la determinación de las especies fueron Afonso-Carrillo y Sansón (1989).

Tabla IV: Taxonomía *Ulva rigida*

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Ulva rigida</i> <i>C. Agard</i>	Chlorophyta	Ulvophyceae	Ulvales	Ulvaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>Talos laminares inicialmente redondeados lobulados y a medida que se hacen más viejos su morfología es variable, suelen ser 3 veces más largos que anchos pudiendo alcanzar 30cm de longitud. El fronde no presenta huecos ni tiene râmulas en la base del talo. Margen de la lámina presenta dientes microscópicos. Talo distromático, las células generalmente presentan de 2 a 3, a veces hasta 4 pirenoides. En sección transversal las células basales son rectangulares de 2 a 4 veces más altas que anchas. Las células de la zona media del fronde miden (11)14(-17) μm de ancho y (15)18(-22) μm de largo. (Lobban, C.S, 1994)</p> <p>Presente en todo el el archipiélago canario (Haroun <i>et al.</i>, 2002).</p>				



Tabla V: Taxonomía *Hydropuntia cornea*.

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Hydropuntia cornea</i> J. Agardh	Rhodophyta	Florideophyceae	Gracilariales	Gracilariaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>La segregación de <i>Hydropuntia</i> y <i>Gracilariopsis</i> de <i>Gracilaria</i> se hizo de acuerdo a las diferencias existentes entre el origen y localización de los espermatangios, el aspecto y formación del cistocarpo y sus filamentos nutritivos. En el presente trabajo, se ha ensayado con un clon de <i>Gracilaria cornea</i> traído de Israel hace más de 20 años a las instalaciones del Banco Español de Algas y que se ha cultivado desde entonces sin haber observado ningún tipo de desarrollo ni estructura reproductora en él. Su multiplicación es vegetativa. Aceptamos la identificación original de este alga como <i>Hydropuntia cornea</i> (J. Agardh) Wynne (sinónimo heterotípico de <i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh, Sp. Gen. Ord. Alg. 2(2): 598. 1852)</p> <p>Talos cilíndricos, cartilaginosos, de color rojo - pardo y en ocasiones verdes. El fronde alcanza un tamaño de 20-21 cm de altura y presenta una ramificación irregular alterna a veces pinnada. Las ramiúlas presentan ápices agudos. El eje principal presenta un grosor de entre 2 y 3 mm cerca de la base con una ramificación profusa con algunos extremos apicales entrelazados. El diámetro del talo disminuye hacia el ápice. En un corte transversal se observan dos zonas bien diferenciadas, el córtex formado por 3 capas de pequeñas células dispuestas radialmente. La zona medular es compacta y presenta células no pigmentadas de 27 -30 µm de diámetro. [Lobban, C.S., 1994]</p> <p>Especie introducida en Canarias</p>				



Tabla VI: Taxonomía *Grateloupia turuturu*

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Grateloupia turuturu</i> Yamada	Rhodophyta	Florideophyceae	Halymeniales	Halymeniaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>Talo laminar fijado al sustrato por un pequeño disco basal de 5- 15 mm de diámetro del que surge un largo estipe de hasta 2 cm de largo que se ensancha gradualmente en una lámina lanceolada de 10 a 35 cm de longitud. Presenta ápices agudos. Las láminas presentan grandes variaciones en forma y tamaño, y pueden desarrollar proliferaciones secundarias en zonas que han sido erosionadas. Las proliferaciones marginales están presentes y suelen ser abundantes. El talo en su zona media tiene un grosor de entre 130 y 250 μm y presenta dos zonas bien diferenciadas, el córtex con hasta 7 filas de células que disminuyen de tamaño hacia la superficie y están ordenadas de forma dicotómica con algunas sinapsis secundarias. La médula es laxa, mucilaginosa, con filamentos celulares y células medulares estrelladas. Los gonimoblastos de 160 - 250 μm de diámetro ocupan la zona medular y se conectan con el exterior por un único poro a través del córtex. Los tetrasporocistes se localizan en el córtex. (Lobban, C.S, 1994)</p> <p>Presente en Gran Canaria y Tenerife. Se considera una especie introducida. (Haroun <i>et al.</i>, 2002; Bárbara y Cremades, J, 2004)</p>				



Tabla VII: Taxonomía *Grateloupia imbricata*

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Grateloupia imbricata</i> Holmes	Rhodophyta	Florideophyceae	Halymeniales	Halymeniaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>Talo erecto acintado o aplanado de aspecto cartilaginoso con ramificación dicotoma o subdicotoma, fijado al sustrato por un pequeño disco basal del que surge un largo estipe que se ensancha y se divide de forma dicotoma. Los talos no sobrepasan los 10 cm de longitud. Las láminas pueden desarrollar proliferaciones secundarias en zonas que han sido erosionadas. Las proliferaciones marginales están presentes y suelen ser abundantes llegando a tener a veces un aspecto corimboso. El talo en su zona media tiene un grosor de 100 - 120 μm y presenta dos zonas bien diferenciadas, el córtex con hasta 4 (6) filas de células que disminuyen de tamaño hacia la superficie y están ordenadas de forma dicotómica con algunas sinapsis secundarias. La médula es laxa, con filamentos celulares y células medulares estrelladas. Los gonimoblastos de 90 μm de diámetro ocupan la zona medular y se conectan con el exterior por un único poro a través del córtex. Los tetrasporocistes se localizan en el córtex. (Lobban, C.S, 1994)</p> <p>Presente en Lanzarote, Gran Canaria y Tenerife. (Haroun <i>et al.</i>, 2002)</p>				



Tabla VIII: Taxonomía *Hypnea musciformis*

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Hypneamusciformis</i> (Wulfen) J.V Lamouroux	Rhodophyta	Florideophyceae	Gigartinales	Cystocloniaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>Talo ramificado, cilíndrico a subcilíndrico de 280 - 300 μm de grosor con ramificación alterna o irregular, nunca pinnada. Se fija al sustrato por un pequeño disco basal aunque puede crecer enredándose entre otras algas. En sección transversal presenta una estructura pseudoparenquimatosa con un córtex consolidado, no laxo y una médula o zona central constituida por células dispuestas de forma compacta, en la que se puede distinguir una célula central que esta rodeada por células de igual o mayor tamaño, normalmente cinco. Los ápices de las râmulas son agudos en ellos se puede observar una célula apical evidente, no presentan tricoblastos hialinos. Una característica muy reseñable de este género es que algunas râmulas presentan ápices recurvados en forma de zarcillos con los que se suelen enganchar a otras algas. (Lobban, C.S, 1994)</p> <p>Común en la zona intermareal y primeros metros del submareal de Canarias. (Haroun <i>et al.</i>, 2002)</p>				



Tabla IX: Taxonomía *Palisada corallopsis*

ESPECIE	FILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA
<i>Palisada corallopsis</i> (Montagne) Sentiez, Fujii & Díaz	Rhodophyta	Florideophyceae	Ceremiales	Rhodomelaceae
CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS				
<p>Talo erecto, cilíndrico, de hasta 15 cm de largo con un córtex pseudoparenquimatoso muy desarrollado que puede llegar a medir 2 mm de diámetro, este desarrollo del córtex oculta su organización polisifonada que es sólo visible en las porciones apicales del talo. Presenta de 5 a 6 células periaxiales en los ejes terminales. Ramificación del talo variable, nunca dística o subdística y no presenta râmulas laterales uniseriadas. Las râmulas son rectas y poseen en su zona apical tricoblastos hialinos. La célula apical está situada en el fondo de una depresión apical o foseta. En visión superficial las células corticales no están interconectadas por sinapsis secundarias. En sección transversal las células corticales están dispuestas en empalizada. Las ramas espermatangiales se originan de los tricoblastos formados en las células axiales y los tetrasporangios son producidos por células periaxiales. Cistocarpos subglobosos sésiles situados en los ápices de las râmulas (Lobban, C.S, 1994).</p> <p>Esta especie presente en Canarias está actualmente bajo revisión. (Machín, M, Comunicación personal IV Congreso de Ciencias del Mar, 2014)</p>				



3.1.2 Localización de los cultivos originales:

Los cultivos originales de *Ulva rigida* e *Hydropuntia cornea* han sido mantenidos, creciendo de forma vegetativa, en los sistemas de cultivo intensivo del Banco Español de Algas (ULPGC) durante los últimos años.

El resto de las especies han sido recolectadas del medio natural, en el Municipio de Telde (Gran Canaria). *Grateloupia turuturu*, *Grateloupia imbricata* e *Hypnea musciformis* fueron recolectadas en los charcos del intermareal de la zona trasera del antiguo Instituto Canario de Ciencias Marinas (Taliarte). *Palisada corallopsis* fue recolectada en la zona intermareal derecha de la playa de Hoya del Pozo (Fig 4).

Localización



Figura 4: Localización de las zonas de recolección de las especies ensayadas en la costa del Municipio de Telde.

Todas las algas fueron lavadas, clasificadas taxonómicamente y mantenidas (separadas) con nitrógeno hasta el inicio del experimento.

3.1.3 Sistema de cultivo:

El sistema de cultivo utilizado en el experimento incorpora un modelo en el que se realiza el trasvase de nutrientes desde un tanque con amonio y fosfato concentrado, representando los contenidos en nutrientes provenientes del cultivo intensivo de dorada (*Sparus aurata*), principalmente nitrógeno y fósforo disueltos en forma de amonio (N-NH_4^+) y fosfato (P-PO_4^{3-}). Se analiza la calidad de los efluentes obtenida después de su paso en flujo continuo a través de los tanques para el cultivo intensivo de macroalgas. El agua de mar se obtiene mediante bombeo directo del mar y se dirige al tanque virtual, previo paso por un sistema de filtros de arena.

Durante el periodo experimental, sin la posibilidad de mantener peces de forma regular, se estableció un “modelo virtual” (de acuerdo a los modelos descritos por: Porter *et al.*, 1987; Losordo y Westers, 1994), en el que a partir de una solución concentrada de cloruro de amonio y fosfato de potasio se realiza un aporte con concentraciones y flujos controlados, para simular la presencia de peces a una densidad de 20 Kg m^{-3} y tasas de renovación de agua entre 6 – 8 vol d⁻¹, a partir de un tanque de decantación para la separación de la materia particulada, previo al bombeo hacia el biofiltro de macroalgas. Desde el tanque de decantación el agua es bombeada directamente a los tanques de macroalgas.

Para el presente trabajo, el sistema de biofiltración y cultivo de macroalgas fue organizado con tanques circulares de cultivo construidos de polietileno de alta densidad (Allibert Manutención, Barcelona), con un volumen de 90 l (0,09 m³) y una superficie aérea de 0,2 m² (S:V = 2,2 m⁻¹). La aireación (bombas ELMO model 2BH 1600, Siemens, Alemania) para la rotación de la biomasa es suministrada a través de un tubo de polietileno lineal situado en el fondo del tanque. El flujo abierto de agua se mantiene a través de un desagüe situado en la parte superior del tanque y cubierto con una malla para evitar el escape de algas.

Nueve tanques fueron mantenidos bajo condiciones de invernadero en donde se transmite el 80% de la radiación PAR incidente en la cubierta,

el 10% UVA y 0% de la UVB. Los datos de irradiación (radiación global) fueron obtenidos de forma permanente con un piranómetro Kípp & Zonen modelo CM21 equipado con un sensor CSD3. Los datos utilizados corresponden a dosis diaria acumulada ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$). Con lo que se calcularon las dosis de radiación global medias semanales.

Los datos de temperatura del agua fueron medidos con sensores Hobo UTBI-001 (Onset Computer Co., USA) N° de serie 1195577 programados a intervalos de 30 min.

3.1.4 Condiciones experimentales:

Para establecer el efecto del co-cultivo sobre los parámetros experimentales se realizaron dos diseños que fueron desarrollados en periodos consecutivos:

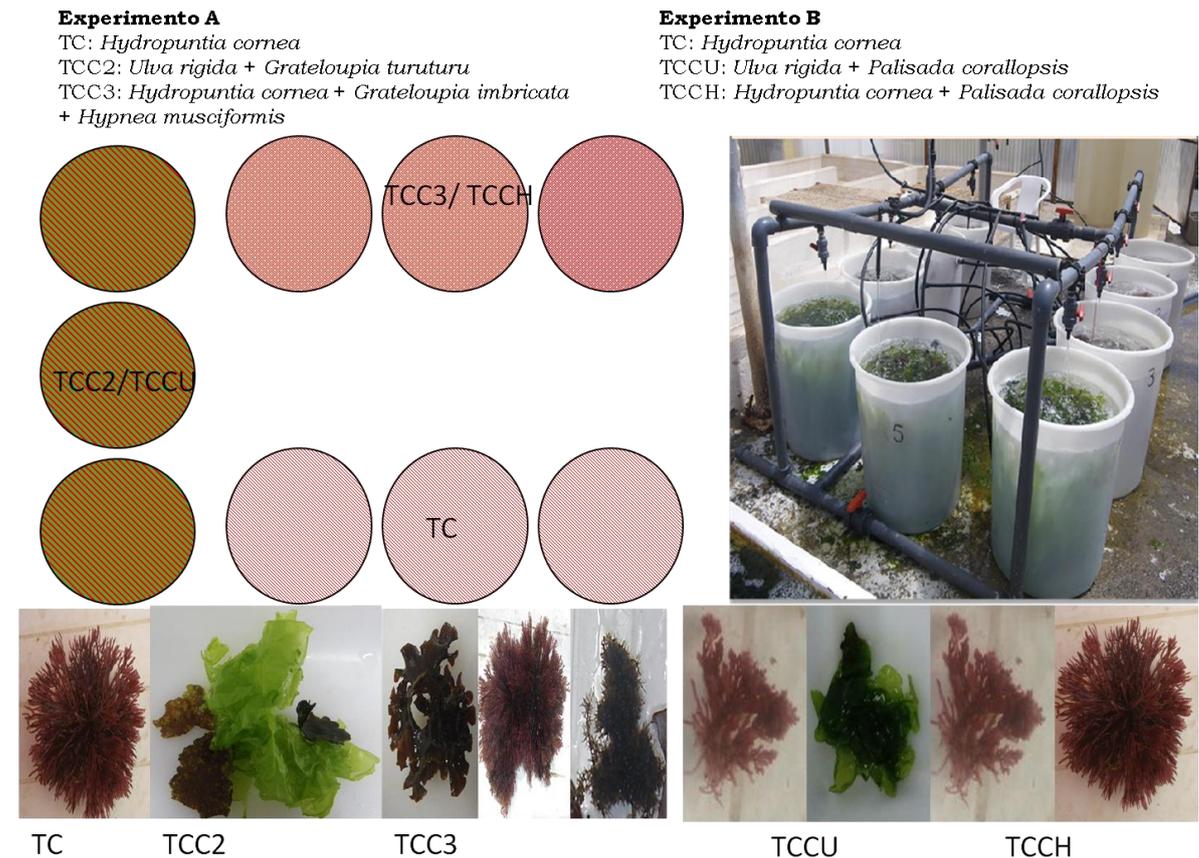


Figura 5: Diseños experimentales.

Experimento A: Se establecieron 3 tanques control con *Hydropuntia cornea*, 3 tanques de co-cultivo con *Ulva rigida* y *Grateloupia turuturu* y 3 tanques de co-cultivo con *Hydropuntia cornea*, *Grateloupia imbricata* e

Hypnea musciformis. El periodo de cultivo fue de 10 semanas establecidas entre el 23 de julio del 2013 hasta el 8 de octubre del 2013. Durante las seis primeras semanas, los 9 tanques fueron mantenidos con agua proveniente del tanque de decantación, enriquecida con N – amonio y P-fosfato, en flujo abierto con una tasa de renovación de 15 vol. d⁻¹ (1,8 l min⁻¹), bajo las mismas condiciones. La tasa de renovación de agua fue regulada diariamente. Posteriormente y durante las semanas 7-8, se estableció un periodo de limitación de nutrientes (SW) de dos semanas de duración con flujo continuo de agua de mar, sin adición extra de nutrientes. Las siguientes dos semanas (semanas 9-10) fueron nuevamente mantenidos con agua proveniente del tanque de decantación, enriquecida con N – amonio y P-fosfato, en las mismas condiciones.

Experimento B: Se establecieron 3 tanques control con *Hydropuntia cornea*, 3 tanques de co-cultivo con *Ulva rígida* y *Palisada corallopsis* y 3 tanques de co-cultivo con *Hydropuntia cornea* y *Palisada corallopsis*. El periodo de cultivo fue de 7 semanas establecidas desde el 22 de octubre del 2013 hasta el 10 de diciembre del 2013. Durante las cuatro primeras semanas, los 9 tanques fueron mantenidos con agua proveniente del tanque de decantación, enriquecida con N – amonio y P-fosfato, en flujo abierto, con una tasa de renovación de 15 vol. d⁻¹ (1,8 l min⁻¹), bajo las mismas condiciones. La tasa de renovación de agua fue regulada diariamente. Las tres semanas posteriores (semanas 5-7) se estableció un periodo de limitación de nutrientes con flujo continuo de agua de mar, sin adición extra de nutrientes. La tasa de renovación fue regulada diariamente.

3.2 Determinación de la producción y la tasa de crecimiento

Los tanques fueron cosechados semanalmente. La biomasa fue separada por especies y ajustada a las densidades volumétricas óptimas, determinadas previamente para los tanques utilizados; 9 g l⁻¹ para *Hydropuntia cornea* y 5 g l⁻¹ para *Ulva rigida*. (Gomez Pinchetti *et al.*, 1998)

Para experimento A, el resto de especies, la densidad fue ajustada en función de la biomasa recolectada del medio. 1,5 g l⁻¹ *Grateloupia turturu*, 2 g l⁻¹ *Grateloupia imbricata*, y 1,2 g l⁻¹ *Hypnea musciformis*.

Para el experimento B, 3 g l⁻¹ *Palisada corallopsis* en co-cultivo con *Hydropuntia cornea* y 1,7 g l⁻¹ *Palisada corallopsis* en co-cultivo con *Ulva rigida*.

Después de escurrir la biomasa cosechada para la obtención del peso fresco escurrido (PF) la Producción fue calculada de acuerdo a DeBoer y Ryther (1977):

$$P \text{ (g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = [(Pt - P0) / t] * (PS/PF) / A$$

donde:

Pt - P0; excedente en gramos de PF, a los *t* días

PS/PF; relación peso seco / peso fresco escurrido

A = Área superficial del tanque de cultivo en m²

Las relaciones PS/PF fueron determinadas para cada especie con muestras secadas en la estufa a 60°C hasta obtener el peso constante.

La tasa de crecimiento neta fue calculada de acuerdo a D'Elia y DeBoer (1978):

$$\mu \text{ (% d}^{-1}) = 100 * \text{Ln (Pt / P0) / t}$$

donde:

Pt; peso fresco de la biomasa alcanzada en *t* días

P0; peso fresco de la biomasa inicial

3.3 Biofiltración de amonio y fosfato

Semanalmente, el día posterior al cosechado y reajuste de los tanques, se determinaron las tasas de biofiltración de amonio y fosfato durante el periodo de enriquecimiento con nutrientes. Las muestras recolectadas en las entradas y salidas de los diferentes tanques fueron procesadas inmediatamente siguiendo los métodos colorimétricos de Parsons *et al.*, (1984). Como controles se utilizaron muestras de agua de mar. Con los resultados obtenidos se calcularon la eficiencia de eliminación de N-amonio (NUE):

$$\text{NUE (\%)} = \text{Cs/Ce} * 100$$

donde :

Cs y Ce son las concentraciones de amonio en la salida (desagüe) y en la entrada del tanque; y la tasa de asimilación de N-amonio (NUR):

$$\text{NUR (mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1}) = \text{Q} * (\text{Cs} - \text{Ce}) / \text{A}$$

donde:

Q = flujo de agua (l h⁻¹),

Ce = concentración de N-amonio en la entrada (mmol),

Cs = concentración de amonio en la salida (mmol),

A = superficie del tanque (m²).

En el experimento A, de la misma manera se calcularon PUE y PUR para los fosfatos.

3.4 Determinación del rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) del PSII como indicador de estrés (medidas de fluorescencia de la clorofila)

Para la determinación del efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre el grado de estrés de la biomasa, se utilizó un Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech, UK) con el que se determinó, *in vivo*, el rendimiento cuántico óptimo o máximo del PSII (F_v/F_m) a través de las medidas de fluorescencia de la clorofila:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

Donde F_0 , es el nivel mínimo de fluorescencia

F_m , es el nivel de fluorescencia máximo en un pulso de saturación

F_v , es la fluorescencia variable

PSII, fotosistema II

Para ello las algas fueron adaptadas a la oscuridad durante un periodo de 20 min, antes de aplicar un pulso de saturación de 2.000 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (100% de saturación) durante un intervalo de 5 s. Las medidas fueron tomadas por triplicado, dos veces por semana, tres horas al día (9:00, 11:00 y 14:00), durante el periodo experimental.

Para la determinación del grado de estrés de la biomasa, en el experimento B, se utilizó el JUNIOR-PAM chlorophyll fluorometer (WALZ, Alemania). Además del rendimiento cuántico óptimo o máximo, también se midió el rendimiento cuántico efectivo

$$\phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

y la tasa de transporte de electrones (relativo). $\mu\text{moles de electrones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Genty *et al.*, 1989).

$$\text{ETRr} = ((F_m' - F_s) / F_m') \times \text{PAR} (\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

Para los datos de irradiancia (PPFD: $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), se utilizó un radiómetro LI-COR 1400 equipado con un sensor esférico (SPQA).

3.5 Procesado y análisis de la biomasa

Los excedentes de la producción semanal fueron envasados al vacío y congelados a -20 °C para su análisis posterior.

3.5.1 Determinación de pigmentos:

Para la determinación de clorofila a y carotenoides totales, las muestras de 0,5 g PF fueron homogeneizadas con mortero en 4 ml de metanol. Después de centrifugar, la concentración de pigmentos fue cuantificada de acuerdo con la ecuación (Wellburn, 1994):

$$\mathbf{Cl\ a\ (\mu g\ ml^{-1}) = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4}}$$

$$\mathbf{Carotenoides\ (\mu g\ ml^{-1}) = (1000\ A_{470} - 1,63\ CLa - 104.96\ CLb)/221}$$

Para la determinación de ficobiliproteínas (ficoeritrina y ficocianina), 0,5 g de muestra fue homogeneizado en 4 ml de agua destilada. Después de centrifugar a 9.000 rpm durante 5 min a 15°C, el extracto obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (25UV/VIS Perkin Elmer) de acuerdo con las ecuaciones de Beer y Eshel (1985):

$$\mathbf{R-FE\ (mg\ ml^{-1}) = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0,20] \times 0,12}$$

$$\mathbf{R-FC\ (mg\ ml^{-1}) = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \times 0,51] \times 0,15}$$

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Para posteriores comparaciones, los datos obtenidos fueron normalizados a valores de peso seco, mg ml⁻¹ PS.

3.5.2 Determinación de la actividad antioxidante (Ensayo DPPH)

El barrido de radicales libres de los extractos de macroalgas previamente preparados para cuantificación de pigmentos, se determinó utilizando el método basado en la reducción del radical libre estable DPPH (Radical 1,1-difenil-2-picril hidrazilo), según el método de Blois (1958) tal y como se detalla a continuación. Se preparó una solución de DPPH (0.36mM) en metanol al 90% y a continuación se le añadieron 300µl del extracto de macroalgas. Antes de la lectura de absorbancia 517nm se utilizó un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Todas las pruebas y análisis se realizaron por triplicado. El porcentaje de radicales libres atrapados por las muestras de las algas o inhibición de DPPH se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - (A_{517} (\text{muestra}) / A_{517} (\text{control}))) * 100$$

3.6 Estadística:

Los datos obtenidos de los diferentes procesos y análisis fueron almacenados en hojas de Microsoft Office Excel 2007. Además se introdujeron en Sigmaplot v.12.3 para la preparación de los gráficos. El tratamiento estadístico consistió en un ANOVA de un factor (Tratamiento, ausencia o presencia de nutrientes) en IBM SPSS Statistics 21.

4. Resultados:

4.1: Evaluación de la producción y tasa de crecimiento:

Durante el experimento A (Figura 6), desarrollado entre julio y octubre, los valores diarios máximos de radiación solar alcanzaron niveles superiores a $30000 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ durante el mes de julio, para ir disminuyendo hasta valores inferiores a $15000 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en el mes de octubre

Aunque no presenta diferencias significativas, podemos observar que los valores de producción de los co-cultivos son mayores a los valores del tanque control. La tendencia de producción se correlaciona con la disminución de irradiancia. En cambio, la temperatura tuvo tendencia a subir durante el ensayo, como podemos observar en la fig 6, en la parte inferior. Los valores diarios de temperatura oscilaron entre $21 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de mínima al inicio de los experimentos en el mes de julio, a unos máximos de 30°C a inicios de octubre.

En las semanas 2 y 5 hubo problemas técnicos por rotura de la bomba y de una tubería. Provocó que el tanque de decantación quedara vacío y la concentración de amonio se incremento, reflejándose en esa semana una disminución en la producción de todos los tanques.

En las semanas 7 y 8, los cultivos estuvieron sin aporte de nutrientes, por lo que se ve una disminución en la producción. Cuando se abre de nuevo el aporte de nutrientes observamos un aumento en la semana 9 y 10.

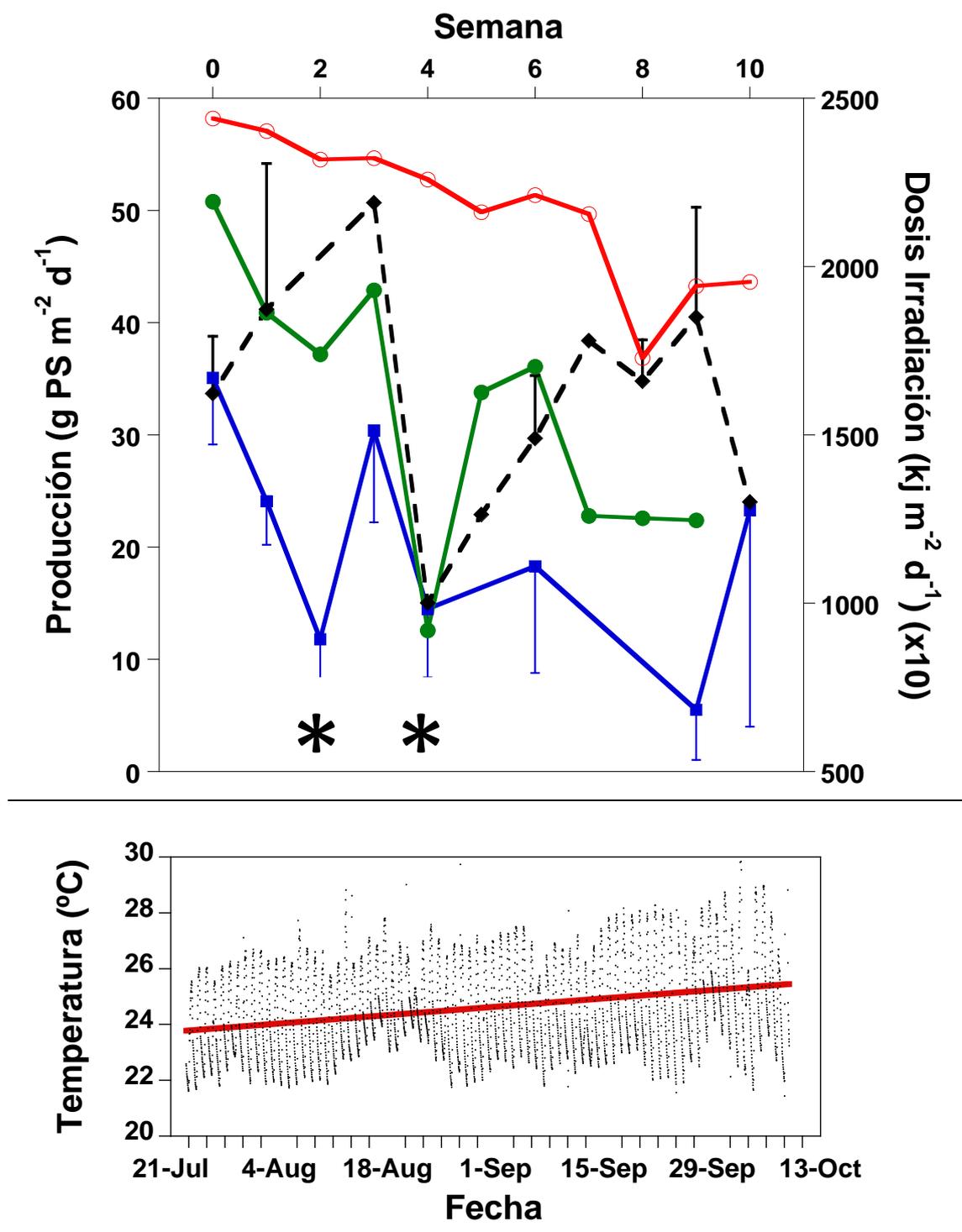


Figura 6: Experimento A: Evolución semanal de los valores de producción (A) en los diferentes tratamientos en g PS m⁻² d⁻¹ (azul, TC; verde, TCC2 y negro TCC3) y de la dosis de irradiación en KJ m⁻² d⁻¹ (rojo). (B) Evolución diaria de la temperatura en °C (la línea roja es la línea de tendencia de la serie de valores). * Indica problemas técnicos en las semanas 2 y 5.

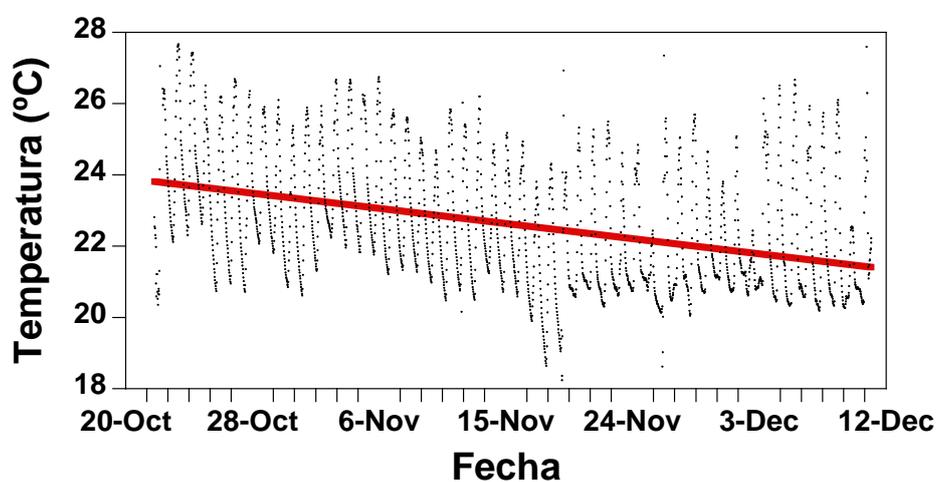
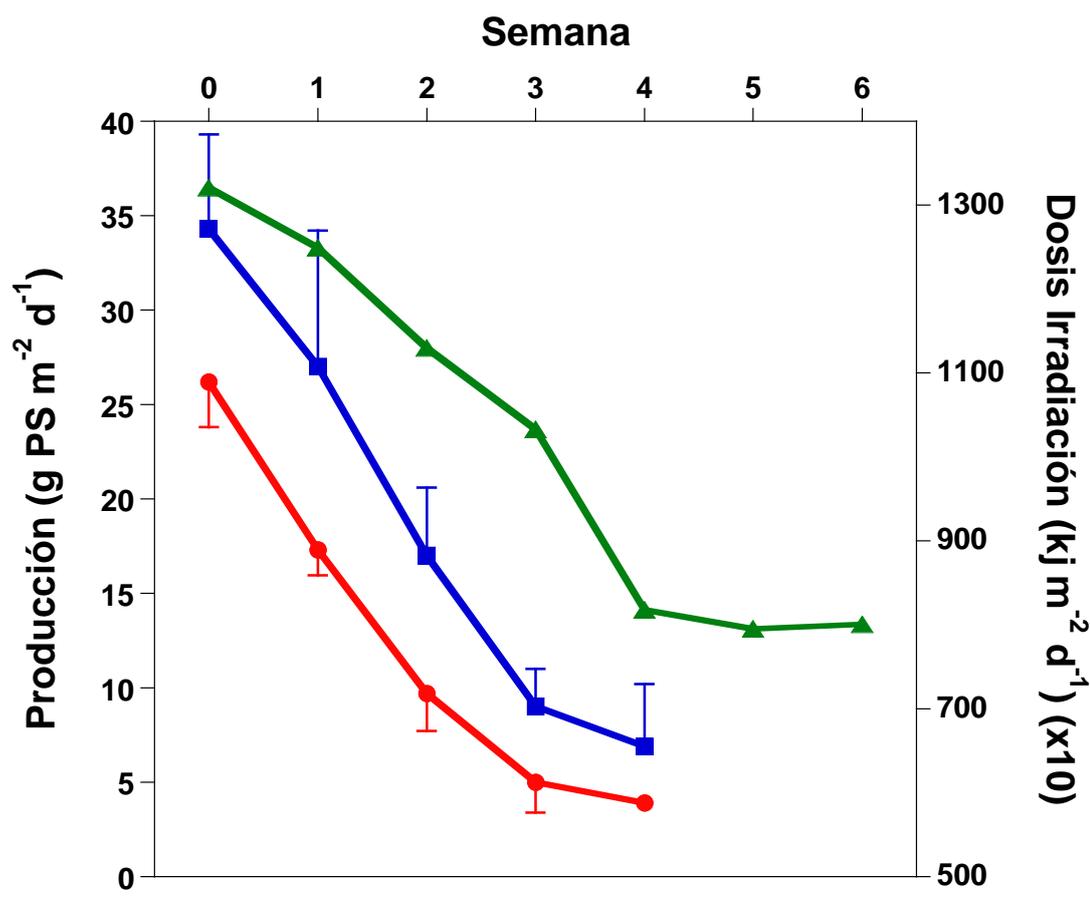


Figura 7: Experimento B. Evolución semanal de los valores de producción (A) en los diferentes tratamientos en g PS m⁻² d⁻¹ (rojo, TC; azul, TCCH) y de las dosis de irradiación en KJ m⁻² d⁻¹ (verde). (B) Evolución diaria de la temperatura en °C (la línea roja es la línea de tendencia de la serie de valores).

Igual que en el caso anterior, en el experimento B tampoco encontramos diferencias significativas, pero se observa una disminución de los cultivos con la disminución de la irradiación. En este segundo periodo de octubre a diciembre, los valores diarios de radiación solar variaron entre máximos de 19000 $\text{Kj m}^{-2}\text{d}^{-1}$ en octubre e inferiores a 9000 $\text{Kj m}^{-2}\text{d}^{-1}$ en diciembre.

Los tanques en co-cultivo mostraron valores superiores a los tanques control. La temperatura mostró un decrecimiento durante el periodo experimental. El tanque de co-cultivo, TCCU no presentó producción durante todo el proceso porque desde el inicio presento problemas de esporulación de *Ulva rigida*.

Las producciones del experimento A fueron mayores que el experimento B, coincidiendo con la estacionalidad, ya que el experimento A fue realizado en verano, mientras que el experimento B fue hecho en otoño.

Tabla X: Tasa de crecimiento media \pm desviación estándar. Por tratamiento (presencia o ausencia de nutrientes) para cada tipo de cultivo (monocultivo, co-cultivo) del Experimento A.

Tasa de Crecimiento (%d ⁻¹)			
	NH	SW	NH
TC	4,2 \pm 1,9	0,8 \pm 1,2	3,4 \pm 2,8
TCC2	5,2 \pm 1,7	3,8 \pm 0,2	3,7 \pm 2,9
TCC3	3,0 \pm 1,1	3,8 \pm 1,4	3,6 \pm 1,4

En cuanto a las tasas medias de crecimiento, del experimento A, en presencia de nutrientes presentaron valores de 4,2 \pm 1,9 % d⁻¹ para el TC, 5,2 \pm 1,7% d⁻¹ para TCC2 y 3,6 \pm 1,4 % d⁻¹ para TCC3.

Tabla XI: Tasa de crecimiento media \pm desviación estándar. Por tratamiento (presencia o ausencia de de nutrientes) para cada tipo de cultivo (monocultivo, co-cultivos) del Experimento B.

Tasa de Crecimiento (%d ⁻¹)		
	NH	SW
TC	2,9 \pm 1,5	0,9 \pm 0,0
TCCU	1,3 \pm 0,0	2,7 \pm 1,5
TCCH	2,8 \pm 1,3	1,0 \pm 0,5

En cuanto al experimento B, en presencia de nutrientes presentan valores de $2,86 \pm 0,84 \text{ \% d}^{-1}$ para el TC, $2,84 \pm 0,64 \text{ \% d}^{-1}$ para TCCH y para TCCU no hay tasa de crecimiento, por la disminución de la biomasa.

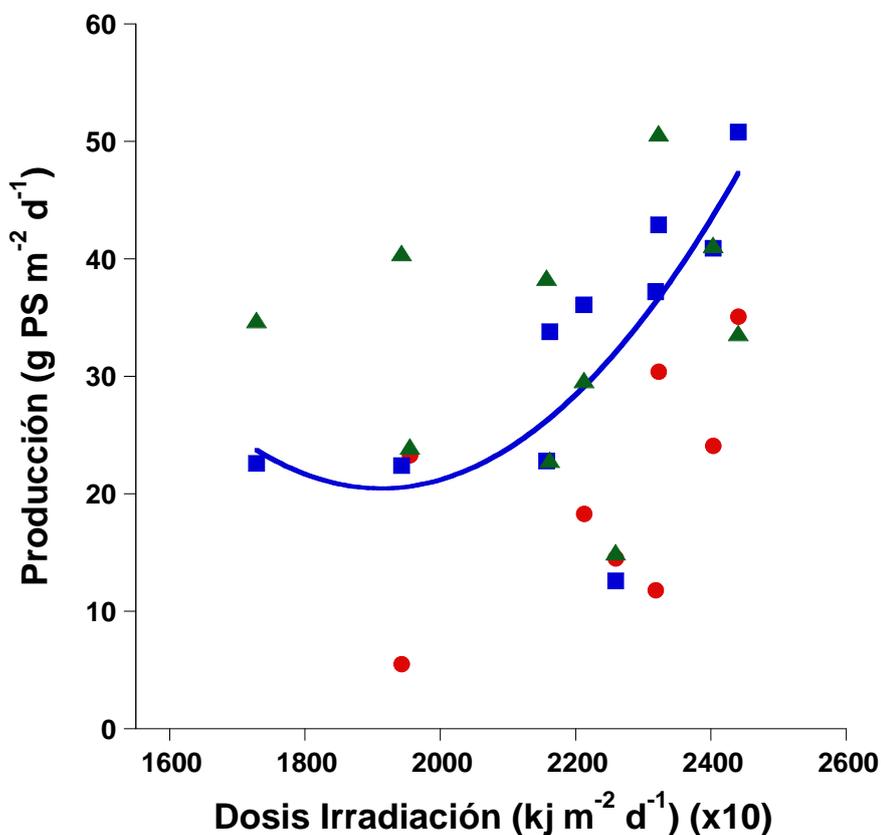


Figura 8: Experimento A. Ajuste de los valores de producción de biomasa ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) frente a dosis de irradiación ($\text{Kj m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)(x10). Círculos rojos (TC); cuadrados azules (TCC2); triángulos verdes (TCC3).

Tanto en el experimento A (Figura 8), como en el B (Figura 9), se observa una tendencia a aumentar la producción con el aumento de los valores de irradiación.

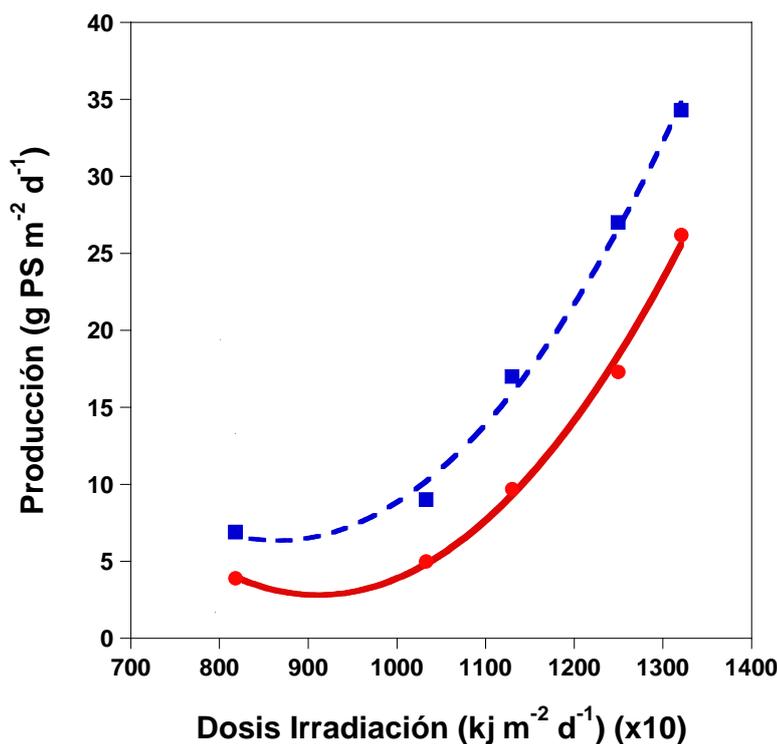
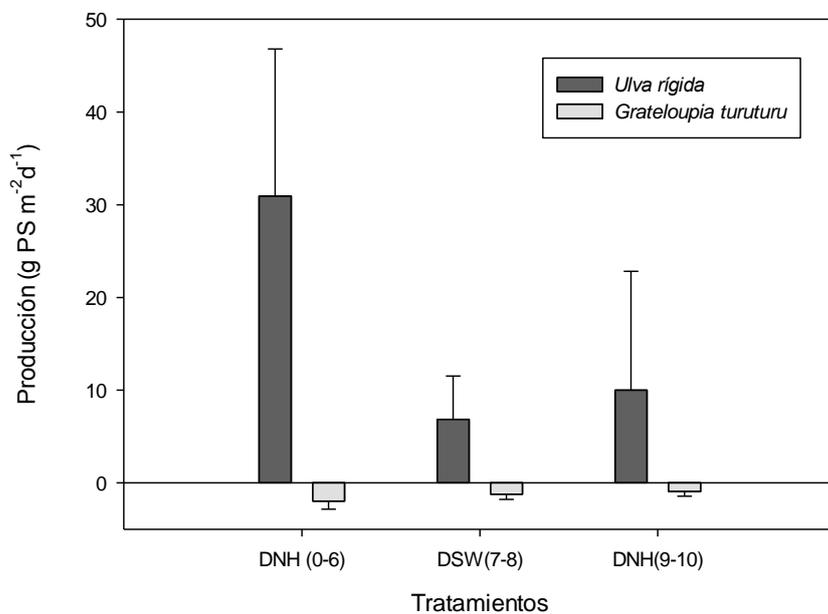
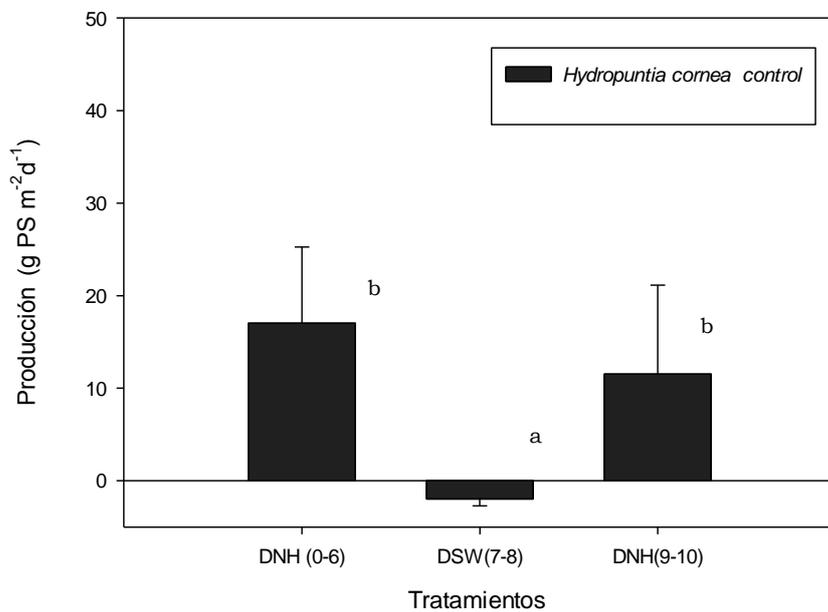


Figura 9: Experimento B: Valores de producción (g PS m⁻² d⁻¹) frente a dosis de irradiación (Kj m⁻² d⁻¹) (x10): Línea continua roja (TC); línea discontinua azul (TCCH).

En cuanto a la adaptación de las diferentes especies al sistema de co-cultivo, en las gráficas de la figura 10, se representa la producción a nivel de especie por tanque, observando que los valores máximos están presentes en *Ulva rigida*, con un valor medio de producción en presencia de nutrientes de $30,9 \pm 15,8$ g PS m⁻² d⁻¹. Cabe destacar la disminución de *Grateloupia imbricata* y *Grateloupia turuturu* desde el inicio de la fase experimental. *Hypnea musciformis* tiene una pequeña producción en presencia de nutrientes, pero en la semana 7 cuando cortamos dicho aporte, se percibe una disminución de la biomasa. En cuanto a *Hydropuntia cornea* se observa que hay mayor producción en tanques de co-cultivo que en los tanques de control. En todas las especies

exceptuando *Hydropuntia cornea* en co-cultivo, vemos una disminución en la producción en las dos semanas sin aporte de nutrientes.

Experimento A:



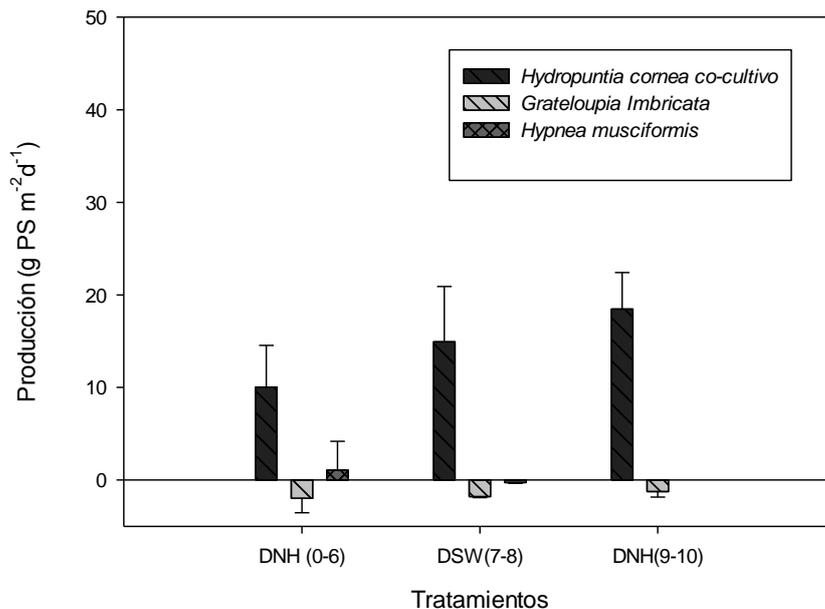
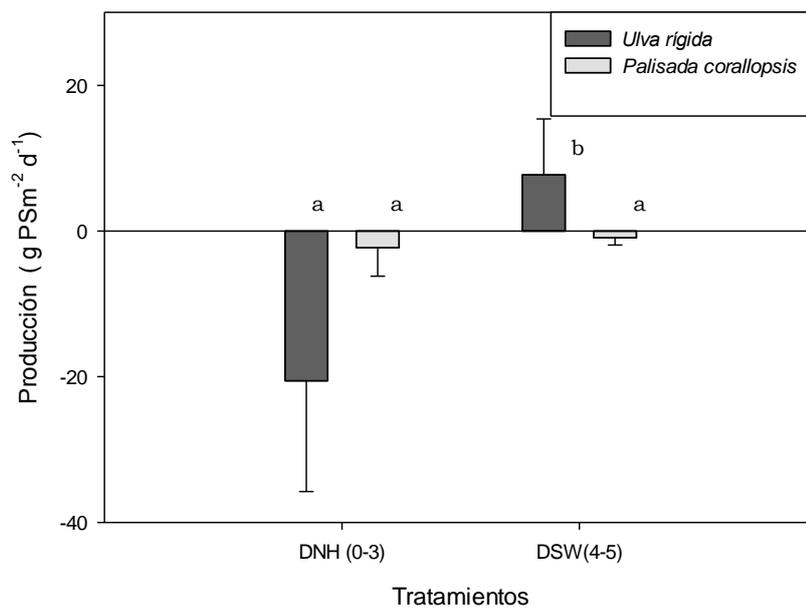
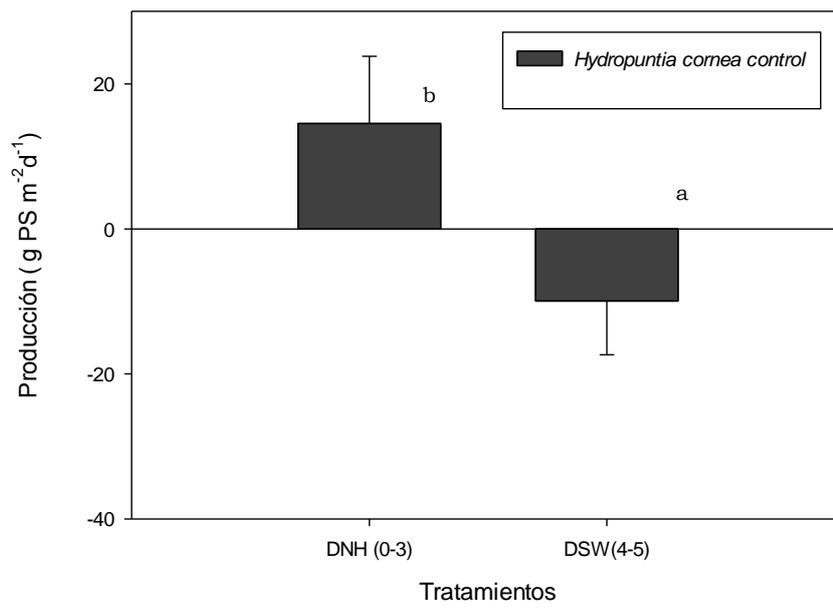


Figura 10: Producción (g PS m⁻² d⁻¹) frente a aporte/ ausencia de nutrientes para las diferentes especies cultivadas. Experimento A. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar.

Datos significativos a $p < 0,05$ unicamente en el tanque control, entre los diferentes tratamientos.

Experimento B:

En las gráficas (Figura 11), se representa la producción a nivel de especie por tanques. Los valores máximos los encontramos en *Hydropuntia cornea* en co-cultivo, con un valor medio de producción en presencia de nutrientes de $22,1 \pm 5,9$ g PS m⁻² d⁻¹. *Palisada corallopsis* desde el inicio del experimento, tanto en co-cultivo con *Ulva rigida* como con *Hydropuntia cornea*, presenta una disminución de su biomasa. En cuanto a *Hydropuntia cornea* se observa que hay mayor producción en tanques de co-cultivo que en los tanques de control. En este caso, se percibe una disminución de la producción en ausencia de nutrientes, exceptuando *Ulva rigida* que presentó mayor producción después de un periodo acusado de esporulación, en presencia de nutrientes.



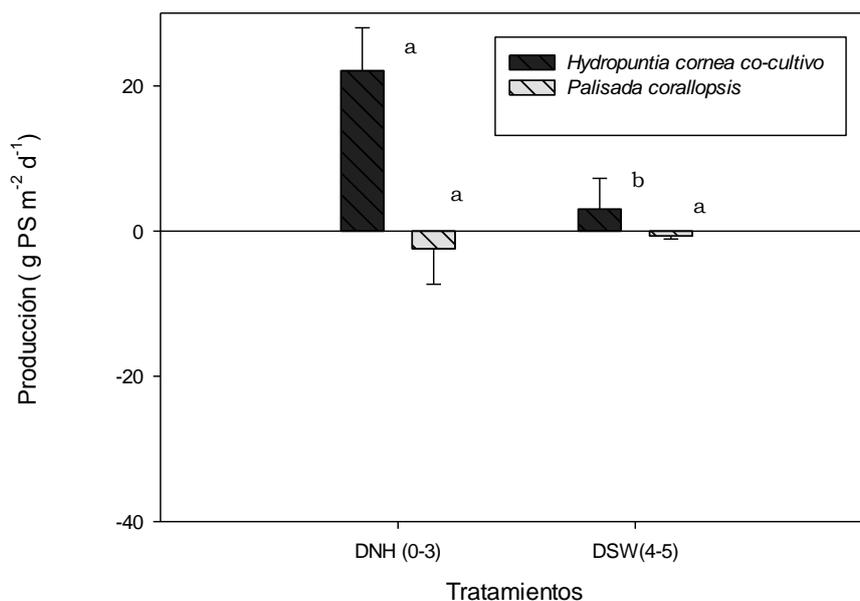


Figura 11: Producción (g PS m⁻² d⁻¹) frente a aporte/ ausencia de nutrientes para las diferentes especies cultivadas. Experimento B. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Datos significativos a p<0,05 se indican con letras diferentes (ab).

4.2 Biofiltración de amonio y fosfato

Tabla XII: Datos de biofiltración del experimento A. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar.

Tanque	Semana	Flujo de N (mmol h ⁻¹)	NUE (%)	NUR (mmol m ⁻² h ⁻¹)	Flujo de P	PUE (%)	PUR (mmol m ⁻² h ⁻¹)
TC	2	5,5±0,4	85,8±3,3	27,6±0,5	2,9±0,3	92,4±4,1	9,9±0,4
	6	3,3 ±3,1	78,2±1,1	17,7±0,2	3,7±0,03	52,8±3,1	8,2±0,4
	9	5,1±0,2	82,1±9,6	21,7±1,6	0,3±0,03	69,8±20,7	1,7±0,2
TCC2	2	5,4±0,3	87,4±4,5	27,9±1,0	2,7±0,3	95,9±0,5	10,3±0,0
	6	3,1±0,2	78,9±1,3	18,0±0,1	3,6±0,03	56,9±3,0	8,8±0,4
	9	4,9±0,4	95,3±5,5	24,2±1,0	0,2±0,02	100,0±0,0	2,0±0,0
TCC3	2	5,7±0,7	91,4±2,5	28,6±0,6	3,1±0,1	96,5±0,1	10,3±0,0
	6	3,1±0,2	72,0±6,8	17,2±0,7	3,7±0,1	59,5±4,9	9,0±0,5
	9	5,1±0,1	95,5±3,7	24,2±0,7	0,3±0,02	97,1±5,0	2,0±0,1

Los valores medios de la eficiencia de eliminación de amonio (NUE) se encuentran entre valores del 70 al 81%. La tasa de eliminación/ asimilación por unidad de superficie (NUR) dieron valores comprendidos

entre 17 y 28 $\text{mmoles NH}_4^+\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$. No existen diferencias significativas entre los diferentes tanques.

La eficiencia de eliminación de fosfato (PUE) alcanzó valores medios de 58 y 97%, llegando algunas semanas al 100%. La tasa de eliminación/asimilación por unidad de superficie (PUR) entre 2 y 10 $\text{mmoles PO}_4^{3+}\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

Tabla XIII: Datos de biofiltración del experimento B. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar.No diferencias significativas entre tanques.

Tanque	Semana	Flujo de N (mmol h^{-1})	NUE (%)	NUR ($\text{mmol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
TC	0	3,9 \pm 0,3	70,7 \pm 3,5	21,0 \pm 0,5
	3	2,2 \pm 0,1	58,0 \pm 4,3	15,9 \pm 0,5
TCCU	0	3,9 \pm 0,1	83,9 \pm 2,0	22,9 \pm 0,3
	3	2,6 \pm 0,1	65,5 \pm 6,6	16,1 \pm 0,5
TCCH	0	3,9 \pm 0,1	73,2 \pm 1,8	21,3 \pm 0,3
	3	2,7 \pm 0,1	69,9 \pm 4,1	16,4 \pm 0,3

Los valores medios del flujo de entrada en este experimento B fueron 3,36 \pm 0,31 $\text{mmoles N-NH}_4^+\text{h}^{-1}$. Los valores medios de la eficiencia de eliminación de amonio se encuentran entre valores de 58 a 83%. La tasa de eliminación/ asimilación por unidad de superficie (NUR) dieron valores comprendidos entre 15 y 21 $\text{mmoles NH}_4^+\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

4.3 Análisis del rendimiento cuántico óptimo del PSII (Fv/Fm) como indicador de estrés

Tanto para el experimento A como para el experimento B, las medidas fueron tomadas a diferentes horas del día (9:00, 11:00 y 14:00) para identificar situaciones de estrés no sólo por periodos prolongados sino también por efectos puntuales causados por la irradiación diaria. Sin embargo, los datos de fluorescencia se mantuvieron estables por lo que nos centraremos en la evaluación de las medidas tomadas a las 11:00, comparando el estado fisiológico de las diferentes especies en presencia y ausencia de nutrientes. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, en ninguna de las especies estudiadas, en ninguno de los dos experimentos (Figura 12 y Figura 13).

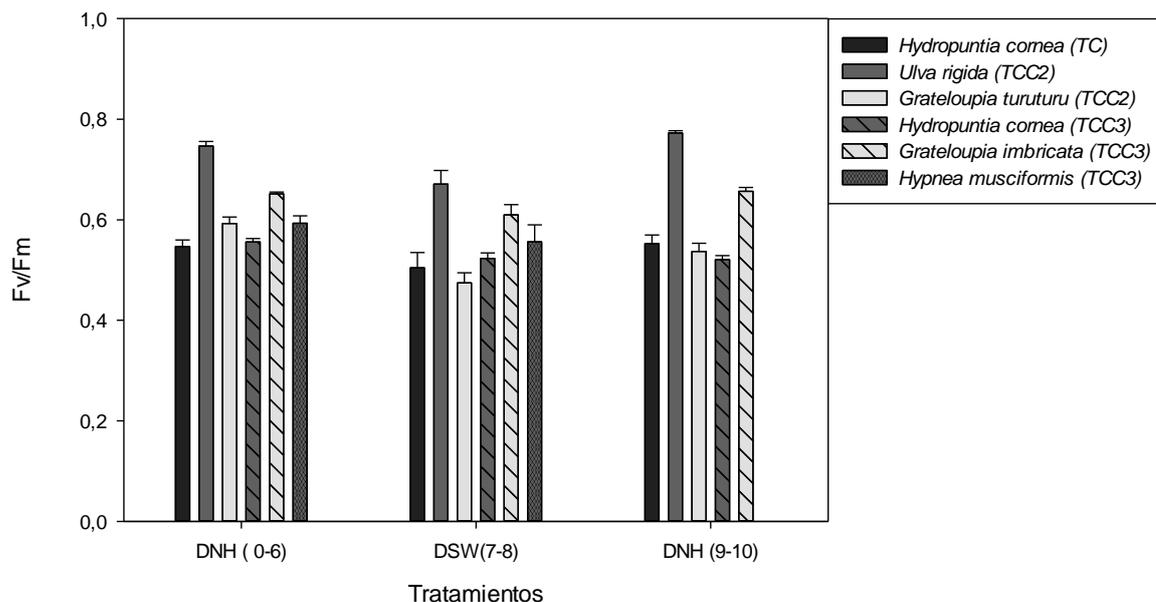


Figura 12: Eficiencia fotosintética óptima, de cada una de las especies para los diferentes tratamientos del Experimento A.

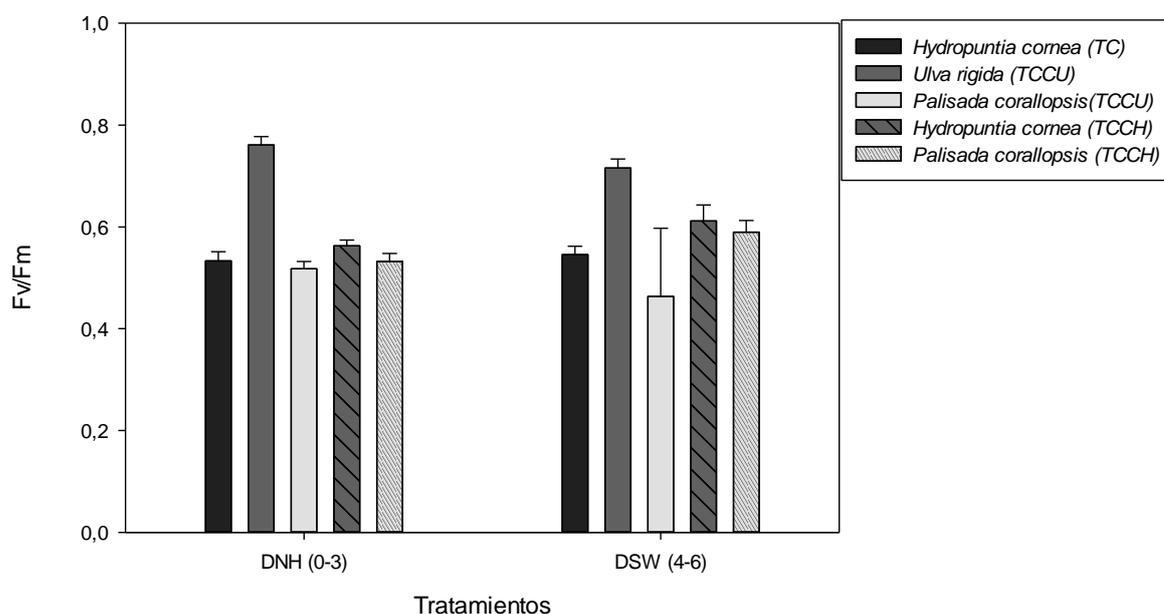


Figura 13: Eficiencia fotosintética óptima, de cada una de las especies para los diferentes tratamientos del Experimento B.

En el experimento B, también se midió el rendimiento efectivo ($F'v/F'm$) con los que se obtuvieron los valores de la tasa relativa de transporte de electrones (ETRr), mostrados en la tabla XIV.

En *Hydropuntia cornea* (TC) y *Ulva rigida* (TCCU) la tasa de transporte de electrones es mayor en presencia de nutrientes. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Tabla XIV: ETR relativo (μmol de electrones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en presencia y ausencia de nutrientes.

Especies	DNH	DSW
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	288,0±97,4	224,2±44,1
<i>Ulva rigida</i> (TCCU)	96,3±46,5	91,3±17,0
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCU)	403,9±93,0	441,6±70,2
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCCH)	211,2±76,6	440,4±131,0
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCH)	180,5± 56,4	457,0±164,4

4.4 Valoración de pigmentos:

4.4.1: Experimento A:

En las tablas XV y XVI se presentan los resultados para la extracción de pigmentos de *Ulva rigida* y algas rojas ensayadas.

Tabla XV: Pigmentos liposolubles de *Ulva rigida* y algas rojas del experimento A.

Especies	Semanas (Tratamientos)	Clorofila a (mg g⁻¹PS)	Carotenoides (mg g⁻¹PS)
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	0,2±0,02 ^a	0,1±0,01 ^{ab}
	6 (DNH)	0,6±0,1 ^b	0,2±0,05 ^b
	8 (DSW)	0,2±0,01 ^a	0,06±0,002 ^a
	9 (DNH)	0,5±0,04 ^b	0,1±0,02 ^{ab}
	10 (DNH)	0,4±0,04 ^b	0,1±0,01 ^{ab}
<i>Ulva rigida</i> (TCC2)	0 (DNH)	0,3±0,01 ^a	0,1±0,04 ^{ab}
	6 (DNH)	0,7±0,2 ^b	0,3±0,1 ^b
	7 (DSW)	0,5±0,05 ^{ab}	0,1±0,02 ^{ab}
	8 (DSW)	0,2±0,02 ^a	0,02±0,005 ^a
	9 (DNH)	0,6±0,1 ^{ab}	0,06±0,003 ^{ab}
10 (DNH)	0,6±0,1 ^{ab}	0,06±0,002 ^{ab}	
<i>Grateloupia turuturu</i>(TCC2)	10 (DNH)	0,4±0,06	0,1±0,002
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCC3)	0 (DNH)	0,6±0,06 ^{cd}	0,1±0,01 ^{bc}
	6 (DNH)	0,7±0,07 ^d	0,2±0,03 ^c
	7 (DSW)	0,5±0,02 ^{ab}	0,1±0,004 ^{bc}
	8 (DSW)	0,3±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a
	9 (DNH)	0,5±0,04 ^{bc}	0,1±0,01 ^{ab}
10 (DNH)	0,6±0,02 ^{bcd}	0,1±0,005 ^{bc}	
<i>Grateloupia imbricata</i> (TCC3)	0 (DNH)	0,3± 0,02	0,06± 0,01
	10 (DNH)	0,3±0,1	0,08±0,006
<i>Hypnea musciformis</i> (TCC3)	0 (DNH)	0,9± 0,04	0,1± 0,02
	6 (DNH)	0,7±0,05	0,1±0,04

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (abcd).

En *Hydropuntia cornea* control, podemos observar diferencias significativas entre presencia o ausencia de nutrientes. En el caso de *Grateloupia Imbricata* solo tenemos datos de inicio y final de experimento. *Grateloupia turuturu* solo tenemos datos del final del experimento e *Hypnea musciformis* sólo tenemos datos en presencia de nutrientes, porque desde el corte de nutrientes disminuyo hasta desaparecer.

En los pigmentos obtenidos de los extractos, para pigmentos liposolubles (Tabla XV), el máximo de clorofila a y carotenoides aparece en *Hypnea musciformis* al inicio del experimento, con un valor $0,9 \pm 0,04$ mg g^{-1} PS de clorofila a y el máximo en carotenoides es en *Ulva* al final del aporte de nutrientes, con un valor $0,3 \pm 0,1$ mg g^{-1} PS. El mínimo valor lo encontramos en *Hydropuntia cornea* del tratamiento control al final de la octava semana, después de dos semanas sin aporte de nutrientes, con un valor $0,2 \pm 0,01$ mg g^{-1} PS de clorofila a y en *Ulva rigida* en el mismo periodo con $0,02 \pm 0,005$ mg g^{-1} PS de carotenoides. Encontramos diferencias significativas entre tratamientos en *Hydropuntia cornea* y en *Ulva rigida*.

Tabla XVI: Pigmentos hidrosolubles de algas rojas del experimento A.

Especies	Semanas (Tratamientos)	Ficoeritrina (mg g⁻¹PS)	Ficocianina (mg g⁻¹PS)
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	2,8±0,4 ^{ab}	0,03±0,02
	6 (DNH)	0,4±0,2 ^{ab}	0,2±0,2
	8 (DSW)	0,01±0,003 ^a	0,01±0,003
	9 (DNH)	1,2±0,4 ^{ab}	0,04±0,03
	10 (DNH)	3,3±1,4 ^b	0,03±0,02
<i>Grateloupia turuturu</i>(TCC2)	10 (DNH)	0,2±0,01	0,03±0,00
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCC3)	0 (DNH)	4,4±1,4 ^{bc}	0,08±0,03
	6 (DNH)	3,8±0,3 ^{abc}	0,06±0,01
	7 (DSW)	3,8±0,5 ^{abc}	0,07±0,01
	8 (DSW)	1,0±0,05 ^a	0,02±0,00
	9 (DNH)	2,8±0,21 ^{ab}	0,07±0,01
	10 (DNH)	7,6±1,9 ^{bc}	0,07±0,04
<i>Grateloupia imbricata</i> (TCC3)	0 (DNH)	1,5±0,4	0,09±0,01
	10 (DNH)	0,2±0,05	0,05±0,02
<i>Hypnea musciformis</i> (TCC3)	0 (DNH)	0,4±0,2	0,03±0,01
	6 (DNH)	0,5±0,03	0,01±0,00

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (abc).

Al examinar los pigmentos hidrosolubles (Tabla XVI), el máximo para ficoeritrina en *Hydropuntia cornea* co-cultivo, se encontró al inicio del experimento, con un valor 4,4±1,4 mg g⁻¹ PS y el mínimo, en *Hydropuntia cornea* tratamiento control al final del periodo sin aporte de nutrientes, con un valor 0,01±0,003 mg g⁻¹ PS. En el caso de ficocianina, el máximo lo determinamos en *Hydropuntia cornea* tratamiento control al final de las seis semanas con aporte de nutrientes, con un valor de 0,2±0,2 mg g⁻¹ PS y el mínimo en la misma especie después de dos semanas sin aporte de nutrientes, con un valor de 0,01±0,003 mg g⁻¹ PS.

4.4.2: Experimento B:

En las tablas XVII, XVIII se presentan los resultados para la extracción de pigmentos ensayados.

Tabla XVII: Pigmentos liposolubles de *Ulva rigida* y algas rojas del experimento B.

Especies	Semanas (Tratamientos)	Clorofila a (mg g⁻¹PS)	Carotenoides (mg g⁻¹PS)
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	3,2±0,2 ^{bc}	0,7±0,02 ^{ab}
	3 (DNH)	4,1±0,3 ^c	1,0±0,1 ^b
	4 (DSW)	2,7±0,3 ^b	0,6±0,08 ^{ab}
	6 (DSW)	1,1±0,1 ^a	0,4±0,04 ^a
<i>Ulva rigida</i> (TCCU)	3 (DNH)	1,9±0,2 ^b	0,8±0,1 ^b
	4 (DSW)	1,3±0,1 ^a	0,3±0,1 ^{ab}
	6 (DSW)	0,9±0,01 ^a	0,2±0,1 ^a
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCU)	0(DNH)	1,2±0,2	0,1±0,03
	6(DSW)	1,5±0,04	0,3±0,01
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCCH)	0(DNH)	3,1±0,1 ^c	0,7±0,05 ^b
	3(DNH)	1,7±0,1 ^{ab}	0,4±0,03 ^a
	4 (DSW)	2,3±0,2 ^b	0,5±0,03 ^a
	6(DSW)	1,5±0,2 ^a	0,5±0,07 ^a
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCH)	0 (DNH)	1,2±0,1	0,2±0,03
	6 (DSW)	1,8±0,04	0,4±0,02

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (abc).

En la tabla XVII se representan los datos de pigmentos liposolubles del experimento B. En el caso de *Ulva rigida*, como hemos dicho anteriormente, no obtuvimos muestras iniciales por problemas de esporulación, por lo que solo podemos comparar entre los pigmentos extraídos en presencia de nutrientes y en ausencia de los mismos. En el caso de algas rojas, tanto para liposolubles como para hidrosolubles, solo *Hydropuntia cornea* TC y en co-cultivo podemos ver la variación claramente, por ausencia de muestras del resto de especies por falta de producción en todas las etapas de experimento. Encontramos diferencias significativas entre tratamientos en *Hydropuntia cornea* y en *Ulva rigida*. En *Palisada corallopsis* solo tenemos datos de inicio y final del

experimento, por lo que no podemos saber que evolución han llevado a cabo.

En los pigmentos obtenidos de los extractos, para pigmentos liposolubles, el máximo de clorofila a y carotenoides aparece en *Hydropuntia cornea* al final de las cuatro semanas con aporte de nutrientes, con un valor $4,1 \pm 0,3$ mg g⁻¹PS de clorofila a y $1,0 \pm 0,1$ mg g⁻¹ PS de carotenoides. Sin embargo, el mínimo sin embargo se observó en *Ulva rigida* al final del experimento, después de dos semanas sin aporte de nutrientes, con un valor $0,9 \pm 0,01$ mg g⁻¹PS de clorofila a y al inicio del experimento para *Palisada corallopsis* $0,1 \pm 0,03$ mg g⁻¹ PSSC de carotenoides.

Tabla XVIII: Pigmentos hidrosolubles de algas rojas del experimento B.

Especies	Semanas (Tratamientos)	Ficoeritrina (mg g⁻¹PS)	Ficocianina (mg g⁻¹PS)
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	$16,6 \pm 1,9^b$	$0,2 \pm 0,1$
	3 (DNH)	$13,3 \pm 0,5^b$	$0,1 \pm 0,04$
	4 (DSW)	$5,6 \pm 0,9^a$	$0,04 \pm 0,05$
	6 (DSW)	$2,3 \pm 0,6^a$	$0,09 \pm 0,06$
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCU)	0 (DNH)	$5,3 \pm 0,9$	$0,09 \pm 0,01$
	6 (DSW)	$1,1 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,03$
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCCH)	0 (DNH)	$25,9 \pm 0,9^b$	$0,4 \pm 0,02^b$
	3 (DNH)	$21,6 \pm 1,5^b$	$0,3 \pm 0,01^{ab}$
	4 (DSW)	$10,8 \pm 3,3^a$	$0,2 \pm 0,07^{ab}$
	6 (DSW)	$4,4 \pm 0,6^a$	$0,2 \pm 0,06^a$
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCH)	0 (DNH)	$5,3 \pm 0,9$	$0,09 \pm 0,01$
	6 (DSW)	$0,7 \pm 0,2$	$0,02 \pm 0,03$

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (ab).

Respecto a los pigmentos hidrosolubles, tal y como se presentan en la tabla XVIII, el máximo lo encontramos para ficoeritrina en *Hydropuntia cornea* TCCH al inicio del experimento, con un valor $25,9 \pm 0,9$ mg g⁻¹ PS y el mínimo, en *Palisada corallopsis* TCCH al final del periodo sin aporte de nutrientes, con un valor $0,7 \pm 0,2$ mg g⁻¹ PS. En cuanto a la ficocianina, el máximo lo encontramos en *Hydropuntia cornea* TCCH al inicio del

experimento, con un valor de $0,4 \pm 0,02$ mg g⁻¹ PS y el mínimo en *Palisada corallopsis* TCCH, después de dos semanas sin aporte de nutrientes, con valor $0,02 \pm 0,03$ mg g⁻¹ PS. Encontramos diferencias significativas entre tratamientos en *Hydropuntia cornea* tanto en control como en co-cultivo.

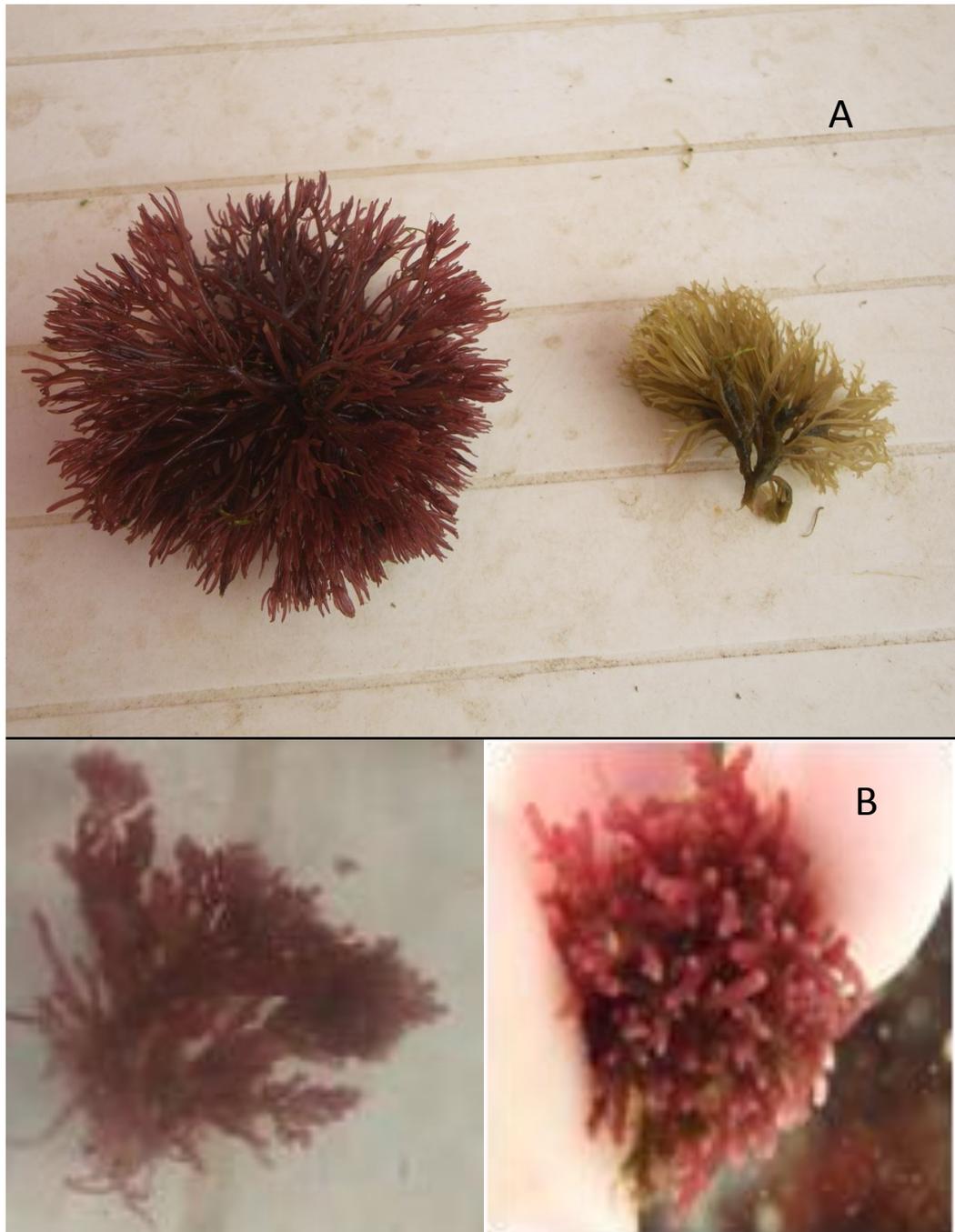


Figura 14: Cambios morfológicos de las algas durante los diferentes tratamientos. A: Cambios en pigmentación *Hydropuntia cornea*. B: Cambios morfológicos de *Palisada corallopsis*.

En la figura 14 podemos observar los cambios en la morfología y pigmentación de las algas durante los dos experimentos. Con la ausencia de aporte de nutrientes, como se observa en la figura 14.A, se ve una clara disminución de la concentración de pigmentos y en la figura 14.B, disminución de tamaño para una mayor superficie/volumen.

4.5 Valoración de actividad antioxidante:

Una vez cuantificados los pigmentos, los extractos fueron utilizados para determinar la actividad antioxidante. Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos liposolubles del experimento A se presentan en la tabla XIX. Los porcentajes de inhibición de los extractos hidrosolubles no fueron valores relevantes en ninguno de los dos experimentos.

Tabla XIX: Actividad antioxidante de pigmentos liposolubles experimento A.

Especies	Semanas (Tratamientos)	% Inhibición liposolubles
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	2,9±0,04 ^a
	6 (DNH)	2,0±0,2 ^a
	8 (DSW)	12,4±3,6^b
	9 (DNH)	3,7±1,8 ^a
	10 (DNH)	5,6±1,1 ^{ab}
<i>Ulva rigida</i> (TCC2)	0 (DNH)	12,4±5,8
	6 (DNH)	2,0±1,4
	7 (DSW)	2,1±0,2
	8 (DSW)	9,1±2,9
	9 (DNH)	3,3±2,0
	10 (DNH)	3,6±1,0
<i>Grateloupia turuturu</i> (TCC2)	10 (DNH)	9,4±0,5
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCC3)	0 (DNH)	12,5±3,9 ^{bc}
	6 (DNH)	5,3±0,2 ^{ab}
	7 (DSW)	20,0±3,9^c
	8 (DSW)	3,5±0,9 ^a
	9 (DNH)	3,4±0,3 ^a
	10 (DNH)	4,0±0,8 ^{ab}
<i>Grateloupia imbricata</i> (TCC3)	0 (DNH)	7,3±3,2
	10 (DNH)	2,9±0,5
<i>Hypnea musciformis</i> (TCC3)	0 (DNH)	2,6±0,7
	6 (DNH)	0,6±0,2

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (abcd).

En el experimento A, *Ulva rigida* presentó mayor % de inhibición al principio del experimento. *Hydropuntia cornea* presentó los mayores

valores de inhibición en condiciones de limitación de nutrientes, con un máximo en TCC3 de $20 \pm 3,9\%$ de inhibición. Presentando diferencias significativas en *Hydropuntia cornea* tanto en control como en co-cultivo para los diferentes tratamientos.

Tabla XX: Actividad antioxidante de pigmentos liposolubles experimento B.

Especies	Semanas (Tratamientos)	%Inhibición liposolubles
<i>Hydropuntia cornea</i> (TC)	0 (DNH)	$17,8 \pm 3,9^b$
	3(DNH)	$3,5 \pm 4,4^a$
	4(DSW)	$3,9 \pm 0,2^a$
	6 (DSW)	$1,9 \pm 2,7^a$
<i>Ulva rigida</i> (TCCU)	3(DNH)	$4,2 \pm 1,1$
	4(DSW)	$2,6 \pm 1,6$
	6 (DSW)	$1,9 \pm 2,2$
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCU)	0 (DNH)	$3,1 \pm 0,9$
	6 (DSW)	$3,1 \pm 0,9$
<i>Hydropuntia cornea</i> (TCCH)	0(DNH)	$2,5 \pm 0,7^a$
	3 (DNH)	$2,9 \pm 0,6^a$
	4 (DSW)	$20,0 \pm 8,9^b$
	6 (DSW)	$5,3 \pm 0,6^a$
<i>Palisada corallopsis</i> (TCCH)	0 (DNH)	$3,1 \pm 0,9$
	6 (DSW)	$1,2 \pm 0,3$

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. Datos significativos a $p < 0,05$ se indican con letras diferentes (abcd).

En el experimento B (tabla XX), *Ulva rigida* presentó mayor % de inhibición en presencia de nutrientes, mientras que *Hydropuntia cornea* mostró los mayores valores de inhibición bajo limitación de nutrientes, con un máximo en TCCH de $20,0 \pm 8,9\%$ de inhibición. Encontramos diferencias significativas, sobretodo en *Hydropuntia cornea* en co-cultivo.

5. Discusión:

Para un buen desarrollo de AMTI, debemos buscar y/o conocer las especies locales de macroalgas que mejor se adapten a las condiciones ambientales de un sistema de biofiltro (Chopin *et al.*, 2001; Copertino *et al.*, 2009). En el caso de *Ulva rigida* e *Hydropuntia cornea*, se ha demostrado en estudios anteriores (Gómez-Pinchetti *et al.*, 1998; Mata *et al.*, 2010) que son muy adaptables y maleables en diferentes condiciones ambientales.

Buschmann *et al.* (2008a) indica que la adición de nutrientes al medio, sobre todo nitrógeno, causa un incremento de la biomasa de las especies autótrofas.

Se ha intentado ver si el co-cultivo de diferentes especies favorecía la producción de especies con menos crecimiento que *Ulva rigida*. Tanto en *Ulva rigida* e *Hydropuntia cornea* se sigue el patrón de aumentar la producción en presencia de nutrientes y disminuirla en ausencia de estos. Sin embargo, *Grateloupia turuturu*, *Grateloupia imbricata*, *Hypnea musciformis* (experimento A), así como *Palisada corallopsis* (experimento B), según los resultados obtenidos, se pueden interpretar que estas macroalgas no han tenido una buena adaptación a este tipo de cultivos. Otra posible explicación a la disminución de la biomasa puede ser a que especie como *Ulva* muestran la capacidad de utilizar, absorber y metabolizar rápidamente diferentes formas de nitrógeno inorgánico, principalmente nitrato y de amonio, dependiendo de su disponibilidad. Sin embargo, la presencia de estos compuestos nitrogenados pueden ser tóxicos o inhibidores para algunas algas marinas en altas concentraciones. (Lobban y Harrison, 1994). Esto también se podría explicar por el problema ocurrido en el experimento A, puesto que la segunda semana hubo un corte de agua por rotura de la bomba y en la semana cinco rotura de una tubería, lo que llevó a que en el tanque de decantación no hubo entrada de agua durante un periodo de tiempo

indeterminado, aumentando la concentración de amonio y coincidiendo con la disminución de la producción en estas semanas.

En el experimento B, la producción de *Ulva rigida* cayó drásticamente durante las semanas en presencia de amonio, por esporulación, produciéndose una disminución de la biomasa (Msuya y Neori., 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Copertino *et al.*, 2009).

Aunque no lo podemos demostrar en nuestros casos, también tendríamos que tener en cuenta la importancia de las posibles interacciones químicas entre las macroalgas, aunque según Valiela *et al.*, (1997) las macroalgas tienen menos probabilidades de contener y liberar compuestos tóxicos, y carecen de defensas químicas obvias (Van Alstyne *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios recientes han revelado que *Ulva pertusa* y *Ulva linza* exhiben efectos alelopáticos negativos sobre otras algas (Jin y Dong , 2003; Nan *et al* , 2004; Jin *et al*, 2005).

La interferencia con la competencia por luz y nutrientes hace casi imposible probar la alelopatía *in situ* (Jasser, 1995; Inderjit y Del Moral, 1997; Keating, 1977; Schmidt y Hansen, 2001; Sukenik *et al.*, 2002). Por tanto, para intentar identificar posibles interacciones alelopáticas entre los organismos acuáticos es esencial desarrollar experimentos en sistemas controlados (Renjun Wang *et al.*, 2007) y en nuestro caso, no hemos podido controlar irradiancia y temperatura en las condiciones de nuestros cultivos.

Aunque diversos factores abióticos y bióticos pueden limitar la productividad, la irradiancia y temperatura son los factores más importantes para el crecimiento y la absorción de nutrientes (Nelson *et al.*, 2008; Kim J.H *et al.*, 2011). En nuestro ensayo, la variación de temperatura e irradiancia muestran unas ciertas tendencias, aunque no se obtuvo un efecto significativo. En el experimento B, la tendencia se ve más claramente que en el experimento A. Incluso en el experimento A, se diría que la producción se ve más afectada por la irradiancia que

por la temperatura, pero no se puede asegurar porque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas.

En cuanto a la selección de la especie de macroalga a utilizar como biofiltro, depende de dos aspectos fundamentales: la capacidad fisiológica para crecer en las condiciones de cultivo con niveles altos de nutrientes, especialmente amonio, y el interés comercial de su biomasa o de los productos derivados de ella (Buschmann *et al.*, 2001; Chopin *et al.*, 2001). La biofiltración de nuestros co-cultivos obtenida durante el experimento (Tablas XII, XIII), donde no hubieron diferencias significativas entre los cultivos, es similar a las indicadas por otros autores (Chow *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Schuenhoff *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006; Buschman *et al.*, 2008b; Robertson-Andersson *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2009; Marinho-Soriano *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010); donde sus resultados de eficiencia de asimilación de nitrógeno (NUE) están comprendidos entre el 20 y el 80%. La biofiltración de *Ulva* no se vio afectada por el hecho de entrar en fase reproductiva (Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Copertino *et al.*, 2009), puesto que siguió activa fisiológicamente produciendo esporas, aunque no biomasa. Aunque el NUE es fácilmente comparable no da mucha información, mientras que la tasa de asimilación (NUR) nos permite saber la relevancia y capacidad para suprimir del medio el nitrógeno por unidad temporal y superficial (Del Río *et al.*, 1996). Los datos muestran una tasa de asimilación (NUR) que llega a duplicar la de otros autores (Chow *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Schuenhoff *et al.*, 2006; Shpigel y Neori, 2007; Buschmann *et al.*, 2008b; Copertino *et al.*, 2009). No obstante, aun así no se vio diferencias significativas entre los diferentes tipos de cultivo.

Al someter los co-cultivos a un periodo sin nutrientes, lo que supone una situación de estrés, y siguiendo las indicaciones de Figueroa *et al.* (2006) que sugiere este parámetro como fiable y fácil de medir, se recopilaron datos del rendimiento cuántico óptimo del PSII (Fv/Fm) para registrar si hubo variaciones en el estado fisiológico. Los

datos, figuras 12 y 13, indican que el estrés sufrido por la carencia de nutrientes durante dos semanas, es inapreciable.

En el experimento B, también observamos que en el ETR relativo (tasa fotosintética de transporte de electrones), existe una buena relación entre ETR y fijación de C o la evolución del oxígeno (Genty *et al.*, 1989), aunque los resultados esperados eran que los valores fueran mayores en presencia de nutrientes, como ocurrió en *Hydropuntia cornea* control y *Ulva rigida* (tabla XIV). En el resto de especies ocurre lo contrario, sufriendo un estrés por un incremento de amonio que puede ser tóxico o fotoinhibidor en altas concentraciones (Lobban y Harrison, 1994), pero no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Buschman *et al.* (2008b) afirma que altas concentraciones de nitrógeno (amonio) incrementan el contenido de pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles y nitrógeno interno, además de compuestos fotoprotectores o intermediarios de la fotosíntesis. Esta respuesta fisiológica de las macroalgas es un hecho patente en nuestro estudio, como podemos observar en las tablas XV, XVI; XVII y XVIII, la cantidad de pigmentos aumenta en presencia de amonio y disminuye en ausencia de ellos.

Varios autores han descrito en trabajos anteriores que el contenido de la ficoeritrina en algas rojas, y clorofila a en general, está positivamente correlacionado con el aporte de nitrógeno y los niveles de radiación (Lapointe., 1981; Bird *et al.*, 1982; Vergara y Niell., 1993). Por otra parte, se ha demostrado también que la concentración de pigmentos responde a los cambios en las concentraciones de las distintas formas orgánicas e inorgánicas de N (Bird *et al.*, 1982; Horrocks, 1993).

El blanqueamiento es resultado de que los pigmentos son metabolizados como una fuente de proteína (Smit *et al.*, 1997). Los cambios en el contenido de clorofilas fueron importantes a pesar de que los valores de irradiación diaria fueron altos, con niveles máximos, lo

que sugiere que el contenido de pigmento fue controlado por el nitrógeno disuelto y no por la luz. Por tanto, bajos niveles de nitrógeno (principalmente en la forma de NH_4^+) presenta una fuerte influencia en los pigmentos. (Gómez Pinchetti *et al.*, 1998).

La ficoeritrina es el pigmento característico de las algas rojas y por eso su cantidad es tan alta en comparación a la clorofila y la ficocianina, como se puede ver en las tablas tablas XVI y XVIII. (Buschman *et al.*, 2008b). Varios autores han descrito en trabajos anteriores que el contenido de la ficoeritrina en algas rojas, y clorofila a en general, está positivamente correlacionado con el aporte de nitrógeno y los niveles de radiación (Lapointe, 1981; Bird *et al.*, 1982; Vergara y Niell, 1993).

El interés en la búsqueda de antioxidantes naturales de algas se ha incrementado en los últimos años. El objetivo general de este tipo de investigación es el descubrimiento de compuestos y/o extractos que puedan contrarrestar procesos de estrés oxidativo inducido por radicales y otros, y al hacerlo, reducir la incidencia de enfermedades humanas directamente relacionadas con estos procesos. (Kelman. D *et al.*, 2012). Carotenoides (Sachindra *et al.*, 2007; Prasanna *et al.*, 2010) y ficobiliproteínas son generalmente poderosos antioxidantes (Eriksen, 2008; Prasanna *et al.*, 2010; Sekar y Chandramohan, 2008).

Las situaciones de estrés bajo las condiciones de cultivo establecidas podrían explicar la síntesis, acumulación y exudación al medio de este tipo de elementos, como podemos observar en las tablas XIX-XX. La actividad antioxidante se incrementa cuando lo sometemos a estrés al cortar el aporte de nutrientes. (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2003).

6. Conclusiones:

- Las especies de macroalgas *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* mostraron una alta capacidad de crecimiento en el sistema desarrollado y bajo las diferentes condiciones ensayadas alcanzando máximos de producción de 30 g PS m⁻² d⁻¹, en condiciones de radiación natural y aporte continuado de nutrientes. El resto de especies no mostraron la producción esperada. La posibilidad de establecer co-cultivos parece una alternativa interesante para incrementar los valores de producción del sistema, sin embargo, más experimentación y la búsqueda de especies alternativas serán necesarias para llegar a conclusiones definitivas.
- Bajo las condiciones de aporte de nutrientes, la capacidad de biofiltración de N-amonio y P-fosfato de los tanques de co-cultivo alcanzó valores medios de NUE y PUE superiores al 50% llegándose a determinar valores del 100% en algunos de los análisis realizados. En el experimento A se obtuvieron valores medios de NUE del 72 al 81%, y una tasa de eliminación/asimilación con valores comprendidos entre 17 y 28 mmoles NH₄⁺m⁻² h⁻¹. En el experimento B se obtuvieron valores medios de NUE entre 60 a 77%, y la tasa de eliminación/ asimilación con valores comprendidos entre 15 y 22 mmoles NH₄⁺m⁻² h⁻¹. Estos resultados confirman que, aunque estas especies no generan gran producción, sí soportan tasas de biofiltración interesantes para su utilización eficiente en diferentes tipos de sistemas integrados.
- Las especies con mejor adaptación al sistema, *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida*, mostraron la respuesta esperada en cuanto a la dinámica de los pigmentos, acumulando clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (en el caso de *Hydropuntia cornea*) en condiciones de aporte de nutrientes y utilizándolos como reserva

para mantener su actividad en condiciones de limitación de los mismos.

- De forma general, la actividad antioxidante medida con el DPPH fue superior en los extractos obtenidos de la biomasa cultivada bajo limitación de nutrientes. Bajo estas condiciones, la concentración de pigmentos disminuyó mientras que la actividad antioxidante aumentó. El aumento de la actividad antioxidante en condiciones de cultivo bajo limitación de nutrientes es un resultado relevante que no tiene, a nuestro conocimiento, antecedente en la literatura científica consultada.

7. Referencias

- ABREU, M.A., PEREIRA, R., YARISH, C., BUSCHMANN, A.H., SOUSA-PINTO, I. 2011. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture* 312, 77–87.
- AFONSO- CARRILLO J y SAMSÓN, M. 1989. Clave ilustrada para la identificación de los macrófitos marinos bentónicos de las Islas Canarias. Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Universidad de La Laguna.
- BÁRBARA, I., y CREMADES, J. 2004. *Grateloupia lanceola* versus *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta): en la Península Ibérica. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 61, No. 2, pp. 103-118).
- BARRINGTON, K., CHOPIN, T., ROBINSON, S. 2009. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperature waters. In: Soto, D. (Ed.), *Integrated Mariculture: A Global Review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529. FAO, Rome, pp. 7–46.
- BARTOLI, M., NIZZOLI, D., NALDI, M., VEZZULLI, L., PORRELLO, S., LENZI, M., VIAROLI, P. 2005. Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus *Ulva* uptake. *Marine Pollution Bulletin* 50:1386-1397.
- BECKER, W. 2004. Microalgae for Aquaculture: The Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. In: Richmond, A. (eds.): *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, pp. 380–391
- BEER, S. Y ESHEL, A., 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*36: 785–792.
- BIRD, K.T., HABIG, C., DEBUSK, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahie* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18, 344-348.
- BIXLER, H.J., PORSE, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* 23, 321–335

- BLOIS, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- BÜCHEL C, WILHELM C. 1993. In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: Progress, problems and perspectives. *Photochem Photobiol* 58: 137-148.
- BUSCHMANN, A., TROELL, M., KAUTSKY, N. 2001. Integrated algal farming: a review. *Cah. Biol. Mar.* 42: 83– 90.
- BUSCHMANN, A., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.C., ARANDA, C., CHOPIN, T., NEORI, A., HALLING, C., TROELL, M. 2008a. Mariculture waste management. In: S.E. Jørgensen and B.D. Fath (Eds.), *Encyclopaedia of Ecology*. Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2463-2475.
- BUSCHMANN, A.H., VARELA, D.A., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.C., HUOVINEN P. 2008b .Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of *Macrocystis* and *Gracilaria* as biofilters. *J. Appl. Phycol.* 20: 571-577.
- CARTON-KAWAGOSHI.R J, BESSIE J.E.,VALERIANO C., SHUICHI S., MASAHIRO N., DAISUKE F. 2014. Low water exchange *Gracilariopsis bailiniae* Zhang & B.M. Xia culture in intensive milkfish culture effluents: effects of seaweed density on seaweed production and effluent treatment; *Aquacult Int* 22:573–584
- CHANG, H., KIM, N.-J., KANG, J., JEONG, C. 2010. Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 1–10.
- CHATZIFOTIS, S.; VAZ JUAN, I.; KYRIAZI, P.; DIVANACH, P.; PAVLIDIS, M. 2011. Dietary Carotenoids and Skin Melanin Content Influence the Coloration of Farmed Red Porgy *Pagrus pagrus*. In: *Aquaculture Nutrition* 17 90–100
- CHAVEZ-CROOKER, P. y OBREQUE-CONTRERAS, J., 2010. Bioremediación of aquaculture wasres. *Curr. OPin. Biotechnol.* 21, 313-317.

- CHOPIN, T., BUSCHMANN, A.H., HALLING, C., TROELL, M., KAUTSKY, N., NEORI, A., KRAEMER, G.P., ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J.A., YARIS, C., NEEFUS, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Minireview. J. Phicol.* 37: 975-986.
- CHOUBERT, G.; HEINRICH, O. 1993. Carotenoid Pigments of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Assay on Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Pigmentation in Comparison with Synthetic Astaxanthin and Canthaxanthin. In: *Aquaculture* 112: 217–226
- CHOW, F., MACCHIAVELLO, J., CRUZ, S.S., FONCK, E., OLIVARES, J. 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. *Journal of the World Aquaculture Society* 32: 215-220.
- COLOMBO-PALLOTTA MF, GARCÍA-MENDOZA E, LADAH LB. 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *J Phycol* 42:1225–34.
- COPERTINO, M.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.
- COSTA-PIERCE, B.A. 2010. Sustainable ecological aquaculture systems: the need for a new social contract for aquaculture development. *Mar. Technol. Soc. J.* 44, 1–25.
- COSTA, J.C., GONÇALVES, P.R., NOBRE, A., ALVES, M.M. 2012. Biomethanation potential of macroalgae *Ulva* spp. and *Gracilaria* spp. and in co-digestion with waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 114, 320–326.
- COUTINHO R, ZINGMARK R. 1993. Interactions of light and nitrogen on photosynthesis and growth of the marine macroalga *Ulva curvata* (Kützinger) De Toni. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 167: 11-19.

- CRAWFORD. C. 2003. Environmental management of marine aquaculture in Tasmania, Australia. Volume 226, 1–4, 129–138.
- DEBOER, J. y RYTHER, J.H., 1977. Potential yields from a waste-recycling algal mariculture system. In: Krauss, R.W. (Ed.), *The Marine Plant Biomass of the Pacific Northwest Coast*. Oregon State University Press, 231-248.
- D'ELIA C.F y DEBOER J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae. ii. kinetics of ammonium and nitrate uptake. *Journal of Phycology* 14, 3, 266–272.
- DEL RIO, M. J., RAMAZANOV, Z., GARCIA-REINA, G. 1996. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. In *Fifteenth International Seaweed Symposium* (pp. 61-66). Springer Netherlands.
- DEMMIG-ADAMS B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020:1–24.
- DENIS C, MORANÇAIS M, LI M, DENIAUD E, GAUDIN P, WIELGOSZ-COLLIN G, BARNATHAN G, JAOUEN P, FLEURENCE J. 2010. Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chem* 119:913–917.
- DIMIER C, CORATO F, TRAMONTANO F, BRUNET C. 2007. Photoprotection and xanthophyll-cycle activity in three marine diatoms. *J Phycol* 43:937–47.
- DUKE CS, LAPOINTE BE, RAMUS J. 1986. Effects of light on growth, RuBPCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta). *J. Phycol.* 22: 362-370.
- ERIKSEN N. 2008. Production of phycocyanin — a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:1–14.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2011. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma.
- FIGUEROA FL, GÓMEZ I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: a review. *J Appl Phycol* 13: 235-248.
- FIGUEROA. F L, RUI SANTOS, CONDE-ÁLVAREZ . R, MATA. L, GÓMEZ PINCHETTI. JL, MATOS. J, HUOVINEN. P, SCHUENHOFF, A, SILVA. J. 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents Félix L.; *Botanica Marina* 49: 275–282.
- FLAMELING IA, KROMKAMP J. 1998. Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eukaryotic algae. *Limnol Oceanogr* 43: 284-297.
- FOGG GE. 1971. Extracellular products of algae in freshwater. *Arch Hydrobiol* 5:1–25.
- FRANKLIN. L, FORSTER. R. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology*. Volume 32, Issue 3.
- FRIEDLANDER, M. Y. LEVY, I. 1995. Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *Journal of Applied Phycology* 7: 315-324.
- GANTARM, BERRY J.P, THOMAS S, WANG M, PEREZ R, REIN K. S, AND KING G. 2008. Allelopathic activity among *Cyanobacteria* and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiol Ecol.* ; 64(1): 55–64.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990: 87–92.

- GOMES, E., DIAS, J., SILVA, P., VALENTE, L., EMPIS, J., GOUVEIA, L., YOUNG, A. 2002. Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin pigmentation of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*, 214(4), 287-293.
- GÓMEZ PINCHETTI. JL, 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); *Journal of Applied Phycology* 10: 383-389.
- GÓMEZ PINCHETTI, J. L., SUÁREZ ÁLVAREZ, S., GÜENAGA UNZETABARRENECHEA, L., FIGUEROA, F. L., GARCÍA REINA, G. 2011. Posibilidades para el desarrollo de sistemas integrados con macroalgas en las Islas Canarias y su entorno.
- GOUVEIA, L.; REMA, P. 2005. Effect of Microalgal Biomass Concentration and Temperature on Ornamental Goldfish (*Carassius auratus*) Skin Pigmentation. In: *Aquaculture Nutrition* 11/1, 19-23.
- GOUVEIA, L., VELOSO, V., REIS, A., FERNANDES, H., NOVAIS, J., EMPIS, J. 1996. *Chlorella vulgaris* used to Colour Egg Yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 167-172.
- GOUVEIA, L., CHOUBERT, G., PEREIRA, N., SANTINHA, J., EMPIS, J., GOMES, E. 2002. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research*, 33(12), 987-993.
- GOUVEIA, L.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I. 2008. Microalgae in Novel Food Products. In: Papadopoulos, K.N. (ed.): *Food Chemistry Research Developments*. Hauppauge, NY, 1-37.
- GUPTA, S., ABU-GHANNAM, N., SCANNELL, A.G.M. 2011. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. *Food Bioprod. Process.* 89, 346-355.

- GÜROY, D., GÜROY, B., MERRIFIELD, D. L., ERGÜN, S., TEKINAY, A. A., YIĞIT, M. 2011. Effect of dietary *Ulva* and *Spirulina* on weight loss and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during a starvation period. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95/3, 320-327.
- HÄDER DONAT-P y FELIX L. FIGUEROA. 1997. Photochemistry and Photobiology. 66/1, 1-14.
- HALLE, I., JANCZYK, P., FREYER, G., SOUFFRANT, W. B. 2009. Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Archiva Zootechnica*, 12/2, 5-13.
- HANISAK MD. 1983. The nitrogen relationship of marine macroalgae. In Carpenter EJ, Capone DG (eds), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, 699-730.
- HAROUN, R. J., GIL-RODRÍGUEZ, M. C., CASTRO, J., REINE, W. F. 2002. A checklist of the marine plants from the Canary Islands (Central Eastern Atlantic Ocean). *Botanica Marina*, 45(2), 139-169.
- HERNÁNDEZ, I., PÉREZ-PASTOR, A., VERGARA, J.J., MARTÍNEZ-ARAGÓN J.F., FERNÁNDEZ- ENGO, M.A., PÉREZ-LLOREN J.L. 2006. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: From microscale to macroscale. *Aquaculture* 252: 43-53.
- HORROCKS, J.L. 1993. Tissue nutrient content of *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) and water quality of Logan River and southern Moreton Bay. Honours Dissertation, University of Queensland.
- HOSOKAWA M, KUDO M, MAEDA H, KOHNO H, TANAKA T, MIYASHITA K. 2004. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1675:113-9.
- HUDSON JB, KIM JH, LEE MK, DEWREEDE RE, HONG YK. 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *J Appl Phycol* 10:427-434.

- HUESEMANN, M.H., KUO, L.-J., URQUHART, L., GILL, G.A., ROESIJADI, G. 2012. Acetonebutanol fermentation of marine macroalgae. *Bioresour. Technol.* 108, 305–309.
- HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, MATSUMOTO K, WATANABE H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 69:443–9.
- IMAI I, SUNAHARA T, NISHIKAWA T, HORI Y, KONDO R, HIROISHI S. 2001. Fluctuations of the red tide flagellates *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) and the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. in the Seto Inland Sea, Japan. *Mar Biol* 138:1043–1049.
- INDERJIT, DEL MORAL, R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *Bot. Rev.* 63, 221–230.
- JANG, J.-S., CHO, Y., JEONG, G.-T., KIM, S.-K. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 11–18.
- JASSER, I. 1995. The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions. *Hydrobiologia* 306, 21–32.
- JIAO, G., YU, G., ZHANG, J., EWART, H. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* 9, 196–223.
- JIN, Q., DONG, S. 2003. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 41–55.
- JIN, Q., DONG, S., WANG, CH. 2005. Allelopathic growth inhibition of *Prorocentrum micans* (Dinopyta) by *Ulva pertusa* and *Ulva linza* (Chlorophyta) in laboratory cultures. *Eur. J. Phycol.* 40, 31–37.
- JUNG K.A, SEONG-RIN L , KIM Y, PARK J.M. 2013. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery; *Bioresource Technology* 135, 182–190

- KALINOWSKI HERRERA C.T, 2006. Influence of dietary carotenoids in growth, colour and carotenoids composition of red porgy ("*Pagrus pagrus*") skin. Thesis. ULPGC.
- KEATING, K.I. 1977. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a Eutrophic Lake. *Science* 196, 885–887.
- KELMAN D, KROMKOWSKI POSNER E, MCDERMID K.J, TABANDERA N.K, WRIGHT P.R., WRIGHT A.D. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae Marine. *Drugs*, 10, 403-416.
- KENDEL .M, COUZINET-MOSSION. A, VIAU. M, FLEURENCE J, BARNATHAN. G & WIELGOSZ-COLLIN. G. 2013. Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*; *J. Appl. Phycol.* 25:425–432.
- KIM. J.H, EUN JU KANG, MYUNG GIL PARK, BYEONG-GWEON LEE Y KWANG YOUNG KIM. 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
- KIM, S.R., HA, S.-J., WEI, N., OH, E.J., JIN, Y.-S. 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* 30, 274–282.
- KIM. JK, DUSTON. J, COREY P, GARBARY D J. 2013. Marine finfish effluent bioremediation: Effects of stocking density and temperature on nitrogen removal capacity of *Chondrus crispus* and *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Aquaculture* 414–415.
- KITAGUCHI H, HIRAGUSHI N, MITSUTANI A, KATANO T, JIN E, KONG S, HAN M. 2001. Isolation of an algicidal bacterium with activity against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circzclarisquanta* (Dinophyceae). *Phycologia* 40:275–279.
- KRAAN, S.; MAIR, C. 2010. Seaweeds as Ingredients in Aquatic Feeds. In: *International Aquafeed* 13/6: 10–14.

- LAMMENS, T.M., FRANSEN, M.C.R., SCOTT, E.L., SANDERS, J.P.M. 2012. Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals. *Biomass Bioenerg.* 44, 168–181.
- LAPOINTE B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* vs. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17: 90-95.
- LEGRAND C, RENGEFORS K, FISTAROL GO, GRANALI E. 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42:406–419.
- LOBBAN, CHRISTOPHER S. ; WYNNE, MICHAEL J. 1981. *The Biology of seaweeds* University of California Press (Berkeley). Volume 17/ xi,786
- LOBBAN CHRISTOPHER S; HARRISON PAUL J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press.
- LOSORDO, T.M. Y WESTERS, H., 1994. System carrying capacity and flow estimation. In: Timmons, M.B., Losordo, T.M. (Eds.), *Aquaculture water reuse systems: engineering design and management*. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol. 27, Elsevier Science B.V., The Netherlands, 9-60.
- MAEDA H, HOSOKAWA M, SASHIMA T, FUNAYAMA K, MIYASHITA K. 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 332:392–7.
- MAI. K , JOHN P. MERCER A, JOHN DONLON. 1996. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition *Aquaculture* 139: 77-89.
- MAO, Y.; YANG, H.; ZHOU, Y.; YE, N. FANG, J. 2009. Potential of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* for integrated multi-trophic aquaculture with scallop *Chlamys farreri* in North China. *J. Appl. Phycol.* 21: 649–656.

- MARINHO-SORIANO, E., NUNES, S.O., CARNEIRO, M.A.A., PEREIRA, D.C. 2009. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass and bioenergy* 33: 327–331.
- MARTINEZ ME, SANCHEZ S, JIMÉNEZ JM, EL YOUSFI F, MUÑOZ L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biores Biotechnol* 73:263–272.
- MATA IF, WEDEMEYER WJ, FARRER MJ, TAYLOR JP, GALLO KA. 2006. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 29:286–29.
- MATA. L, SILVA.J, SCHUENHOF.A Y SANTOS. R. 2010. The effects of light and temperature on the photosynthesis of the *Asparagopsis armata* tetrasporophyte (*Falkenbergia rufolanosa*), cultivated in tanks. *Aquaculture* 252 /1:12–19.
- MCHUGH, MALACHY P. 2003. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 13/ 2: 88–97.
- MICHALAK, I., CHOJNACKA, K., DOBRZAŃSKI, Z., GÓRECKI, H., ZIELIŃSKA, A., KORCZYŃSKI, M., OPALIŃSKI, S. 2011. Effect of macroalgae enriched with microelements on egg quality parameters and mineral content of eggs, eggshell, blood, feathers and droppings. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95/3, 374-387.
- MICHIELS, J., SKRIVANOVA, E., MISSOTTEN, J., OVYN, A., MRAZEK, J., DE SMET, S., DIERICK, N. 2012. Intact brown seaweed (*Ascophyllum nodosum*) in diets of weaned piglets: effects on performance, gut bacteria and morphology and plasma oxidative status. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96/6, 1101-1111.
- MSUYA, F.E. NEORI, A., 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae That Can Biofilter Effluent from Tidal Fishponds in Tanzania. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* 1/ 2: 117–126.

- MSUYA F, NEORI A. 2008. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *J. Appl. Phycol.* 20:1021–1031.
- NAKAGAWA, H. 1997. Effect of Dietary Algae on Improvement of Lipid Metabolism in Fish. In: *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51/8: 345–348
- NAN, C.R., ZHANG, H.Z., ZHAO, G.Q. 2004. Allelopathic interactions between the macroalga *Ulva pertusa* and eight microalgal species. *J. Sea Res.* 52, 259–268.
- NATH, P. R., KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z., BOUSSIBA, S., ZILBERG, D. 2012. Dietary supplementation with the microalgae *Parietochloris incisa* increases survival and stress resistance in guppy (*Poecilia reticulata*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 18(2), 167-180.
- NATURLAND. 2013. Normas de Naturland para la Acuicultura Orgánica. Volumen 1. (<http://www.naturland.de/>)
- NELSON LIBARDO FORERO CHACON. 2008. "Análisis Sobre la Correlación Estadística Entre Radiación Solar Global y Temperatura Ambiente en Bogotá". En: Colombia .Revista Colombiana De Física *ed:* Revista De La Sociedad Colombiana De Fisica.40/2: 359 - 362.
- NEORI. A, THIERRY CHOPIN, MAX TROELLC, BUSCHMANNE A.H , KRAEMERF G.P, HALLINGD C, SHPIGELA M, YARISHG C. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231, 361-391.
- NEORI,A., KROM, M.D. AND VAN RIJN, J. 2007. Biogeochemical processes in intensive zero-effluent marine fish culture with recirculating aerobic and anaerobic biofilters. *J. Exp.Mar.Biol. Ecol.* 349: 235-247.
- NISHINO H, MURAKOSHI M, II T, TAKEMURA M, KUCHIDE M, KANAZAWA M, 2002. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis* 21:257–64.

- OGBONNA JC, YOSHIZAWA H, TANAKA H. 2000. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *J Appl Phycol* 12:277–284
- PARISENTI, J., BEIRÃO, L. H., MARASCHIN, M., MOURIÑO, J. L., DO NASCIMENTO VIEIRA, F., BEDIN, L. H., RODRIGUES, E. 2011. Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin. *Aquaculture nutrition*, 17/2, 530-535.
- PARSONS, T.R., MAITA, Y., LALLI, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 173p.
- PEREZ-RODRÍGUEZ, E., AGUILERA J., FIGUEROA, F.L. 2003. Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. A photoprotective role? *J. Experimental Botany* 384:1-8.
- PLOUGUERNÉ E, HELLIO C, DESLANDES E, VERON E, STIGER-POUVREAU V. 2008. Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Bot Mar* 51:202–208.
- PORTER, C.B., KROM, M.D., ROBBINS, M.G., BRICKELL, L., DAVIDSON, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture* 66: 287–297.
- PRASANNA RA, SOOD A, SURESH S, NAYAK S, KAUSHIK BD. 2007. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Bot Hung* 49:131–56.
- PRASANNA, R., SOOD, A., JAISWAL, P., NAYAK, S., GUPTA, V., CHAUDHARY, V. & NATARAJAN, C. 2010. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 46(2), 119-134.
- PULZ, O.; GROSS, W. 2004. Valuable Products from Biotechnology of Microalgae. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 65/6: 635–648.

- RAGAUSKAS, A.J., WILLIAMS, C.K., DAVISON, B.H., BRITOVSEK, G., CAIRNEY, J., ECKERT, C.A., FREDERICK, W.J., HALLETT, J.P., LEAK, D.J., LIOTTA, C.L., MIELENZ, J.R., MURPHY, R., TEMPLER, R., TSCHAPLINSKI, T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–489.
- REDMOND, S., L. GREEN, C. YARISH, , J. KIM, AND C. NEEFUS. 2014. New England Seaweed Culture Handbook-Nursery Systems. Connecticut Sea Grant CTSG-14/1:92.
- RENJUN WANG, HUI XIAO, YOU WANG, WENLI ZHOU, XUEXI TANG. 2007. Effects of three macroalgae, *Ulva linza* (Chlorophyta), *Corallina pilulifera* (Rhodophyta) and *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta) on the growth of the red tide microalga *Prorocentrum donghaiense* under laboratory conditions., *Journal of Sea Research*
- RICHMOND A. 2003. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford, 125–177.
- ROBERTSON-ANDERSSON, D., POTGIETER, M., HANSEN, J., BOLTON, J., TROELL, M., ANDERSON,R., HALLING, C., PROBYN, T. 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 20: 579-595.
- ROESIJADI, G., JONES, S.B., SNOWDEN-SWAN, L.J., ZHU, Y. 2010. Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis PNNL 19944. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA.
- SACHINDRA, N.M.; SATO, E.; MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; NIWANO, Y.; KOHNO, M.; MIYASHITA, K. 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8516–8522.
- SCHMIDT, L.E., HANSEN, P.J.,2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 67–81.

- SCHNEIDER, O., SERETI, V., EDING, E.H., VERRETH, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 32: 379–401.
- SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILGER W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulated fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51–62.
- SCHREIBER U, ENDO T, MI H, ASADA K .1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol* 36: 873-882.
- SCHUENHOFF, A., SHPIGEL, M., LUPATSCH, I., ASHKENAZI, A., MSUYA, F.E., NEORI, A., 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture* 221: 167-181.
- SCHUENHOFF, A., MATA L., SANTOS, R., 2006. The tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* as a novel seaweed biofilter. *Aquaculture* 252: 3–11.
- SEKAR S, CHANDRAMOHAN M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol* 20:113–36.
- SERGEJEVOVÁ, M.; MASOJÍDEK, J., 2011. Chlorella Biomass as Feed Supplement for Freshwater Fish: Sterlet, *Acipenser ruthenus*. In: *Aquaculture Research*; 44/1: 157–159.
- SHEIKHZADEH, N.; TAYEFI-NASRABADI, H.; KHANI OUSHANI, A. 2012. Effects of *Haematococcus pluvialis* Supplementation on Antioxidant System and Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Fish Physiology and Biochemistry* 38/1: 413–419.
- SHIELDS R. J y LUPATSCH I. 2012. *Algae for Aquaculture and Animal Feeds* by, Swansea University, UK, *Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis* 21/1

- SHPIGEL, M. Y NEORI, A. 2007. Microalgae, Macroalgae and Bivalves as biofilters in land based mariculture in Israel. Theresa m. Bert (ed). Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities, 6: 433–446
- SHPIGEL, M.; MCBRIDE, S.C.; MARCIANO, S. 2005. Improving Gonad Colour and Somatic Index in the European Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. In: Aquaculture 245/1–4: 101–109.
- SILVA-BENAVIDES A.M., TORZILLO G. 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures; J Appl Phycol 24:267–276.
- SMIT AJ, ROBERTSON BL, DU PREEZ DR.1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. J. appl. Phycol. 8: 473-481.
- SOLER-VILA, A.; COUGHLAN, S.; GUIRY, M.D. 2009. The Red Alga *Porphyra dioica* as a Fish-feed Ingredient for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on Growth, Feed Efficiency and Carcass Composition. In: Journal of Applied Phycology 21/5: 617–624.
- STRAND, A.; HERSTAD, O.; LIAAEN-JENSEN, S. 1998. Fucoxanthin Metabolites in Egg Yolks of Laying Hens. In: Comparative Biochemistry and Physiology 119/4: 963–974.
- SUKENIK, A., ESHKOL, R., LIVNE, A., HADAS, O. 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. Limnol. Oceanogr. 47,1656–1663.
- SUMAGAYSAY-CHAVOSO, N.S., SAN DIEGO-MCGLONE., DAVID L.T. 2004. Environmental capacity of receiving water as basis for regulating intensity of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) cultura. Journal of Applied Ichthyology. 20/ 6: 476–487

- THORARENSEN, H., FARRELL, A.P. 2011. The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture* 312, 1–14.
- TORZILLO G, PUSHPARAJ B, MASOJIDEK J, VONSHAK A. 2003. Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8:338–348.
- TROELL, M. 2009. Integrated marine and brackishwater aquaculture in tropical regions; research, implementation and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 21. Rome. FAO.
- TROELL M, RO“NNBA“CK C, HALLING C, KAUTSKY N, BUSCHMANN A.1999. Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *J Appl Phycol* 11:89–97.
- TROELL, M., HALLING C., NEORI, A. CHOPLIN, T., BUSCHMANN A.H., KAUTSKY ,N. YARISH C., 2003. Integrated mariculture: Asking the right questions. *Aquaculture*, 226: 69-90.
- TURNER, J.L.; DRITZ, S.S.; HIGGINS, J.J. 2002. Effects of *Ascophyllum nodosum* Extract on Growth Performance and Immune Function of Young Pigs Challenged with *Salmonella typhimurium*. In: *Journal of Animal Science* 80/7:1947–1953
- TURPIN DAVID H. 1991. Effects of Inorganic in Availability on Algal Photosynthesis and Carbon Metabolism. *Journal of Phycology* 27/ 1: 14–20.
- UICN. 2007. *Interracciones entre acuicultura y el medio ambiente. Guía para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Mediterránea.*
- VALIELA, I., MCCLELLAND, J., HAUXWELL, J., BEHR, P.J., HERSH, D., FOREMAN, K. 1997. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnol. Oceanogr.* 42:1105–1118.

- VAN ALSTYNE, K. L., WOLFE, G. V., FREIDENBURG, T. L., NEILL, A., HICKEN, C. 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Marine Ecology Progress Series*, 213, 53-65.
- VERA, J., CASTRO, J., GONZALEZ, A., MOENNE, A. 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar. Drugs* 9: 2514-2525.
- VERGARA, J.J., NIELL, F.X. 1993. Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). *J Phycol* 29:285-293.
- VILCHEZ C, FORJAN E, CUARESMA M, BEDMAR F, GARBAYO I, VEGA JM. 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar Drugs* 9:319-33.
- VILLAFANE VE, SUNDBÄCK K, FIGUEROA FL, HELBLING EW. 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 357-397.
- WALDENSTEDT, L.; INBORR, J.; HANSSON, I. 2003. Effects of Astaxanthin-rich Algal Meal (*Haematococcus pluvialis*) on Growth Performance, Caecal Campylobacter and Clostridial Counts and Tissue Astaxanthin Concentration of Broiler Chickens. In: *Animal Feed Science and Technology* 108/1-4: 119-132.
- WEGEBERG, S., FELBY, C. 2010. *Algae Biomass for Bioenergy in Denmark: Biological/ Technical Challenges and Opportunities*.
- WELLBURN, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307- 313.

- ZATKOVA, I.; SERGEJEVOVÁ, M.; URBAN, J. 2011. Carotenoid-enriched Microalgal Biomass as Feed Supplement for Freshwater Ornamentals: Albinic Form of Wels Catfish (*Silurus glanis*). In: Aquaculture Nutrition 17/3: 278–286.
- ZHANG, P, CHUNMEI, Z., XIAOXIAN, W., CHANGHONG, L., JIHONG J. YARONG, X. 2013. Growth competition between *Microcystis aeruginosa* and *Quadrigula chodatii* under controlled conditions. ; J Appl Phycol 25:555–565.
- ZHENG, Z.M., BAI, F.F., LU, K.H. 2008. Growth characteristics and competitive parameters of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* at different temperatures. Acta Hydrobiologica Sinica 32:720–728.

Una pequeña parte de este trabajado, fue presentado en forma de poster en el IV Simposio Internacional de Ciencias del Mar celebrado en Gran Canaria en junio del 2014.



Macroalgal biomass intensive tank production as affected by co-culture and nutrient dynamic

García Fernández, Y.¹, De Vera Soto, J.¹, Haroun, R.² Figueras, F.L.³ and Gómez Pincheff, J.L.¹

¹Centro de Investigación en Biología y Gestión Ambiental, Universidad de Las Palmas de G.C., Campus Universitario de Tafra, 35017 Las Palmas de G.C.

²Grupo de Fisiología y Biotecnología de Organismos Acuáticos, Dept. Biología, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Red and green macroalgae with biotechnological potential were intensively co-cultivated in 50 L tanks to test, as a new experimental approach, if biomass production and biofiltering capacities in nutrient enriched effluents were positive or negatively affected by different species growing in the same tank at the same time (co-culture), when compared to standard monoalgal cultures.

EXPERIMENT 1

Tank co-cultures of *Jania adhaerens* with *Hyalophyllum lacunae*, were assayed and data compared to monoalgal cultures of *H. lacunae*, *Hypnea spheerula*. Nutrients, $N-NH_4^+$ in an MTA system, fish (Sparus aurata) -algae, were continuously provided during 4 weeks, later a period of 2 weeks with running seawater (nutrients deprivation). The biomass was produced under different conditions combined effects of light irradiation conditions natural (100% PAR), natural under greenhouse (30% PAR + 10% LWA + 0% LWIR) and dynamic flow nutrient was modified over time (high input vs limitation), temperature. Biomass obtained from the different treatments was mainly evaluated, algal yields, ammonium biofiltering capacities to study the effect on the composition and accumulation of acid polysaccharides contents. Moreover, the dynamics followed by the species growing in mono-culture (*Hydrocoleus cornes* & *Hypnea spheerula*) and species growing together in co-culture (*Jania adhaerens* and *Hyalophyllum lacunae*) were compared, to establish some type of relation or association.



EXPERIMENT 2

Tank co-cultures of *Dodecoleus furcatus* with *Ulva rigida*, *Dodecoleus incoloratus* with *Hypnea musciformis* and *Hydrocoleus cornes*, were assayed and data compared to monoalgal cultures of *H. musciformis*, $N-NH_4^+$ in an MTA system, fish (Sparus aurata) -algae, were continuously provided during 8 weeks, later a period of 2 weeks with running seawater (nutrients deprivation) and finally 2 weeks with nutrients, $N-NH_4^+$ again. Under the combined effects of nutrients flow dynamic, algal yields and ammonium biofiltering capacities. Biomass obtained from the different treatments was mainly evaluated for antioxidant activity.

Species	Period	Yield (g/L)	Ammonium (mg/L)
<i>Hydrocoleus cornes</i>	Monoculture	~1.5	~1.0
	Co-culture	~2.5	~0.5
	Stress	~1.0	~1.5
	Recovery	~1.8	~0.8
<i>Hypnea spheerula</i>	Monoculture	~1.2	~1.2
	Co-culture	~2.0	~0.8
	Stress	~0.8	~1.8
	Recovery	~1.5	~1.0
<i>Jania adhaerens</i>	Monoculture	~1.0	~1.5
	Co-culture	~1.8	~0.8
	Stress	~0.5	~2.0
	Recovery	~1.2	~1.2
<i>Hyalophyllum lacunae</i>	Monoculture	~1.5	~1.0
	Co-culture	~2.5	~0.5
	Stress	~1.0	~1.5
	Recovery	~1.8	~0.8

- All the species in experiment 1 were adapted to the established culture conditions, incidence free floating and nutrient flow, showing great plasticity.
- Production in experiment 1 increased during the period with nutrient, the highest average production was for *Hydrocoleus cornes* and *Hypnea spheerula* compared with co-culture species. In the experiment 2, in the first period of nutrient supply production decreased, while in the second period after two weeks in only seawater, production increased, except in the case of *Ulva rigida* and *Dodecoleus furcatus*.
- The biofiltering capacities of the assayed species, under conditions of nutrient supply regarding NH_4^+ in the experiment 1 were over 40% and in the experiment 2 were higher than 60%. Regarding the NH_4^+ in experiment 1, the most efficient species was *Hydrocoleus cornes* followed by the co-culture species, *Hyalophyllum lacunae* and finally *Hypnea spheerula*, while in experiment 2 all the species remained stable.
- In experiment 1, the percentage of acidic polysaccharides obtained in the species assayed, had 2 dynamics, *Hydrocoleus cornes* and *Hypnea spheerula* produced more quantity of acid polysaccharides, while species of the co-culture produced less, in these species *Hyalophyllum lacunae* and *Jania adhaerens*, the metabolism is derived to produce other secondary metabolites with potential biotechnological applications.
- In experiment 2, under stress conditions due to the absence of nutrients, the antioxidant activity increased in the assayed species.
- Results reveal how algae species in co-cultivation might be an interesting approach for nutrient removal in integrated multi-trophic aquaculture units (IMTA), as well as the biomass produced might be treated to obtain high-value metabolites under the bio refinery concept.

