

IV Master Universitario Internacional En Acuicultura

Las Palmas de Gran Canaria, España

2006

ASIMILACIÓN Y BIOFILTRACIÓN DE FOSFATOS CON
MACROALGAS MARINAS DE INTERÉS PARA EL DESARROLLO
DE SISTEMAS INTEGRADOS EN ACUICULTURA. EFECTO DE LAS
VARIACIONES EN LA RELACIÓN N/P.

SALMA BENKADDOUR

ASIMILACIÓN Y BIOFILTRACIÓN DE FOSFATOS CON MACROALGAS
MARINAS DE INTERÉS PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS INTEGRADOS
EN ACUICULTURA. EFECTO DE LAS VARIACIONES EN LA RELACIÓN N/P.

SALMA BENKADDOUR

Trabajo realizado en el Centro de Biotecnología Marina, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección de Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti.

Y presentado como requisito parcial para la obtención del Título de Master Universitario Internacional en Acuicultura, 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 de Zaragoza (CIHEAM).

Director

Autora

Fdo: D. Juan Luis Gómez Pinchetti

Fdo: D^a. Salma Benkaddour

Taliarte (Las Palmas) a 7 de Febrero 2006

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Juan Luis Gomez Pinchetti, por haber aceptado dirigir este trabajo, por sus ánimos y por su ayuda. A la Dra. Carmen María Hernández Cruz por ayudarme a conseguir esta tesina.

A todos y cada uno de los miembros del Centro de Biotecnología Marina y A su Director el Dr Guillermo Gracia Reina por su acogida, su hospitalidad y su ayuda. A Sonia sin cuya ayuda este trabajo no hubiese sido lo que es ahora.

A los miembros del IAMZ y los del Grupo de Investigación en Acuicultura, por haberme brindado la gran oportunidad de participar al IV- Master Internacional en Acuicultura.

A mis amigos, compañeros de master, estudiantes de doctorado y a los miembros del equipo de seguridad del ICCM, por su amistad y sus ánimos.

A mis padres,

A Hafsa, Khaled et Zaki,

A todos mis seres queridos.

Lista de contenidos

Lista de contenidos	5
Abreviaturas.....	7
Lista de figuras	8
Lista de tablas	11
Resumen	13
Introducción.....	14
I- Las algas.....	14
1-Clasificación	14
2-Aplicaciones de las algas.....	16
3- El monocultivo de macrófitos	19
II- Acuicultura Integrada	21
1-Estado actual de la acuicultura	21
2-El impacto ambiental de la acuicultura	22
3-El tratamiento de los efluentes de la acuicultura	24
3-1- Tratamientos para la depuración de las aguas residuales de la acuicultura	24
3-2- Uso de organismos fotosintéticos como biofiltros.....	25
3-3- Uso de algas como biofiltro en sistemas de acuicultura integrada.....	25
III- El fósforo	27
1- El fósforo como fertilizante.....	27
2- El fósforo y la producción de ficocoloides.....	27
3- El fósforo como desecho de la acuicultura.....	29
4-La biofiltration del fósforo por las algas	29
Objetivos.....	31
Material y Métodos.....	33
I- Especies cultivadas.....	33
1- <i>Ulva rigida</i> C. Agardh.....	33
2- <i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh [sinónimo de <i>Hydropuntia cornea</i> (J. Agardh) M. J. Wynne].....	35
II- Diseño experimental	37
1-Precultivo.....	37
2-Experimentos a escala de laboratorio	39
3-Experimentos a escala de planta piloto	43
4-Estudio de la cinética de absorción y de la asimilación del fósforo por las algas.....	46
5- Tasa de crecimiento específica.....	49
6- Análisis bioquímicos de las algas.....	50
7- Análisis estadístico de los datos	52
Resultados.....	54
I- Biofiltración y asimilación de fósforo.....	54
1- Biofiltración y eliminación de fosfatos	54
2- Asimilación del fósforo en tejido	63
II- Tasas de crecimiento.....	69
1- Experimentos en cámara de cultivo.....	69
2- Experimentos en planta piloto.....	77
II- Composición química	81
1- Carbohidratos	81
1- Proteínas	89
Discusión	97

I- Biofiltración y asimilación de fosfatos	97
1- <i>Gracilaria cornea</i>	97
2- <i>Ulva rígida</i>	98
II- Tasas de crecimiento.....	100
1- <i>Gracilaria cornea</i>	100
2- <i>Ulva rigida</i>	101
II- Composición bioquímica	103
1- <i>Carbohidratos</i>	103
2- <i>Proteínas</i>	104
Conclusiones.....	106
Bibliografía	108

Abreviaturas

B: Eficiencia de biofiltración

FAO: Food and Agriculture Organization

IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

MAPA: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación

P: Producción

PF: Peso fresco escurrido = Peso húmedo

PS: Peso seco

TC: Tasa de crecimiento específica

Lista de figuras

Figura 1.- A y B: <i>Ulva rigida</i> C. Agardh	33
Figura 2.- A y B: <i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh.....	35
Figura 3.- A y B: Tanques para los cultivos mantenidos bajo condiciones de invernadero (condiciones de precultivo).....	38
Figura 4.- Sistema de cultivo empleado para los experimentos a escala de laboratorio bajo condiciones controladas con <i>Gracilaria cornea</i> (A) y <i>Ulva rigida</i> (B).	41
Figura 5.- Sistema de cultivo empleado para los experimentos a escala de planta piloto bajo condiciones de invernadero: (A) Vista general y (B) detalle de aporte de agua y aireación en un tanque.	44
Figura 6.- Diseño del sistema de aireación en interior de los tanques de cultivo.....	45
Figura 7.- Cinética de biofiltración de fosfatos por <i>Gracilaria cornea</i> , en las condiciones de la cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio: series 1, 2 y 3.....	56
Figura 8.- Cinética de biofiltración de fosfatos por <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio: series 1, 2 y 3.	59
Figura 9.- Cinética de biofiltración de fosfatos por <i>Gracilaria cornea</i> , mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes concentraciones de los pulsos fosfatos.....	61
Figura 10.- Cinética de biofiltración de fosfatos por <i>Ulva rigida</i> , cultivada en invernadero, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio.	62
Figura 11.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo, en función de varias combinaciones de aportes de amonio y fosfatos.....	64
Figura 12.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en cámara de cultivo, en función de varias combinaciones de aportes de amonio y fosfatos.	66
Figura 13.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero, en función del nivel de aporte de los fosfatos.	67
Figura 14.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero, en función del nivel de aporte de los fosfatos.....	68

Figura 15.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.....	71
Figura 16.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo.	72
Figura 17.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de cámara de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del contenido de fósforo en tejido.	72
Figura 18.- Comparación de muestras, de <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo y bajo diferentes tratamientos: (A) Control versus Tratamiento 1, (B) Control versus Tratamiento 2, (C) Control versus Tratamiento 3 y (D) Control versus Tratamiento 4 (ver Tablas 1 y 2).	73 -74
Figura 19.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos. .	76
Figura 20.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de cámara de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.....	77
Figura 21.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del nivel de contenido de fósforo en tejido.	78
Figura 22.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero.....	78
Figura 23.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del nivel de contenido de fósforo en tejido.	79
Figura 24.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero.....	80
Figura 25.- Variación del contenido en carbohidratos, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.....	82
Figura 26.- Variación del contenido en carbohidratos, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.	84
Figura 27.- Correlación entre el contenido carbohidratos y los contenidos en tejido de fósforo y nitrógeno <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de cámara de cultivo.	85
Figura 28.- Variación del contenido en carbohidratos, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.....	86

Figura 29.- Variación del contenido en carbohidratos, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.	87
Figura 30.- Correlación entre el contenido en carbohidratos y los contenidos en tejido de fósforo y nitrógeno para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero.	88
Figura 31.- Variación del contenido en ficoeritrina, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos. .	91
Figura 32.- Variación del contenido en proteína, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.	93
Figura 33.- Variación del contenido en ficoeritrina, para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero, bajo diferentes niveles de aporte de fosfatos.	94
Figura 34.- Correlación entre los contenidos en ficoeritrina y fósforo en tejido para <i>Gracilaria cornea</i> mantenida en condiciones de invernadero.	95
Figura 35.- Variación del contenido en proteína, para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero, bajo diferentes niveles de aporte de fosfatos.	95
Figura 36.- Correlación entre los contenidos en proteína y fósforo en tejido para <i>Ulva rigida</i> mantenida en condiciones de invernadero.	96

Lista de tablas

Tabla 1.- Protocolo experimental de los ensayos en cámara de cultivo, aporte de fósforo (P) y nitrógeno (N).....	40
Tabla 2.- Protocolo experimental de los ensayos en invernadero, aporte de P y N.	43
Tabla 3.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por <i>Gracilaria cornea</i> , bajo las condiciones de la cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte de amonio.	54
Tabla 4.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de los fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte de amonio.	58
Tabla 5.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por <i>Gracilaria cornea</i> , mantenida en condiciones de invernadero, en función de la concentración de los pulsos de fosfatos.	60
Tabla 6.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por <i>Ulva rigida</i> , mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes concentraciones de los pulsos fosfatos.	62
Tabla 7.- Variación del contenido de P en tejido (mg de P/ g de PS \pm DS) para <i>Gracilaria cornea</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.	63
Tabla 8.- Variación del contenido de P en tejido (mg de P/g de PS \pm DS) para <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.....	65
Tabla 9.- Variación de la Tasa de Crecimiento Específica TC (%. $d^{-1} \pm$ DS) para <i>Gracilaria cornea</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función de la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.	69
Tabla 10.- Variación de la Tasa de Crecimiento Específica TC (%. $d^{-1} \pm$ DS) para <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función de la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.....	75
Tabla 11.- Variación del contenido de Carbohidratos en tejido (% de PS \pm DS) para <i>Gracilaria cornea</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.	81
Tabla 12.- Variación del contenido de Carbohidratos en tejido (% de PS \pm DS) para <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.....	83
Tabla 13.- Variación del contenido de ficoeritrina en tejido (mg/g PS \pm DS) para <i>Gracilaria cornea</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.	89

Tabla 14.- Variación del contenido de Proteína en tejido (% de PS \pm DS) para <i>Ulva rigida</i> , en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.....	92
--	----

Resumen

La capacidad de asimilación y biofiltración, especialmente en lo que se refiere a la biofiltración de fosfatos, a escala de laboratorio y planta piloto en sistemas de cultivo intensivos, fue estudiada para dos especies de algas de las divisiones Chlorophyta y Rhodophyta, *Ulva rigida* y *Gracilaria cornea*. Se estudió igualmente el efecto de las relaciones N:P (Nitrógeno:Fósforo) sobre la capacidad de biofiltración y asimilación del fósforo, así como sobre el crecimiento del alga y la calidad de la biomasa final. Para ello se diseñó un experimento factorial, en el cual las algas eran fertilizadas según varios niveles de P (0, 10, 40, 70 y 100 μM) y de N (pulsos de 150 μM , en una frecuencia de 0, 3 y 7 veces a la semana). *Gracilaria cornea* (N:P = 10:1) mostró una mayor eficiencia de biofiltración y asimilación del fósforo que *Ulva rigida* (N:P = 30:1). Para las dos especies, la eficiencia de biofiltración varió según el contenido inicial de fosfatos en agua y según el tiempo transcurrido desde la adición del pulso. Para *Gracilaria cornea* no se observó ningún efecto del nivel de nitrógeno sobre la biofiltración y asimilación de fosfatos mientras que el efecto fue acusado para *Ulva rigida*. Para las dos especies el crecimiento fue máximo con frecuencias de adición de amonio de 3 pulsos por semana. El contenido de fósforo en tejido también tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento, hasta un nivel óptimo situado entre 1,0 y 1,6 mg de P. gr^{-1} PS para *Ulva rigida*, y entre 2,5 y 3,0 mg de P. gr^{-1} PS para *Gracilaria cornea*. Valores mas altos de fósforo en tejido, resultaron ser limitantes para el crecimiento. Para *Ulva rigida* los contenidos en fósforo y nitrógeno estaban correlacionados positivamente con el nivel de proteínas y negativamente con el de carbohidratos. Para *Gracilaria cornea*, no se observó ningún efecto del aporte de fósforo ni del nitrógeno sobre el contenido en carbohidratos.

Introducción

I- Las algas

El término alga comprende un conjunto muy heterogéneo que engloba aproximadamente 50.000 especies de organismos vegetales. Las algas son organismos capaces de realizar la fotosíntesis, de ahí que se les clasifique como organismos fotoautótrofos. Dentro del Reino Vegetal, las algas se caracterizan por carecer de verdaderos tejidos conductores, epidérmicos y de sostén (talófitos) contrariamente al resto de vegetales que si los poseen (cormófitos) (Cremades et al., 1998).

Dentro de las algas se suelen distinguir dos grupos principales, las algas unicelulares o microalgas y las algas pluricelulares o macroalgas.

1-Clasificación

La clasificación de las algas se basa fundamentalmente en caracteres bioquímicos, estructurales y en sus mecanismos y ciclos de reproducción.

En el caso de las macroalgas, basándose en su pigmentación se pueden clasificar en tres amplios grupos: feofíceas o algas pardas, rodofíceas o algas rojas y clorofíceas o algas verdes (Cremades et al., 1998).

Feofíceas

Las feofíceas o algas pardas son un grupo de algas eucariotas característico del medio marino. Su coloración parda es debida a la presencia en sus células de pigmentos fotosintéticos, denominados *fucoxantinas*, que enmascaran el color verde de las clorofilas. Las algas pardas son siempre pluricelulares.

Ciertas especies poseen en su pared celular coloides característicos, denominados *alginatos*, de naturaleza polisacáridica y que tienen un alto interés industrial, principalmente como espesantes y estabilizantes en alimentación.

Rodoficeas

Conocidas igualmente como algas rojas, estas algas se caracterizan por poseer en sus células pigmentos proteicos, denominados *ficobiliproteínas*, que enmascaran el color verde de las clorofilas. En el medio marino son el grupo de algas eucariotas más diversificado en número de especies y morfologías, siendo muy escasas en el medio continental.

Un gran número de especies poseen en sus paredes celulares *polisacáridos estructurales* que proporcionan consistencia estructural, y por sus características hidrofílicas son denominados *coloides*. Entre estos coloides destacan compuestos tales como el agar y los carragenatos. Estos coloides y sus derivados tienen innumerables aplicaciones industriales y constituyen el principal atractivo industrial de este grupo de especies.

Cloroficeas

Las algas verdes son un grupo de algas muy heterogéneo y ubicuista. A diferencia de los demás grupos, las cloroficeas tienen como principal pigmento la clorofila.

Este grupo engloba tanto algas unicelulares como pluricelulares. Junto con otros grupos las algas verdes son uno de los componentes principales del fitoplancton, de gran valor ecológico por ser el principal productor primario del planeta.

Estas algas no presentan un alto interés para la industria, no obstante tienen algunos usos en agropecuarias, alimentación humana, en sistemas de regeneración ambiental (procesos de biofiltración) y en la industria farmacéutica.

2-Aplicaciones de las algas

Según la FAO, el valor total anual de la producción de la industria de las algas se estima entre 5500 y 6000 millones de dólares EE.UU. De ese total, a los productos alimenticios para consumo humano corresponde un valor de 5000 millones de dólares. Las sustancias que se extraen de las algas, los hidrocoloides, representan una gran parte de los restantes miles de millones de dólares, mientras que el resto corresponde a diversos usos menores, como fertilizantes y aditivos para piensos (FAO, 2004).

○ *Usos en alimentación humana*

Existen algunas especies de algas destinadas a consumo humano cuya demanda es tan alta que gran parte de su producción proviene de su cultivo (Cremades et al., 1998).

Las principales características que hacen que las algas marinas sean un alimento interesante son su elevado contenido en polisacáridos y fibras, diversas sales minerales, oligoelementos, vitaminas y su contenido en proteínas. Las dos algas utilizadas para realizar el presente trabajo *Ulva rigida* y *Gracilaria cornea* tienen gran interés y posibilidades en el mercado del consumo humano.

○ *Usos agropecuarios*

Las algas se han estado usando desde hace mucho en las zonas costeras europeas como abonos, aportando sales minerales y oligoelementos, mejorando así la textura de la tierra debido a su contenido en polisacáridos iónicos y corrigiendo la acidez de los suelos. En los últimos años se han desarrollado multitud de fertilizantes o bioestimuladores a base de algas que estimulan el crecimiento y la producción, entre otras características, de las plantas (Cremades et al., 1998). Todas estas especies también tienen aplicación para consumo animal, incluidas amplias posibilidades en acuicultura animal.

- ***Usos industriales***

Las algas han sido utilizadas por la industria desde el siglo XVII, sobre todo para la extracción de compuestos inorgánicos como la sosa, potasa y yodo. Al descubrir nuevas fuentes de suministro de estos compuestos más rentables, el uso de las algas en éste tipo de industria fue disminuyendo (Perez, 1997).

Actualmente las algas presentan un gran interés para nuevas aplicaciones industriales, tales con la agroalimentaria y la textil, debido a la obtención industrial de ficocoloides (agar, carragenatos y alginatos). Los alginatos y los carragenatos son usados debido a sus propiedades espesantes en industria agroalimentaria y en una infinidad de otras aplicaciones debido a esa misma propiedad para la elaboración de pinturas, en la fabricación de pañales y de esponjas absorbentes, en odontología para coger las marcas dentales, en la fabricación de películas fotográficas, como impermeabilizantes, etc. (Perez, 1997).

Muchas algas rojas, pertenecientes principalmente a los órdenes de las Gelidiales y Gracilariales, son productoras de agar. Una de las aplicaciones más conocidas del agar es su utilización en la preparación de medios en Microbiología. La utilización casi exclusiva del agar frente a otros coloides para este fin se debe a sus peculiares características (formación de geles duros y resistencia a altas temperaturas). Aparte de su uso bacteriológico, el agar se usa también como aditivo gelificante y espesante en la elaboración de productos alimentarios. En biotecnología, la agarosa (una de las fracciones constituyentes del agar) se utiliza en diversas técnicas de purificación y separación fina (electroforesis y cromatografía) (Perez, 1997).

- ***Usos farmacológicos y cosméticos***

En la industria farmacéutica, el papel de las algas esta muy relacionado con las propiedades gelificantes de los ficocoloides que se usan para la elaboración de cubiertas

de píldoras, como excipiente de ciertos medicamentos o en la preparación de apósitos estériles para quemaduras (Cremades et al., 1998).

En los últimos años, la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento de enfermedades ha permitido el descubrimiento de algunos compuestos obtenidos a partir de algas marinas y que se pueden considerar principios activos contra determinadas enfermedades. Así mismo se han descrito propiedades antiviricas, antiinflamatorias, mucoprotectoras, antiulcerosas y lubricantes, hipotensivas, anticoagulantes, astringentes (caso de *Ulva*) y antitumorales. Otro uso de las algas y que cada día es más relevante es la dietética y la talasoterapia. Las algas son cada vez más usadas en la cosmética por la riqueza y diversidad de su composición química, fundamentalmente por sus oligoelementos (manganeso, magnesio, hierro, yodo, zinc y cobre), pigmentos carotenoides, ácidos grasos y vitaminas (Cremades et al., 1998).

- ***Usos medioambientales (biotransformación y control ambiental)***

Otros usos destacables de las algas son su empleo como fuente de energía mediante bioconversión y para la obtención de biogas. Su uso como bio-indicadores de las condiciones del medio así como biofiltros para la depuración de aguas residuales (Cremades et al., 1998).

Además de la biofiltración de las aguas residuales de las piscifactorías, las algas son usadas para filtrar contaminantes mucho mas peligrosos como ciertos metales pesados ya que tienen la capacidad de concentrarlos en sus tejidos (Cremades et al., 1998).

3- El monocultivo de macrófitos

3-1- Reproducción y métodos de cultivo

Las algas pueden presentar dos tipos de reproducción: asexual o vegetativa y sexual. Son capaces de recurrir a una u otra forma de reproducción en función de las condiciones ambientales (IFREMER, <http://www.ifremer.fr>). Las diferentes técnicas de cultivo desarrolladas hasta el momento, más o menos complejas, se basan en algunas de estas particularidades descritas.

Entre las técnicas basadas en la reproducción asexual se pueden distinguir el cultivo por injertos en sustratos artificiales, generalmente cuerdas (ej. *Eucheuma*, *Gracilaria* en mar abierto), o flotando libres en la columna de agua, fundamentalmente en sistemas de cultivo intensivos en tierra. La biomasa producida y las posteriores generaciones que se suceden son genéticamente¹ idénticas y se habla entonces de generaciones clónicas (Cremades et al., 1998).

3-2- Requerimientos nutricionales

Las algas requieren carbono inorgánico, agua, luz, y varios iones minerales para la fotosíntesis y el crecimiento. Entre los más de 21 elementos requeridos por las algas solo unos cuantos se consideran como limitantes² (Lobban y Harrison, 1997). Estos nutrientes se agrupan en tres categorías: macronutrientes (N,P,C), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mo) y vitaminas. El nitrógeno y el fósforo suelen considerarse los elementos más importantes en relación al crecimiento algal en la mayoría de ambientes naturales (Harrison y Hurd, 2001).

¹ La evolución y adaptación de los organismos que se reproducen únicamente por vía asexual depende exclusivamente a los cambios genéticos debidos a las mutaciones genéticas contrariamente a la reproducción sexual según la cual las nuevas generaciones tienen una composición genética diferente a la de los progenitores.

² Un nutriente se considera como limitante cuando su presencia en cantidades inferiores a las requeridas no es la suficiente como para permitir el máximo crecimiento del alga cuando los demás factores para el desarrollo algal son óptimos.

La proporción entre dos nutrientes para que un alga tenga un crecimiento óptimo se llama cociente óptimo. Para obtener un cultivo óptimo de un alga determinada habría que fertilizar el agua con nutrientes en dicha proporción.

La determinación de la combinación óptima de nutrientes, en especial N y P, es muy importante ya que evita que haya pérdidas económicas en los sistemas de cultivo debidas a una fertilización excesiva además de afectar la síntesis y producción de ficoloides en las diferentes especies (Chopin y Yarish, 1998; Harrison y Hurd, 2001).

II- Acuicultura Integrada

1-Estado actual de la acuicultura

Según la FAO, la producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura suministró alrededor de 101 millones de toneladas de pescado para el consumo humano en 2002, lo que equivale a un suministro per cápita aparente de 16,2 kg (FAO, 2004). Según las proyecciones establecidas, la demanda total mundial de pescado y productos pesqueros aumentará en casi 50 millones de toneladas, de 133 millones en 1999/2001 a 183 en 2015 (FAO, 2004). De los 43 millones de toneladas en que se prevé el incremento de la producción mundial de pescado de 1999/2001 a 2015, el 73% se debería a la acuicultura que, según las proyecciones, representaría el 39% de la producción mundial de pescado en 2015 (frente a 27,5% en 1999/2001) (FAO, 2004). La evolución registrada en los últimos años en estos dos sectores, confirma las tendencias ya observadas al final del decenio de 1990 que se concretan en que la producción de la pesca de captura se está estancando y que la producción acuícola está creciendo (FAO, 2004).

Pero para continuar esta progresión será fundamental resolver cuestiones básicas, sin las cuales el aumento de la producción acuícola no podría realizarse de manera sostenible. Entre ellas destacan un esfuerzo sostenido de la investigación biológica (tanto de las especies hoy cultivadas como para diversificar la producción), el desarrollo de una tecnología adecuada, la aplicación de estudios de mercado a este sector y especialmente el mantenimiento de la calidad del medio ambiente (Molina Domínguez, 2005).

Este último aspecto ocupa una atención especial en la progresión de este sector a diferencia con lo que ocurre con otras actividades mucho más antiguas y potencialmente tan contaminantes, como la ganadería o la agricultura. La importancia de los aspectos medioambientales en la acuicultura moderna puede deberse a varios motivos como el

momento en el cual ha experimentado su principal desarrollo (la segunda mitad del siglo XX) época en la que se vive un desarrollo inminente de la conciencia medioambiental; y el hecho de que el mantenimiento de la calidad del medio sea una necesidad básica para la propia producción (Molina Domínguez, 2005). Un ejemplo de este tipo de consideraciones descritas son las granjas de salmón en países como Noruega, ya sujetas a una legislación y reglamentación en cuanto al emplazamiento, control de enfermedades, uso de medicamentos, interacción con otras especies, descargas de efluentes y cuotas de alimentación (Neori et al., 2004).

Por otra parte los propios acuicultores son cada vez mas conscientes de que su propia producción depende de la calidad del medio y que los primeros en sufrir las consecuencias de la eutrofización de las aguas y lo que ello conlleva como desarrollos masivos de algas, anoxias y desarrollo de parásitos (Neori et al., 2004).

2-El impacto ambiental de la acuicultura

Los efectos potenciales de la acuicultura pueden reflejarse en distintos aspectos, como la calidad del agua y los sedimentos, las poblaciones naturales existentes en el ecosistema y las otras actividades económicas pre-existentes (Molina Domínguez, 2005).

En general se acepta que la acuicultura tiene, comparativamente con otras actividades humanas, un impacto ambiental bajo (Pérez Pastor, 2005). Sin embargo, los efluentes acuícolas son una fuente de contaminación para los ecosistemas marinos (Pérez Pastor, 2005), ya que estos tienen elevadas concentraciones de nutrientes disueltos, sólidos en suspensión y materia orgánica particulada (Pérez Pastor, 2005) siendo este efecto mas evidente para los sistemas de cultivo intensivo.

Los nutrientes (principalmente el nitrógeno y el fósforo) y la materia orgánica disuelta se localizan en la columna de agua, y quedan disponibles para los organismos autótrofos. Ello puede provocar una proliferación excesiva de éstos, especialmente en zonas con intercambio de agua restringido, donde además se suelen acumular las algas. Estos nutrientes disueltos en el agua generan un enriquecimiento que conlleva la proliferación de productores primarios a expensas del exceso de nutrientes, en particular del nitrógeno y fósforo, proceso denominado eutrofización. El material particulado afecta al fondo marino produciendo una degeneración de este (anoxia, cambio en la comunidad bentónica) en las zonas donde se produce la sedimentación (Pérez Pastor, 2005).

El impacto medioambiental de una piscifactoría marina depende en gran parte de la especie cultivada, del método de cultivo, de la densidad del stock, de la composición y características del alimento añadido, de la técnica de alimentación y de las condiciones hidrográficas (Pérez Pastor, 2005).

Con el objetivo de minimizar el nivel de descargas de nutrientes a los ecosistemas acuáticos (marinos y continentales) se han desarrollado una multitud de técnicas como la racionalización de los aportes alimentarios, la elaboración de dietas con menos “leaching”, y el uso de estabilizadores de las heces. Sin embargo, de 20 a 30% del nitrógeno y 60 a 70% del fósforo contenidos en las dietas no son consumidos por los peces y son expulsados al medio en forma de heces. De ahí, el interés en el desarrollo de sistemas de biofiltración de las aguas residuales de la acuicultura (Chopin y Yarish, 1998).

3-El tratamiento de los efluentes de la acuicultura

3-1- Tratamientos para la depuración de las aguas residuales de la acuicultura

Actualmente existen varios métodos, más o menos eficientes, para depurar las aguas de los nutrientes disueltos mediante uso de filtros químicos o biológicos.

Los filtros químicos son esencialmente de dos tipos: filtros de carbón activado y filtros de intercambio aniónico; ambos tienen el inconveniente de obstruirse rápidamente (Troell et al., 2003).

En la categoría de filtración biológica se usan dos técnicas. Una es la utilización de filtros bacterianos que transforman los desechos en iones menos contaminantes que se disuelven y/o en gases que pasan a la atmósfera y la otra es la transformación de los desechos en biomasa utilizando los denominados sistemas integrados en donde diferentes niveles y organismos, como moluscos filtradores y macroalgas, utilizan los desechos, sólidos o disueltos, producidos en los estanques primarios (Neori et al., 2004; Pérez Pastor, 2005).

Los filtros bacterianos mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción transforman el nitrógeno amoniacal en nitrito (nitrificación) en el más simple de los casos o pueden transformar bajo condiciones específicas³ los desechos en gases no nocivos N_2 y CO_2 que son liberados a la atmósfera (Troell et al., 2003; Neori et al., 2004; Pérez Pastor, 2005). La utilización de este tipo de filtros, debido a su alto coste, es económicamente viable únicamente para su uso en sistemas de cultivo relativamente pequeños y de gran valor comercial tales como los peces de acuarios (Neori et al., 2004).

³ Anaerobiosis y presencia de ciertas materias orgánicas.

3-2- Uso de organismos fotosintéticos como biofiltros

La biofiltración mediante organismos fotosintéticos, plantas superiores o algas, es un proceso asimilativo. Los vegetales incorporan los nutrientes inorgánicos disueltos de los vertidos y mediante el proceso fotosintético crean nueva biomasa.

Igual que lo que sucede en los esquemas tradicionales de sistemas de policultivo, en los sistemas de maricultura intensiva el uso de vegetales (plantas superiores o algas) puede disminuir drásticamente los aportes en alimento al sistema y los impactos ambientales generando al mismo tiempo un valor añadido (Neori et al., 2004) ya sea por el propio valor comercial de las algas (ficocoloides, pigmentos, etc) o por su valor indirecto debido a su uso como alimento para los animales que se hallan en co-cultivo con estas mismas (Troell et al., 2003).

Entre las plantas, las algas y en especial las macroalgas son las mas apropiadas para la biofiltración debido a su alta productividad y a que su cultivo en estas condiciones resulta económicamente rentable y sostenible (Neori et al., 2004).

3-3- Uso de algas como biofiltro en sistemas de acuicultura integrada

El uso de algas para biofiltración de nutrientes fue sugerido por primera vez por Ryther et al. (1975). El cultivo de algas conjuntamente con otras especies marinas no solo mitiga los efectos debidos al aumento de nutrientes, sino que produce mejoras en otros aspectos como el oxígeno disuelto, el pH y los niveles de CO₂ en el agua (Pérez Pastor, 2005).

La maricultura integrada puede realizarse tanto en mar abierto (aguas costeras) como en instalaciones basadas en tierra y puede ser altamente intensificada (Neori et al., 2004).

La elección de una especie de macroalga como biofiltro para un cultivo integrado debe hacerse sobre la base de una serie de requisitos básicos: altas tasas de crecimiento y de contenido tisular en nitrógeno, facilidad de cultivo y control del ciclo de vida, resistencia a los epífitos y a enfermedades y por ultimo adecuación de las características ecofisiológicas al medio de crecimiento (Neori et al., 2004).

El uso de las algas para biofiltrar aguas residuales de piscifactorías puede tener sus ventajas e inconvenientes, desde un punto de vista económico, si se ve desde la perspectiva de un algocultor.

Por una parte, las aguas residuales ricas en nutrientes sirven para fertilizar los cultivos de algas, ahorrando en costes de producción, sobre todo en épocas estivales durante las cuales el nivel de nutrientes en el agua disminuye.

Por otra parte, un exceso de nutrientes puede dar lugar al denominado efecto “Neish”, fenómeno por el cual la producción de metabolitos (agar y carragenatos) se ve desfavorecida por un aporte excesivo de nutrientes (nitrógeno y fósforo). De ahí, el interés de los estudios de los efectos de asimilación de N y P por las algas para el desarrollo de sistemas de cultivo integrado.

III- El fósforo

1- El fósforo como fertilizante

Los nutrientes y la luz son los factores medioambientales que más afectan la productividad y el rendimiento de un cultivo de algas. Manipulando el aporte de nutrientes se pueden controlar la producción en biomasa, el rendimiento del cultivo, el desarrollo de epífitos y la síntesis de ciertos productos del metabolismo. El carbón, el nitrógeno y el fósforo son los tres elementos que se aportan para fertilizar cultivos comerciales a grandes escalas (Harrison y Hurd, 2001).

En agua de mar el fósforo se presenta como ortofosfato inorgánico libre (mayormente en forma de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) junto con complejos de metalofosfatos (con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{2+}), polifosfatos, y algunos compuestos fosforados orgánicos. El ortofosfato inorgánico libre representa menos de un tercio del fósforo contenido en agua de mar. No obstante esta forma es la mejor asimilada por las algas marinas (Lobban y Harrison, 1997).

2- El fósforo y la producción de ficocoloides

Durante la década de los 70, la gran mayoría de los estudios relacionados con la nutrición, el crecimiento de las algas y la producción de ficocoloides se focalizaban sobre el nitrógeno ya que este era considerado como el nutriente más limitante en aguas costeras. Estos estudios condujeron al planteamiento del concepto del “efecto Neish” según el cual las algas cultivadas en agua de mar no enriquecida con nitrógeno presentan un mayor contenido en ficocoloides (carragenatos o agar) que aquellas cultivadas en aguas enriquecidas con nitrógeno (Chopin y Wagey, 1999).

El fósforo, sin embargo, recibía poca atención como factor limitante hasta los años 80 cuando varios estudios empezaron a sugerir que el fósforo podía ser aun más

limitante que el nitrógeno en algunos ecosistemas costeros, la mayoría subtropicales o tropicales y pocos templados (Chopin y Yarish, 1998). Así mismo varios estudios han demostrado que el fósforo podía ser limitante en el Atlántico noroeste, en las costas sureñas de China y en partes del Mediterráneo (Lobban y Harrison, 1997), de ahí que este nutriente cobrase importancia en trabajos de investigación para comprobar si ejercía algún efecto similar al “efecto Neish” descrito para el nitrógeno. Se pudo demostrar que el fósforo afectaba tanto la producción de carragenatos (Chopin et al., 1990) como la producción de agar (Chopin y Wagey, 1999).

Generalmente, la limitación en nutrientes⁴ reduce la producción⁵ y la actividad fotosintética de las algas y por otro lado aumenta la producción de ficocoloides (Chopin y Yarish, 1998). Este efecto, contrario, hace que la abundancia y disponibilidad de nutrientes para las algas sea o no deseada según los objetivos del cultivo. Si el objetivo del cultivo es la producción de ficocoloides la estrategia de cultivo que se sigue es de limitar el aporte de los nutrientes para optimizar la producción de estos metabolitos. Si el objetivo del cultivo es la producción de altos niveles de biomasa (para otros usos en particular la alimentación humana o animal) la estrategia a seguir es la de aportar los nutrientes a altas concentraciones lo que permite obtener unas producciones elevadas y un crecimiento muy rápido. Generalmente esto no se suele hacer sino que se suelen aprovechar los desechos de otras actividades antropogénicas (agricultura, piscicultura, o conserveras de pescado) a las aguas costeras para cultivar las algas en estas aguas con altos contenidos en nutrientes (Chopin y Yarish, 1998).

⁴ Mayormente el nitrógeno y el fósforo.

⁵ Producción en términos de tasas de crecimiento.

3- El fósforo como desecho de la acuicultura

El contenido en fósforo de los piensos utilizados en acuicultura varía entre un 1% y un 1,6% y el nitrógeno está entre un 9% y un 11% (Pérez Pastor, 2005). El fósforo contenido en las aguas residuales de acuicultura puede presentarse bajo dos formas particulada y disuelta. Aproximadamente el 23% es excretado como material disuelto y el 77% como material particulado (Pérez Pastor, 2005). La fracción de fósforo particulada sedimenta sobre el fondo donde es secuestrada. Posteriormente, mediante procesos de deadsorción y biológicos, entre el 7% y el 64% de este fósforo se solubiliza y pasa a la columna de agua (Pérez Pastor, 2005).

4-La biofiltration del fósforo por las algas

Generalmente las algas tienen la capacidad de almacenar en sus tejidos los nutrientes cuando estos están presentes en exceso en el medio, para poder usarlos para mantener sus tasas de crecimiento, cuando el nivel de nutrientes en el medio es limitante (Harrison y Hurd, 2001). El uso de algas como biofiltros se basa en parte sobre esta capacidad de asimilación y almacenamiento de nutrientes en sus tejidos.

Varios estudios han demostrado que las macroalgas marinas tienen la capacidad de absorber de manera activa el fósforo del medio cuando éste está presente a bajas concentraciones. Pero se ha demostrado igualmente que a altas concentraciones del fósforo en el medio otro mecanismo de absorción es activado; resultando en un mecanismo bifásico de absorción. Este tipo de estrategia es común en las plantas superiores, lo que les permite evitar deficiencias en nutrientes y almacenar los nutrientes en su tejido (Martínez y Rico, 2004). Así mismo Martínez y Rico (2004), han descrito para el alga roja *Palmaria palmata* una absorción bifásica y no saturable del fósforo inorgánico. Los mismos resultados fueron descritos por Friedlander y Dawes (1985)

para *Gracilaria tikvahiae*. Lo que significa que ciertas algas tienen la capacidad de ajustar las tasa de absorción del fósforo según la concentración de este en el medio usando diferentes mecanismos con el aumento de las concentraciones (Friedlander y Dawes, 1985).

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal el análisis de la capacidad de asimilación y biofiltración a escala de laboratorio y planta piloto en sistemas de cultivo intensivos de dos especies de algas de las divisiones Chlorophyta y Rhodophyta, respectivamente *Ulva rigida* y *Gracilaria cornea*, especialmente en lo que se refiere a la biofiltración de fosfatos.

La peculiaridad de este trabajo se encuentra en considerar la importancia de los fosfatos en las aguas residuales de piscifactorías en comparación a la importancia dada, hasta el momento, a los compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos). Esto es debido a que se considera que en la mayoría de los ecosistemas marinos el nitrógeno es el nutriente más limitante, además de ser el elemento más abundante en las aguas residuales de piscifactorías.

A la hora de concebir y diseñar este trabajo se optó por abordar el tema desde dos perspectivas diferentes pero complementarias:

1. El uso de las algas como biofiltros de las aguas residuales de las piscifactorías y tenía como principales objetivos:

- Evaluar la biofiltración del fósforo por algas cuya capacidad de biofiltración de compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos) ha sido ampliamente estudiada;
- Trazar una cinética de filtración de los fosfatos por las dos especies algales con el fin de comparar la eficiencia de biofiltración de fosfatos por las dos especies;
- Estudiar la asimilación y el almacenamiento del fósforo en tejido por dichas algas.

2. La mejora de las condiciones de cultivo de las algas sobre todo en lo que se refiere a los aportes de fosfatos como nutriente; siendo los objetivos principales del cultivo lograr altas producciones y mantener un cultivo sostenible. Tenía como principales objetivos:

- Estudiar el efecto del fósforo sobre el crecimiento y la calidad de las algas (ficobiliproteínas, proteínas totales, carbohidratos);
- Estudiar el efecto combinado N/P sobre estos mismos elementos (asimilación y almacenamiento de N y P, el crecimiento y calidad de la biomasa algal).

El presente trabajo persigue como objetivo finalista la obtención de un sistema que presente un compromiso entre la biofiltración de efluentes de piscifactorías y la producción de una biomasa algal de alta calidad en sistemas de cultivo intensivos a escala de planta piloto.

Material y Métodos

I- Especies cultivadas

Para realizar el presente estudio se utilizaron dos especies de macroalgas de la División Chlorophyta, *Ulva rigida*, y de la División Rhodophyta, *Gracilaria cornea*.

1- *Ulva rigida* C. Agardh

Esta alga pertenece al:

Phylum: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Ulvales

Familia: Ulvacea



***Figura 1.- A y B: Ulva rigida* C. Agardh**

Es un alga verde cosmopolita, común de las costas mediterráneas, extendiéndose en el Océano Atlántico desde las Islas Canarias hasta el Reino Unido. En las Canarias *Ulva rigida* crece en las costas de todas las islas del archipiélago. Es una especie tanto eurihalina como euriterma (Perez et al., 1992). Puede crecer tanto en la zona litoral como en la sublitoral, sobre las rocas, maderas, otras algas y en terrenos arenosos, y de forma libre en puertos y bahías protegidas e incluso en lagos. Las especies del género *Ulva* proliferan en ambientes iluminados y con exceso de nutrientes, de ahí que abundan en zonas portuarias e intervengan en la formación de “mareas verdes”. *Ulva rigida* es observada de forma común durante los meses de verano pero puede estar presente todo el año (MAPA, 1998-2000).

Esta especie es utilizada de forma general en experimentos de biofiltración de aguas residuales ya que por sus características de crecimiento de tipo oportunista, se desarrolla de manera óptima bajo condiciones de cultivo intensivo, libre en la columna de agua y bajo concentraciones elevadas de nutrientes inorgánicos.

La biomasa utilizada en los experimentos fue recolectada en la zona de Taliarte, costa este de Gran Canaria.

2- *Gracilaria cornea* J. Agardh [sinónimo de *Hydropuntia cornea* (J. Agardh) M. J. Wynne]

Esta especie pertenece al:

Phylum : Rhodophyta

Clase Rhodophyceae

Orden Gracilariales

Familia: Gracilariaceae



Figura 2.- A y B: *Gracilaria cornea* J. Agardh

Las especies del género *Gracilaria* son características de costas arenosas, protegidas o moderadamente expuestas. La mayoría de las especies de *Gracilaria* son capaces de sobrevivir mucho tiempo totalmente cubiertas por arena. Pueden también vivir sueltas formando, en estuarios y lagunas litorales, grandes masas flotantes que, en las costas atlánticas, se depositan sobre la arena o el fango en la bajamar (Cremades et al., 1998).

El género *Gracilaria* tiene una distribución cosmopolita, desde zonas árticas hasta zonas templadas o tropicales (FAO, 1990).

Los brotes con los cuales fueron realizados los experimentos son originarios del Caribe, y fueron cedidos por el Prof. I. Levy (Haifa, Israel) después de ser adaptados a condiciones de cultivo intensivo y han sido mantenidos bajo las condiciones de cultivo del CBM desde hace más de 10 años.

II- Diseño experimental

Para poder realizar los objetivos marcados por el trabajo, se llevaron acabo dos series de experimentos. La primera serie consistió en cultivar las algas a escala de laboratorio dentro de una cámara de cultivo, mientras que la segunda serie de experimentos, consistió en realizar los cultivos a escala de planta piloto bajo condiciones de invernadero.

Los experimentos a escala de laboratorio, realizados bajo condiciones controladas podrían ser considerados como un preludio para los experimentos a escala de planta piloto, ya que en base a los resultados obtenidos durante esa primera serie de experimentos se diseño la segunda parte.

El desarrollo de los cultivos a escala de planta piloto permitió estudiar la respuesta de los cultivos en condiciones ambientales (principalmente temperatura e irradiación) reales y menos controlables.

1-Precultivo

Las algas con las cuales se realizo la experimentación fueron cosechadas a partir de cultivos de mantenimiento que se llevan a cabo dentro de las instalaciones del CBM (Fig. 3).

Dichos cultivos estaban mantenidos con agua de mar enriquecida con amonio y fosfatos con una relación N: P de 10:1. Antes de empezar cada uno de los experimentos se procedió a un acondicionamiento de la biomasa, con la cual se iba a realizar el experimento correspondiente, para agotar sus reservas en nitrógeno. El acondicionamiento consistió en mantener las algas durante un período de una semana con agua de mar filtrada sin fertilizar. Este periodo de acondicionamiento se llevo a cabo bajo condiciones de fotoperiodo, temperatura y radiación ambientales.

Antes de empezar cada experimento las algas fueron limpiadas de epifitos y se recogieron muestras iniciales que fueron conservadas a -20°C para su posterior análisis. Para los cultivos en cámara de cultivo se cortaron los talos en fragmentos de 3 a 5 cm para facilitar su movimiento dentro de los fotobioreactores.



Figura 3.- A y B: Tanques para los cultivos mantenidos bajo condiciones de invernadero (condiciones de precultivo).

2-Experimentos a escala de laboratorio

2-1- Protocolo experimental

Se diseñó un experimento factorial en el cual se combinaron diferentes concentraciones de P y N. Cada ensayo se componía de 3 series y cada serie permitía el estudio de 5 combinaciones de P/N (Tabla 1). Se aplicaron 4 tratamientos diferentes de fósforo, de concentraciones 10, 40, 70 y 100 μM . Cada tratamiento se realizó por duplicado, con un control igualmente por duplicado. Después de un experimento preliminar se optó por añadir 1 pulso de fósforo por semana. Los pulsos se daban cada semana después de haber renovado el agua, lavado los fotobioreactores, cosechado las algas y ajustado la densidad de cultivo. Esto permitió que no hubiera interferencias entre el fósforo residual en el agua proveniente de pulsos anteriores a la hora de hacer el seguimiento de biofiltración del P por las algas.

Cada ensayo se componía de 3 series de experimentos y una duración de 42 días. La primera serie consistió en combinar los pulsos de fósforo con pulsos de nitrógeno, cada dos días, a una concentración de 150 μM , durante dos semanas. La segunda serie consistió en combinar los pulsos de fósforo con pulsos diarios de nitrógeno a una concentración de 150 μM , durante dos semanas. Y por último la tercera serie consistió en no dar ningún pulso de nitrógeno.

Los controles estaban sometidos a los mismos tratamientos de nitrógeno que el resto de tratamientos.

Tabla 1.- Protocolo experimental de los ensayos en cámara de cultivo, aporte de fósforo (P) y nitrógeno (N).

<i>Tratamiento</i>	<i>Serie 1</i>		<i>Serie 2</i>		<i>Serie 3</i>	
	<i>P : N (μM:μM)</i>	<i>Pulsos de N</i>	<i>P : N (μM: μM)</i>	<i>Pulsos de N</i>	<i>P : N (μM: μM)</i>	<i>Pulsos de N</i>
1 (control P)	0:150		0:150		0:0	
2	10:150	1 pulso	10:150	1 pulso	10:0	
3	40:150	cada	40:150	diario	40:0	0 pulsos
4	70:150	2 días	70:150		70:0	
5	100:150		100:150		100:0	
<i>Duración</i>	<i>Semanas 1 y 2</i>		<i>Semanas 3 y 4</i>		<i>Semanas 5 y 6</i>	

2-2- Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en 10 fotobioreactores, de Nalgene transparentes, de una capacidad total de 10 l. Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen de 8 l. El experimento se hizo bajo circuito de agua cerrado y las algas fueron mantenidas bajo el régimen de nutrientes establecido (Tabla 1), temperatura de 20 ± 1 °C, fotoperiodo de L/O: 14/10⁶; y una radiación de 250 a 275 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ medida con un radiómetro LICOR equipado con un sensor esférico. Cada fotobioreactor estaba equipado con un tubo de aireación, de 0,5 cm. de diámetro, conectado a una línea principal de aireación. El nivel de burbujeo era tal que pudiese permitir un buen movimiento de las algas sin llegar a producir estrés físico sobre las mismas.

⁶ L/O: Luz/Oscuridad; Día : 8h-22h / Noche : 22h-8h.



Figura 4.- Sistema de cultivo empleado para los experimentos a escala de laboratorio bajo condiciones controladas con *Gracilaria cornea* (A) y *Ulva rigida* (B).

2-3-Medio de cultivo

Las algas fueron mantenidas con agua de mar filtrada por 0,22 μm que era renovada cada semana. Se optó por no usar ningún medio de cultivo preparado para mantener unas condiciones de cultivo lo más similares a las que se tendría en un cultivo a gran escala abastecido con aguas residuales de piscifactorías. El N y P se aportaban según lo establecido por el protocolo experimental (Tabla 1). El nitrógeno se dispensaba en

forma de cloruro de amonio NH_4Cl y el fósforo se administraba en forma de di-sodio hidrógeno fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

2-4-Densidad de cultivo

➤ *Gracilaria cornea*

Para los ensayos con *G. cornea* se usó una densidad de cultivo de 6 g de peso fresco por litro de medio. Se recortaron las partes apicales, y más jóvenes de los talos, para realizar los experimentos.

➤ *Ulva rigida*

Para los ensayos con *U. rigida* se usó una densidad de cultivo de 4 g de peso fresco por litro.

2-5- Mantenimiento del cultivo

Para mantener la densidad de cultivo establecida se fueron realizando cosechas semanales. Al cabo de cada semana se renovaba el medio en el que se mantenían las algas. Estas eran pesadas después de escurrirlas, y en caso de que hubiera excedente de biomasa, se ajustaba la densidad a la densidad inicial. Se limpiaban las algas de los epifitos y se cortaban los fragmentos para estar en un rango de 3 a 5 cm antes de volver a ponerlas en los fotobioreactores limpios.

El excedente de biomasa era aclarado con agua destilada para limpiarlas de los nutrientes contenidos por el agua de mar y que se quedan adheridos a las paredes, y con unas pinzas se quitaban cuidadosamente los restos de epifitos que pudiesen haber quedado pegados a las algas y se conservaba a -20°C para su posterior análisis.

3-Experimentos a escala de planta piloto

3-1- Protocolo experimental

Contrariamente a los experimentos realizados dentro de la cámara de cultivo, para los experimentos en invernadero no se vario la frecuencia de los pulsos del nitrógeno. En cada experimento se llevo a cabo una sola serie, de 15 días, en la cual se aplicaron 3 tratamientos diferentes de fósforo, de 10, 40 y 70 μM , dispensados en pulsos diarios, con un control. Al mismo tiempo se fueron dando pulsos diarios de nitrógeno de 150 μM para todos los tratamientos además de los controles. Cada una de las combinaciones de P:N se hizo por duplicado incluyendo el control (Tabla 2).

Tabla 2.- Protocolo experimental de los ensayos en invernadero, aporte de P y N.

<i>Tratamiento</i>	<i>P:N (μM: μM)</i>	<i>Pulsos de P y N</i>
1 (control de P)	0 : 150	<i>1 pulso cada día</i>
2	10 : 150	
3	40 : 150	
4	70 : 150	

3-2-Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en 8 tanques circulares de polietileno blancos, de un volumen de 90 litros y con un área en superficie de 0,2 m² (Fig. 5). El agua de mar, sin tratamiento ni filtración previa, era bombeada directamente a los tanques de cultivo.

Para el seguimiento de las condiciones ambientales de radiación se usó un radiómetro ELDONET (Real Time Computer, Erlangen, Alemania).

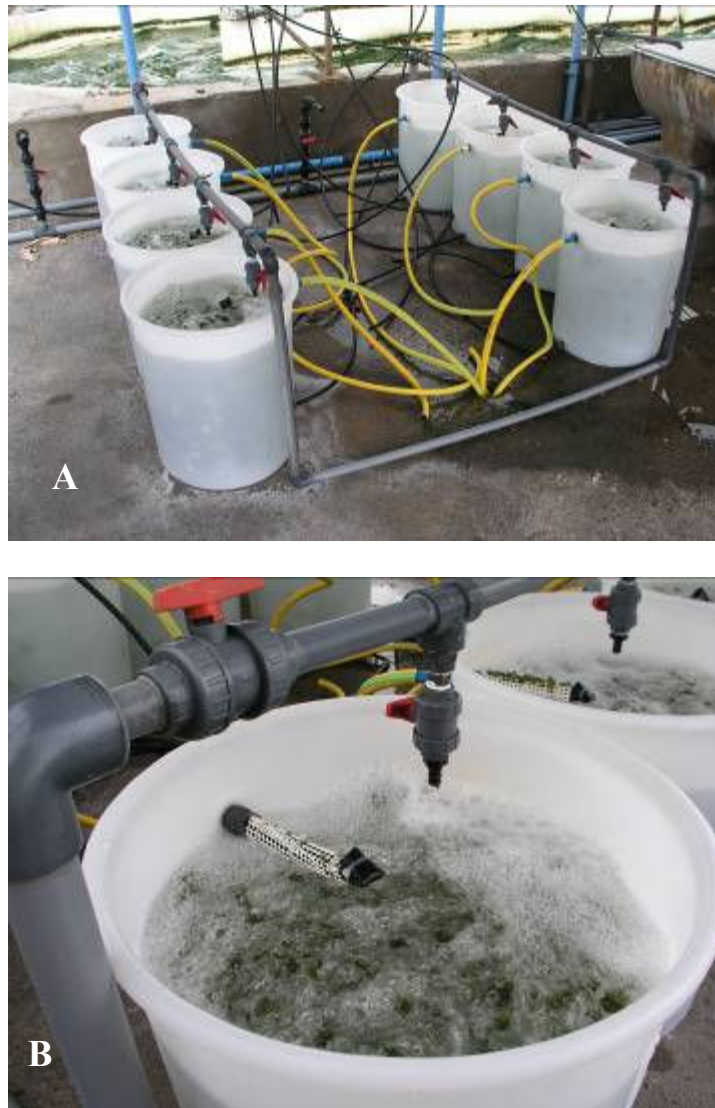


Figura 5.- Sistema de cultivo empleado para los experimentos a escala de planta piloto bajo condiciones de invernadero: (A) Vista general y (B) detalle de aporte de agua y aireación en un tanque.

Los experimentos fueron llevados a cabo bajo circuito de agua semi-cerrado. Todos los días, por la mañana a las 10 h se cerraba el circuito para dar los pulsos de nutrientes según el protocolo experimental (Tabla 2). Se dejaba el circuito cerrado hasta las 17 h de la tarde para que las algas pudieran absorber los nutrientes. El circuito de agua se abría por las noches, para renovar el agua de los tanques y que las algas no estuvieran limitadas en otros nutrientes aparte del P y N y también para desechar los productos de

su metabolismo. El caudal de agua era ajustado a 2 renovaciones del volumen del tanque hasta el nuevo cierre del circuito.

Los días que se recogían las muestras para hacer los análisis de cinética (ver apartado 4 de esta sección) se dejaba el circuito cerrado hasta las 22 h. Se recogían las muestras para los análisis de cinética el día posterior a la renovación del medio y cosecha para que no hubiera interferencias del contenido residual de P en el agua sobre los datos de cinética.

El aire se suministraba a través de un tubo de aireación, circular y radial, situado en el fondo del tanque (Fig. 6), para permitir una distribución mas homogénea del aire. El burbujeo de aire era tal que pudiese permitir un buen movimiento de la biomasa sin que las algas fueran sometidas a estrés físico.

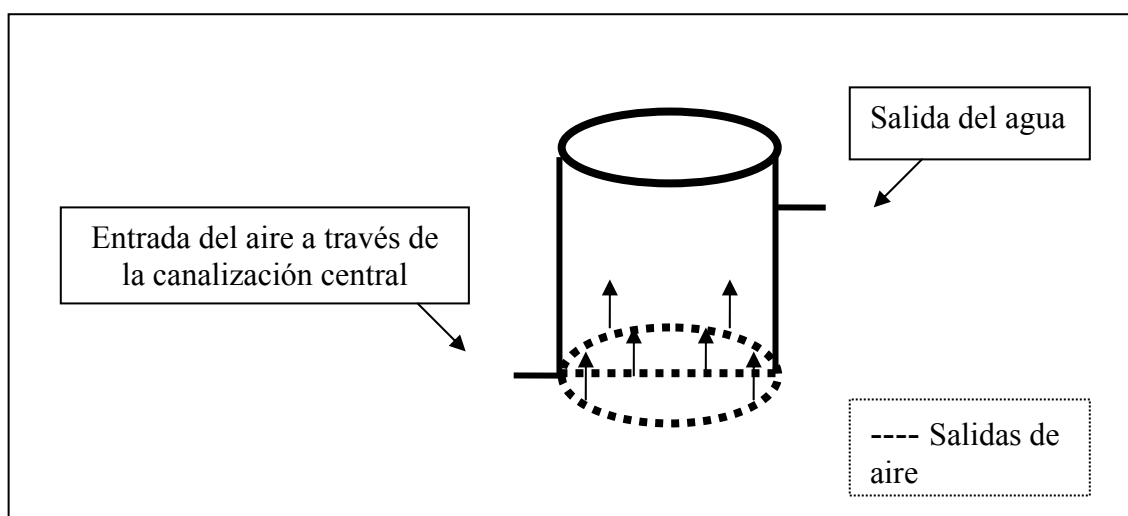


Figura 6.- Diseño del sistema de aireación en interior de los tanques de cultivo.

Se aportaban los nutrientes N y P en pulsos según el protocolo experimental (Tabla 2).

El nitrógeno se dispensaba en forma de cloruro de amonio NH_4Cl y el fósforo se administraba en forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3-4-Densidad de cultivo

➤ *Gracilaria cornea*

Para el cultivo de *G. cornea* en tanques en invernadero la densidad de cultivo, en peso fresco, fue de 4 kg.m^{-2} ($\approx 9 \text{ g.l}^{-1}$).

➤ *Ulva rigida*

Para los ensayos con *U. rigida* se uso una densidad de cultivo, en peso fresco, de $0,9 \text{ kg.m}^{-2}$ ($\approx 2 \text{ g.l}^{-1}$).

2-5- Mantenimiento del cultivo

Para mantener la densidad de cultivo inicial, las algas se cosechaban semanalmente pesándolas después de escurrirlas, y se ajustaba la densidad a la inicial. Se limpiaban las algas de los epifitos antes de volver a ponerlas en los tanques limpios. El excedente de biomasa era aclarado con agua destilada y con unas pinzas se quitaban cuidadosamente los restos de epifitos que pudiesen haber quedado pegados a las algas y se conservaba a -20°C para su posterior análisis.

4-Estudio de la cinética de absorción y de la asimilación del fósforo por las algas.

4-1- Análisis del fósforo en agua.

Para realizar el estudio de la cinética de absorción del fósforo por las algas, se midió la desaparición de éste del medio de cultivo. Para el análisis de fósforo en agua, se determinaba la concentración de ortofosfatos o fosfato reactivo porque es la forma química que incorporan las plantas (García Rodríguez, 1999).

El método usado para la determinación de los fosfatos era una adaptación del método descrito por Murphy y Riley (1962). El ortofosfato reacciona con el molibdato, en medio ácido, para producir un complejo fosfomolibdico. El ácido ascórbico reduce

dicho complejo, dando una coloración azul (Otero Ferrer, 2001) que se mide con espectrofotometro a 885 nm.

A cada 10 ml de muestra se añadían 500 µl de Reactivo Molibdato (solución comercial) y 500 µl de Acido ascórbico al 4%. Los estándares eran preparados con KH_2PO_4 .

➤ *Experimentos en cámara de cultivo*

Para los experimentos en cámara de cultivo, se hizo un seguimiento de la absorción del fósforo a lo largo de cada semana. Cada día se cogían muestras del agua, entre la 10 y las 13 h. Las muestras se filtraban con papel de laboratorio y se analizaban el mismo día. Para la toma de muestras se usaban botes de plástico lavados con lejía y aclarados con agua destilada.

➤ *Experimentos en invernadero*

Para los experimentos en invernadero, el seguimiento de la absorción de los fosfatos se hacia en un periodo de 10 h. Después de haber dado el pulso de fósforo, y estando el circuito cerrado, se iban cogiendo muestras de agua justo después del pulso, a los 30 min, 1, 2, 4, 6 y 10 h. Las muestras eran filtradas de la misma manera y eran analizadas el mismo día.

Para la cuantificación de fósforo en agua, se analizaron por cada tratamiento 4 muestras, debido a la sensibilidad del método.

4-2- Medidas de eliminación y biofiltración del fósforo.

Para poder comparar la eficiencia de biofiltración de fósforo de las dos especies de algas estudiadas, se realizo un estudio detallado de la cinética de biofiltración de los nutrientes. Para ello se calculo el siguiente parámetro:

♦ Eficiencia de biofiltración (B)

La eficiencia de biofiltración B (%) fue calculada según la formula:

$$B = (C_i - C_f / C_i) * 100$$

Siendo:

- Cf: La concentración final del PO_4^- en el agua;
- Ci: La concentración inicial del PO_4^- en el agua.

Las tasas de biofiltración fueron calculadas para cada uno de los diferentes tratamientos con una frecuencia semanal y los datos presentados en los resultados corresponden a las medias de dichas tasas obtenidas para cada una de las series de tratamientos.

4-3- Determinación del fósforo en tejido

El contenido tisular en fósforo, fue determinado por el método de Murphy y Riley (1962) después de una digestión alcalina de las muestras (Björnsäter y Wheeler, 1990; Hafting, 1999). Para cada 10 mg de muestras seca y homogeneizada, se añadían 5 ml de agua destilada y 30 ml de reactivo oxidante (3,0 g de NaOH y 6,7 g de persulfato sodico enrasados a 1 l de agua destilada) y se autoclavaban a 100°C durante 1 h. Una vez que las muestras habían enfriado, se añadía a cada tubo⁷ 3 ml de HCl 3M, para acidificar el medio, seguidos de 4 ml buffer bórico (30,9 g de ácido bórico y 100 ml de NaOH 1M, enrasados a 1l de agua destilada). Finalmente se llevaba el volumen de cada tubo a 51 ml (añadiendo 8 ml de agua destilada). Esta digestión permite la conversión de todo el P contenido en el tejido en PO_4^- que puede ser medido según el método de Murphy y Riley (1962).

⁷ Tubo conteniendo muestra y reactivo oxidante.

Antes de analizar las muestras digeridas, se filtraban a través de papel de filtro. Para cada 10 ml de muestra, se añadía 1 ml de reactivo de Molibdato. Para la preparación de este reactivo se mezclaban 12 ml de solución de molibdato de amonio (15 g en 500 ml de agua destilada), 13 ml de ácido sulfúrico (140 ml de sulfúrico puro en 900 ml de agua destilada), 10 ml de ácido ascórbico (27 g en 500 ml de agua destilada) y 5 ml de tartrato-antimonio potásico (0,34 g en 250 ml de agua destilada).

Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado para cada tratamiento. Los contenidos de fósforo en tejido fueron determinados para cada una de las muestras de algas recogidas cada semana. Los resultados presentados corresponden a las medias de los valores obtenidos para cada una de las series de tratamientos.

5- Tasa de crecimiento específica.

Para evaluar el efecto del aporte de P y de la relación P:N sobre el crecimiento de las algas se calculó la tasa de crecimiento específica. Este parámetro fue calculado con una frecuencia semanal para cada tanque y cada fotobioreactor según la fórmula siguiente:

♦ Tasa de crecimiento específica TC (%. d⁻¹):

La fórmula para calcular la tasa de crecimiento específica fue la descrita por D'Elia y DeBoer, 1978 :

$$TC = 100 * \ln [(Pt/Po)]/t$$

Siendo:

- Pt: Peso final;
- Po: Peso inicial;
- t: Tiempo transcurrido.

Los valores de producción y tasas de crecimiento específicas presentados como resultados corresponden a la media semanal de cada par de replicas de cada tratamiento.

6- Análisis bioquímicos de las algas

Después de haber limpiado las algas de epifitos y haberlas conservado a -20°C, se les realizó un análisis bioquímico para apreciar los cambios en la calidad de la biomasa en función de los tratamientos a los cuales fueron sometidas. Los análisis bioquímicos fueron realizados para las muestras recogidas al final de cada serie de experimentos.

6-1-Análisis de carbohidratos

La cuantificación de los carbohidratos totales se hizo según el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) usando como estándar glucosa.

Se hace una digestión previa de las muestras secas y molidas, con ácido tricloroacético TCA al 15% (15 a 30 mg de muestra homogénea + 5 ml de TCA y se pone en un baño termostático a 90°C durante 90 min). Y para cada 0,5 ml de sobrenadante se añaden 1 ml de fenol 5% y 5 ml de ácido sulfúrico puro. Se calientan las muestras durante 5 min a 100°C, se dejan enfriar en oscuridad y se lee la absorbancia a 480 nm. Las unidades de glucosa que resultan de la digestión de azúcares (oligosacáridos y derivados de azúcares) forman un complejo anaranjado al reaccionar con fenol y ácido sulfúrico.

La cuantificación de los carbohidratos totales se hizo por duplicado para cada una de las dos replicas de cada tratamiento diferente, analizándose así las muestras recogidas al final de las dos semanas de duración de cada serie de tratamientos (Tablas 1 y 2).

6-2-Contenido en C y N

El contenido de carbono y nitrógeno total fue determinado con un analizador PERKIN-ELMER 2400 CHN. Las muestras, de 2 a 4 mg de peso seco, se queman en el interior del analizador en atmósfera de oxígeno puro, de forma que los gases resultantes de la combustión se miden automáticamente. El analizador da los resultados como porcentaje

de carbono, hidrogeno y nitrógeno en referencia al peso seco de la muestra. El estándar usado es acetanilida (García Rodríguez, 1999).

La cuantificación del contenido total en C y N se hizo para cada una de las dos replicas de cada tratamiento diferente, analizándose así las muestras recogidas al final de las dos semanas de duración de cada serie de tratamientos (Tablas 1 y 2).

6-3-Proteínas

El contenido de proteínas totales fue deducido a partir del contenido de nitrógeno de las muestras (N x 6,25).

La cuantificación del contenido total en proteínas se realizó para cada uno de las replicas de tratamiento, analizándose así las muestras recogidas al final de las dos semanas de duración de cada serie de tratamientos (Tablas 1 y 2).

6-4-Pigmentos fotosintéticos

♦ Ficobiliproteínas

Para *Gracilaria cornea* la extracción de R-ficoeritrina, pigmento hidrosoluble, se realizó en tampón fosfato. Para 1 mg de muestra de tejido fresco se usaron 10 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5 Después de homogenizar el tejido con una trituradora y bajo luz tenue, se dejaron las muestras a 4°C durante 24h para que se haga la extracción. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron las muestras, se midió la absorbancia del sobrenadante bajo las siguientes longitudes de onda: 750, 645, 618, 592, 564 y 455 nm.

Las concentraciones fueron calculadas según Beer y Eshel (1985):

$$\text{r-ficoeritrina (mg/g de peso seco)} = \frac{[(A_{564}-A_{592}) - (A_{455}- A_{592}) \cdot 0,2] \cdot 0,12 \cdot \text{Vol}}{\text{Peso seco}}$$

Siendo:

- A: la absorbancia leída a la longitud de onda correspondiente;
- V: el volumen final del extracto (4 ml).

El valor de las absorbancia a 750 nm, de cada muestra, debe sustraerse del resto de las absorbancias de la misma muestra para corregir cualquier posible turbidez del extracto y que pudiera interferir en el cálculo de las concentraciones.

La cuantificación del contenido en pigmentos fotosintéticos se realizó por duplicado para cada replica y tratamiento, analizándose así las muestras recogidas al final de las dos semanas de duración de cada serie de tratamientos (Tablas 1 y 2).

7- Análisis estadístico de los datos

♦ Experimento a escala de laboratorio

Para los experimentos factoriales llevados a cabo en la cámara de cultivo, para poder evaluar tanto los efectos del P y el N como su efecto combinado sobre los diferentes parámetros estudiados⁸, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza de dos factores (ANOVA de 2 factores) y un test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas (Nishihara et al., 2005), siendo las diferencias entre medias comparadas con el test de Tukey con un intervalo de confianza de 95% ($P < 0,05$) (Chopin y Wagey, 1999).

♦ Experimento a escala de planta piloto

Para los experimentos a escala de planta piloto, ya que se uso un solo nivel de aporte de N, para la evaluación del impacto del P sobre los parámetros estudiados, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA de 1 factor)

⁸ Contenidos de P y N, carbohidratos solubles y proteínas en tejido y tasas de crecimiento.

siendo las diferencias entre medias comparadas con el test de Tukey con un intervalo de confianza de 95% ($P < 0,05$).

En todos los casos, cuando los datos tenían las varianzas no homogéneas, se transformaron antes de su análisis.

Todos los análisis estadístico fueron desarrollado con el programa estadístico SPSS (v 13. 0).

Resultados

I- Biofiltración y asimilación de fósforo

1- Biofiltración y eliminación de fosfatos

1-1- Experimentos en cámara de cultivo

♦ *Gracilaria cornea*

La figura 7 muestra como *Gracilaria cornea* es capaz de biofiltrar de una manera constante los fosfatos del agua bajo las diferentes concentraciones de nutrientes (amonio y fosfatos) ensayadas.

Tabla 3.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por Gracilaria cornea, bajo las condiciones de la cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte de amonio.

<i>Frecuencia semanal de aporte de NH₄⁺</i>	<i>Concentración de los pulsos de PO₄³⁻</i>				<i>Media \pm DS</i>
	<i>10 μM</i>	<i>40 μM</i>	<i>70 μM</i>	<i>100 μM</i>	
<i>3 (semanas 1 y 2)</i>	100 \pm 0	90,1 \pm 1,4	63,0 \pm 4,1	34,7 \pm 3,4	<i>72,0^a \pm 29,3</i>
<i>7 (semanas 3 y 4)</i>	100 \pm 0	97,9 \pm 2,9	81,2 \pm 10,7	52,6 \pm 0,8	<i>83,0^a \pm 21,9</i>
<i>0 (semanas 5 y 6)</i>	99,1 \pm 0,1	97,2 \pm 2,9	84,3 \pm 7,7	42,6 \pm 6,8	<i>80,8^a \pm 26,3</i>
<i>Media \pm DS</i>	<i>99,7^{aa} \pm 0,5</i>	<i>95,1^{ab} \pm 4,4</i>	<i>76,2^{ab} \pm 11,5</i>	<i>43,3^{ac} \pm 8,9</i>	

Los resultados expresados corresponden a los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n= 8). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias (p<0,05).

Los datos de la tabla 3, muestran que la concentración del aporte inicial de fosfatos tiene un efecto significativo ($p=0,002$) sobre la eficiencia de biofiltración del alga, siendo las tasas de biofiltración de fosfatos registradas a las concentraciones de 10 y 100 μM significativamente diferentes de las registradas a 40 y 70 μM ; dándose una variación de la eficiencia de biofiltración inversa a la disponibilidad de fosfatos en el agua. De hecho, la tasa de biofiltración disminuye según aumenta la concentración de fosfatos en el medio desde los valores máximos ($99,7 \pm 0,5 \%$) a la concentración mínima de fosfatos (10 μM) hasta un valor mínimo ($43,3 \pm 8,9 \%$) a la concentración máxima de fosfatos (100 μM).

Por otro lado, no se observan diferencias significativas ($p= 0,128$) en la eficiencia de biofiltración de fosfatos de *Gracilaria cornea* en función de la frecuencia de aporte del amonio.

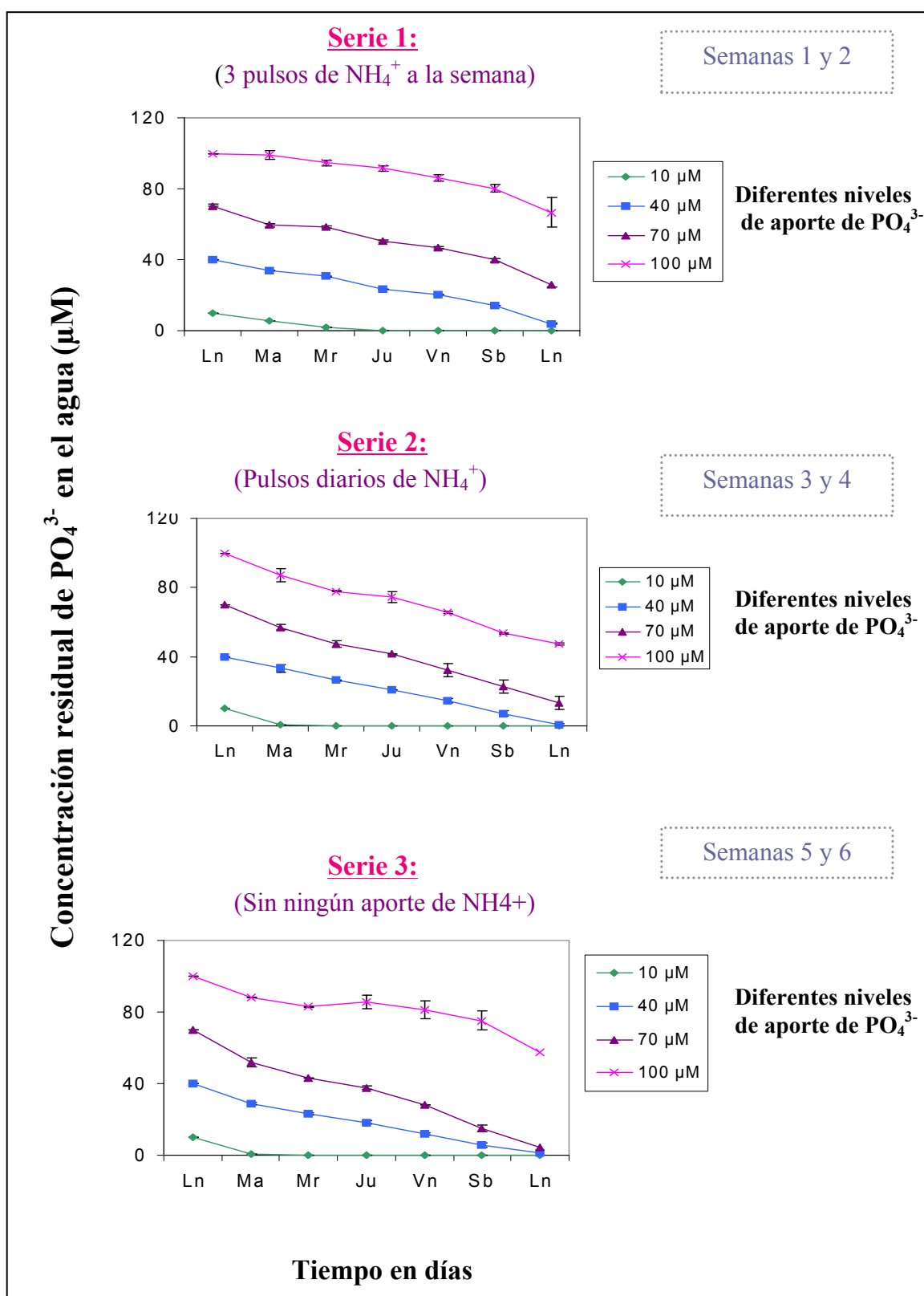


Figura 7.- Cinética de biofiltración de fosfatos por *Gracilaria cornea*, en las condiciones de la cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio: series 1, 2 y 3.

Las graficas representan los valores medios obtenido a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas para cada serie, $n=8$.

♦ *Ulva rigida*

La duración del experimento de *Ulva rigida* en cámara de cultivo se redujo de 6 semanas a solo 4 semanas, de tal manera que las series 1 y 3 duraron 1 semana cada una y la serie 2 duró 2 semanas. La duración de la primera serie se redujo debido a problemas logísticos mientras que para la serie 3 el deterioro del cultivo (ver apartado II de Resultados) -las algas se fueron desintegrando- hizo que diésemos por finalizado el experimento al finalizar la primera semana.

La figura 8 muestra que *Ulva rigida* es capaz de biofiltrar los fosfatos a diferentes concentraciones de estos en el medio y bajo los diferentes niveles de aporte de fosfatos y amonio. Sin embargo, se puede observar que para *Ulva rigida* las gráficas de la evolución de las concentraciones de los fosfatos en el agua presenta una recta más lineal que la registrada para *Gracilaria cornea*.

Por otra parte y en estas mismas gráficas se observa que a altas concentraciones de fosfatos en el agua (70 y 100 μM) los valores de biofiltración de los fosfatos no son constantes ya que se observaron fluctuaciones de la concentración de fosfatos en el medio.

Tabla 4.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de los fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte de amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}				
	10 μM	40 μM	70 μM	100 μM	Media \pm DS
3 (semana 1)	88,8 \pm 1,3	65,9 \pm 2,6	40,5 \pm 4,4	32,1 \pm 7,0	56,8 ^a \pm 25,7
7 (semanas 3y 4)	98,4 \pm 0,6	37,2 \pm 7,1	16,9 \pm 0,6	33,4 \pm 16,4	46,5 ^b \pm 35,7
0 (semana 5) ⁹	93,9 \pm 0,2	18,4 \pm 0,1	5,7 \pm 5,9	37,1 \pm 10,4	38,8 ^b \pm 38,9
Media \pm DS	93,7 ^{aa} \pm 4,8	40,5 ^{ab} \pm 23,9	21,0 ^{ac} \pm 17,8	34,2 ^{ac} \pm 2,6	

Los resultados expresados corresponden a los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n= 8). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Los datos de la tabla 4, muestran que la eficiencia de biofiltración de los fosfatos por *Ulva rigida* varía significativamente ($p=0,000$) en función del nivel de concentración de estos en el agua, siendo la tasa de biofiltración (B) registrada a una concentración de 10 μM (93,7 \pm 4,8 %) significativamente superior, y la registrada a 70 μM significativamente menor (21,0 \pm 17,8 %) comparadas a las registradas a 40 μM (40,5 \pm 23,9 %) y a 100 μM (34,2 \pm 2,6 %).

Por otra parte, la eficiencia de biofiltración de los fosfatos varió significativamente ($p=0,004$) en función de la frecuencia de los pulsos de aporte semanal de amonio; siendo la tasa de biofiltración significativamente mas alta para el régimen de aporte de amonio de 3 pulsos semanales (56,8 \pm 25,7 %) que las otras registradas para 7 pulsos semanales (46,5 \pm 35,7 %) y para 0 pulsos semanales (38,8 \pm 38,9 %).

⁹ Los valores de B fueron calculados sobre un periodo de 5 días por falta de datos de la última semana del experimento.

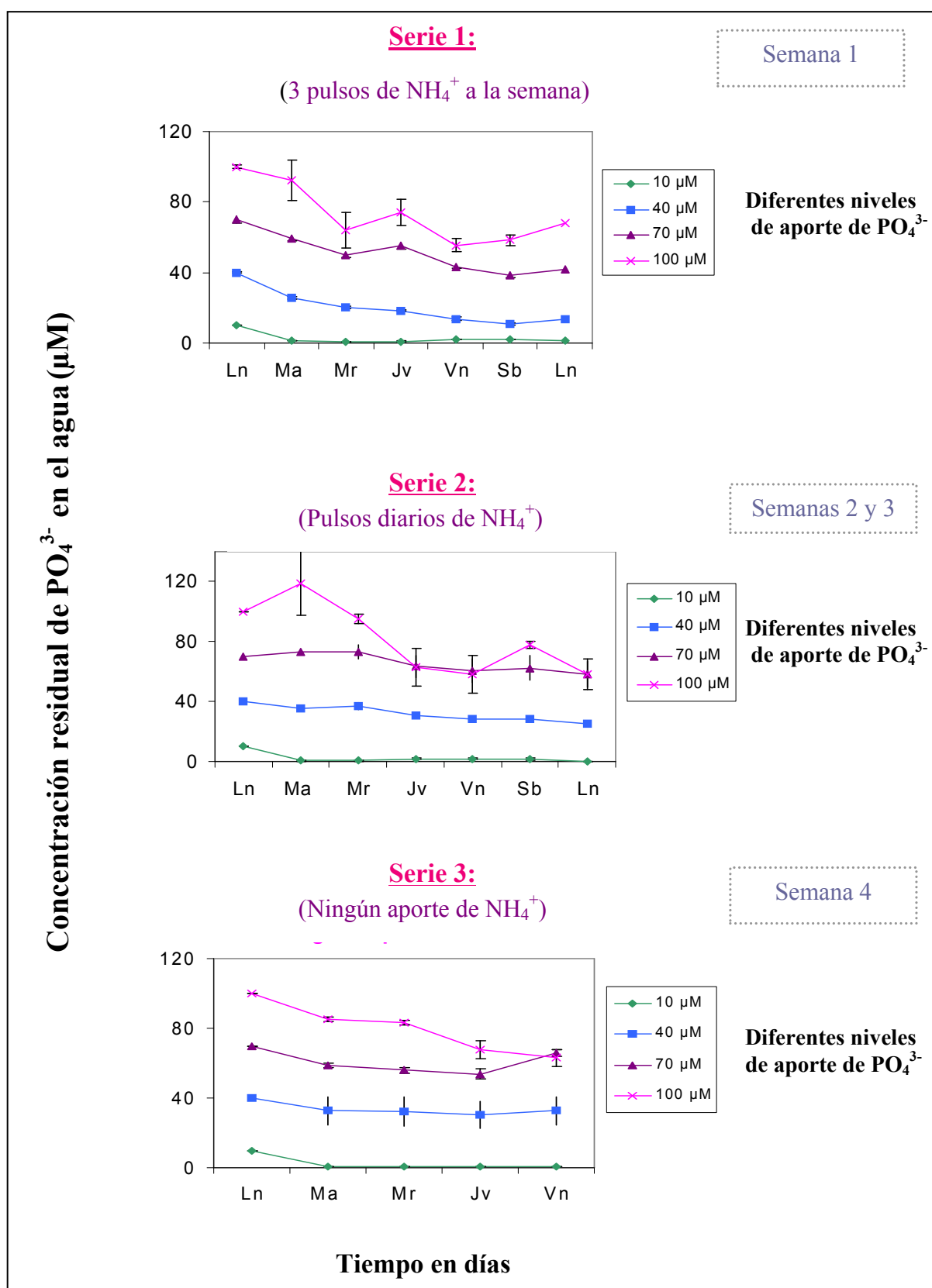


Figura 8.- Cinética de biofiltración de fosfatos por *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio: series 1, 2 y 3.

Las graficas representan los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n= 8 para la serie 2 y n=4 para las series 1 y 3).

1-2- Experimentos a escala de planta piloto

♦ *Gracilaria cornea*

La figura 9 muestra que *Gracilaria cornea* mantenida bajo condiciones de invernadero es capaz de biofiltrar los fosfatos, en un periodo de 10 horas después de haber dado el pulso, a varias concentraciones en el agua (10, 40 y 70 μM) dependiendo de la concentración de fosfatos en el agua.

Tabla 5.- Variación de la eficiencia de biofiltración¹⁰ (B en % \pm DS) de fosfatos por *Gracilaria cornea*, mantenida en condiciones de invernadero, en función de la concentración de los pulsos de fosfatos.

	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}		
	10 μM	40 μM	70 μM
Tasa de biofiltración (%)	94,0 ^a \pm 3,5	16,2 ^b \pm 3,6	18,1 ^b \pm 4,6

Los resultados representados corresponden a los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n=8). Valores con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Los datos de la tabla 5 muestran que existen diferencias significativas ($p=0,000$) entre la tasa de biofiltración de fosfatos según la concentración de estos en el agua; siendo esta significativamente superior ($94,0 \pm 3,5$ %) cuando la concentración de fosfatos en el agua es de 10 μM a las tasas de biofiltración observadas a las concentraciones de 40 μM ($16,2 \pm 3,6$ %) y 70 μM ($18,1 \pm 4,6$ %).

¹⁰ Las tasas de biofiltración fueron calculadas para una duración de 10 h después de dar el pulso de fosfatos.

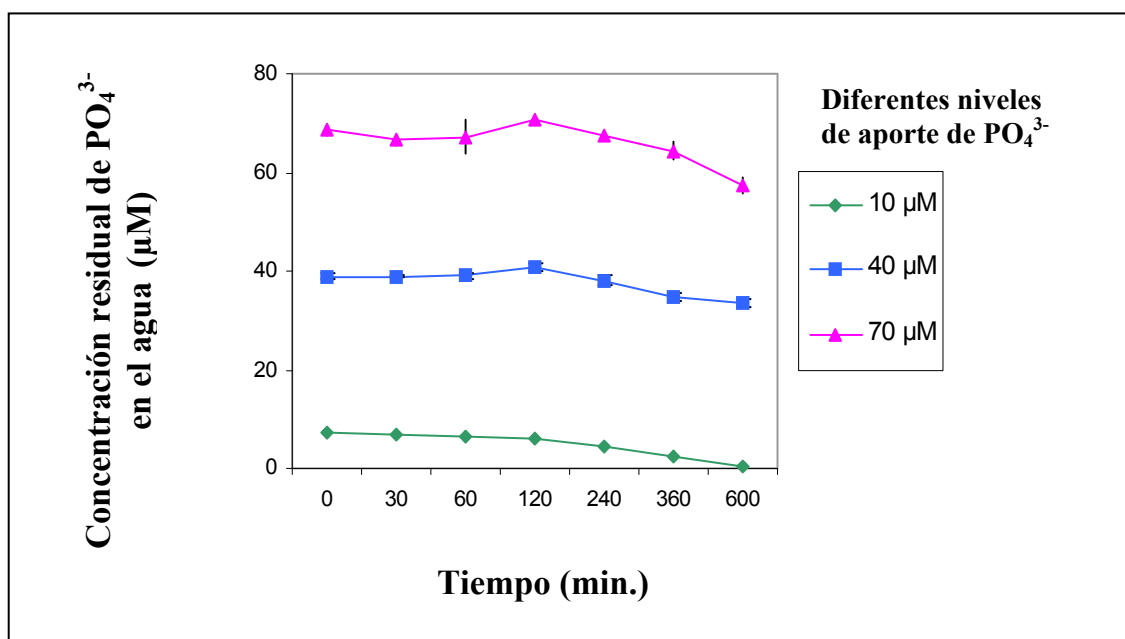


Figura 9.- Cinética de biofiltración de fosfatos por *Gracilaria cornea*, mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes concentraciones de los pulsos fosfatos.

La grafica representa los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n=8).

♦ *Ulva rigida*

La figura 10 muestra que, para un periodo de 10 h después de haber dado un pulso de fosfatos, *Ulva rigida* no es capaz de biofiltrar los fosfatos del agua de manera muy eficiente. De hecho se observa como las curvas de la cinética de biofiltración de los fosfatos tienen un perfil lineal contrariamente a lo que se observa para las curvas de biofiltración para *G. cornea*.

Tabla 6.- Variación de la eficiencia de biofiltración (B en % \pm DS) de fosfatos por *Ulva rigida*, mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes concentraciones de los pulsos fosfatos.

	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}		
	10 μM	40 μM	70 μM
Tasa de biofiltración (%)	37,6 ^a \pm 5,5	2,9 ^b \pm 8,3	5,5 ^b \pm 4,4

Los resultados representados corresponden a los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n=8). Valores con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Los datos de la tabla 6 muestran que la tasa de biofiltración ($37,6 \pm 5,5$ %) a una concentración de fosfatos en el agua de 10 μM , y después de un tiempo de 10 horas de haber dado el pulso de fosfatos es significativamente mayor ($p = 0,02$) a las tasas de biofiltración registradas a 40 μM ($2,8 \pm 8,3$ %) y 70 μM ($5,5 \pm 4,4$ %).

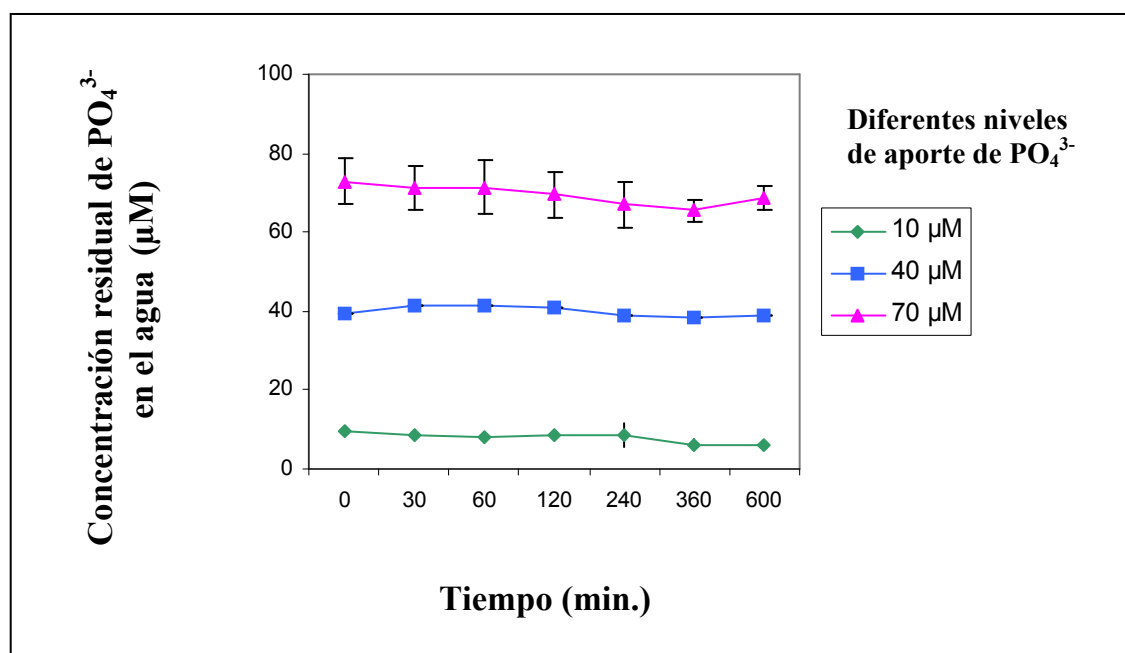


Figura 10.- Cinética de biofiltración de fosfatos por *Ulva rigida*, cultivada en invernadero, bajo diferentes combinaciones de aporte de fosfatos y amonio.

La grafica representa los valores medios obtenidos a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n=8).

2- Asimilación del fósforo en tejido

2-1- Experimentos bajo condiciones de cámara de cultivo

♦ *Gracilaria cornea*

Los datos presentados en la tabla 7, muestran que hay una diferencia significativa ($p=0,000$) en el contenido del alga en fósforo en función de la concentración de fosfatos aportada al agua. Los datos de la figura 11 y los de la tabla 7 muestran que los niveles de fósforo en tejido para las algas mantenidas a una concentración de fosfatos de 40, 70 y 100 μM (respectivamente $2,3 \pm 0,2$; $2,7 \pm 0,6$; $2,6 \pm 0,2$ mg de P/g PS) son significativamente más altos que los niveles registrados para el control, las algas mantenidas a una concentración de fosfatos de 10 μM ($1,1 \pm 0,4$; $1,8 \pm 0,1$ mg de P/g PS, respectivamente).

Por otro lado, los niveles de aporte del amonio (frecuencias de los pulsos) no afectan ($p=0,538$) la asimilación del fósforo por *Gracilaria cornea* (Tabla 7 y Fig. 11).

Tabla 7.- Variación del contenido de P en tejido (mg de P/g de PS \pm DS) para *Gracilaria cornea*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}					
	0 μM	10 μM	40 μM	70 μM	100 μM	Media
3 (Serie 1)	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$2,1 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$2,2^a \pm 0,4$
7 (Serie 2)	$1,2 \pm 0,1$	$1,8 \pm 1,2$	$2,5 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,2$	$2,6^a \pm 0,6$
0 (Serie 3)	$0,6 \pm 0,0$	$1,7 \pm 0,0$	$2,5 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,0$	$2,9^a \pm 1,1$
Media	$1,1^{aa} \pm 0,4$	$1,8^{aa} \pm 0,0$	$2,3^{ab} \pm 0,2$	$2,7^{ab} \pm 0,6$	$2,6^{ab} \pm 0,2$	
Contenido en fósforo de la muestra inicial (mg de P/g de PS \pm DS)						$2,2^{aa} \pm 0,2$

Los resultados expresados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=4$ y $n=2$ para la muestra inicial). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

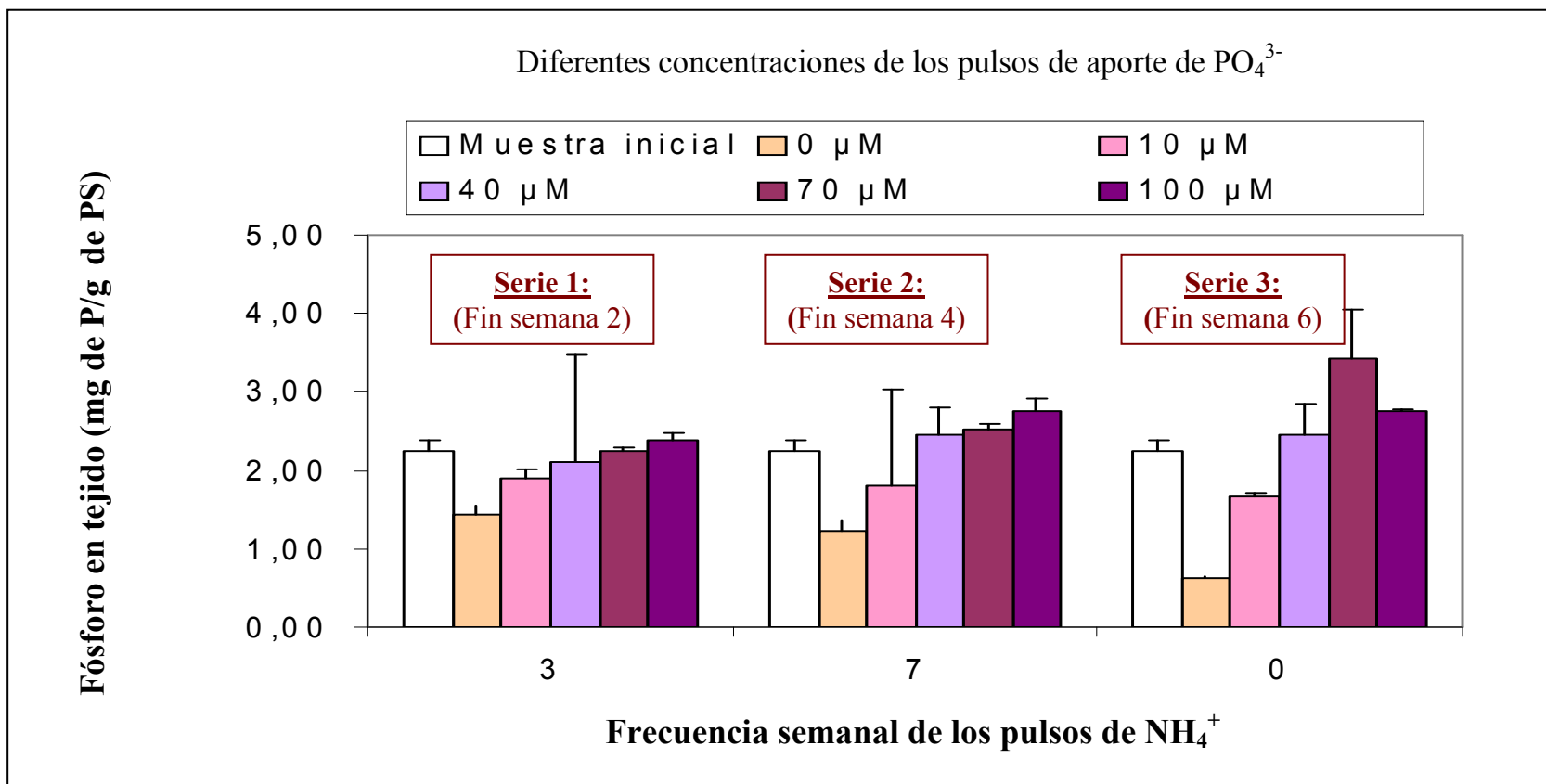


Figura 11.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo, en función de varias combinaciones de aportes de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 4 y para la muestra inicial n=2).

♦ *Ulva rigida*

Los datos representados en la figura 12, muestran que hay un efecto significativo ($p=0,026$) del nivel de aporte de fosfatos en el agua y la cantidad de fósforo contenido en el tejido de las algas. Asimismo el contenido de fósforo en tejido registrado a 10, 40 y 70 μM (respectivamente $1,0 \pm 0,3$; $1,2 \pm 0,3$ y $1,0 \pm 0,3$ mg de P/g PS) de concentración de fosfatos es significativamente inferior al registrado a 100 μM ($1,3 \pm 0,6$ mg de P/g PS) (Tabla. 8).

Por otra parte, la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio tiene un efecto significativo ($p=0,000$) sobre la cantidad de fósforo en tejido siendo los valores registrados bajo las diferentes frecuencias de pulsos de aporte de amonio de 0, 3 y 7 significativamente diferentes entre si (respectivamente $1,0 \pm 0,1$; $0,8 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,3$ mg de P/g PS).

Tabla 8.- Variación del contenido de P en tejido (mg de P/g de PS \pm DS) para *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

<i>Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+</i>	<i>Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}</i>					Media
	<i>0 μM</i>	<i>10 μM</i>	<i>40 μM</i>	<i>70 μM</i>	<i>100 μM</i>	
3 (Serie 1)	$0,7 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8^a \pm 0,1$
7 (Serie 2)	$1,4 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,26$	$1,2 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,3$	$1,5^b \pm 0,3$
0 (Serie 3)	$0,9 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,2$	$1,0^c \pm 0,1$
Media	$1,0^{aa} \pm 0,4$	$1,0^{aa} \pm 0,3$	$1,2^{aa} \pm 0,3$	$1,0^{aa} \pm 0,3$	$1,3^{ab} \pm 0,6$	
<i>Contenido en fósforo de la muestra inicial</i> (mg de P/g de PS \pm DS)						$0,7 \pm 0,1$

Los resultados representados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=6$ para P y $n=10$ para N). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

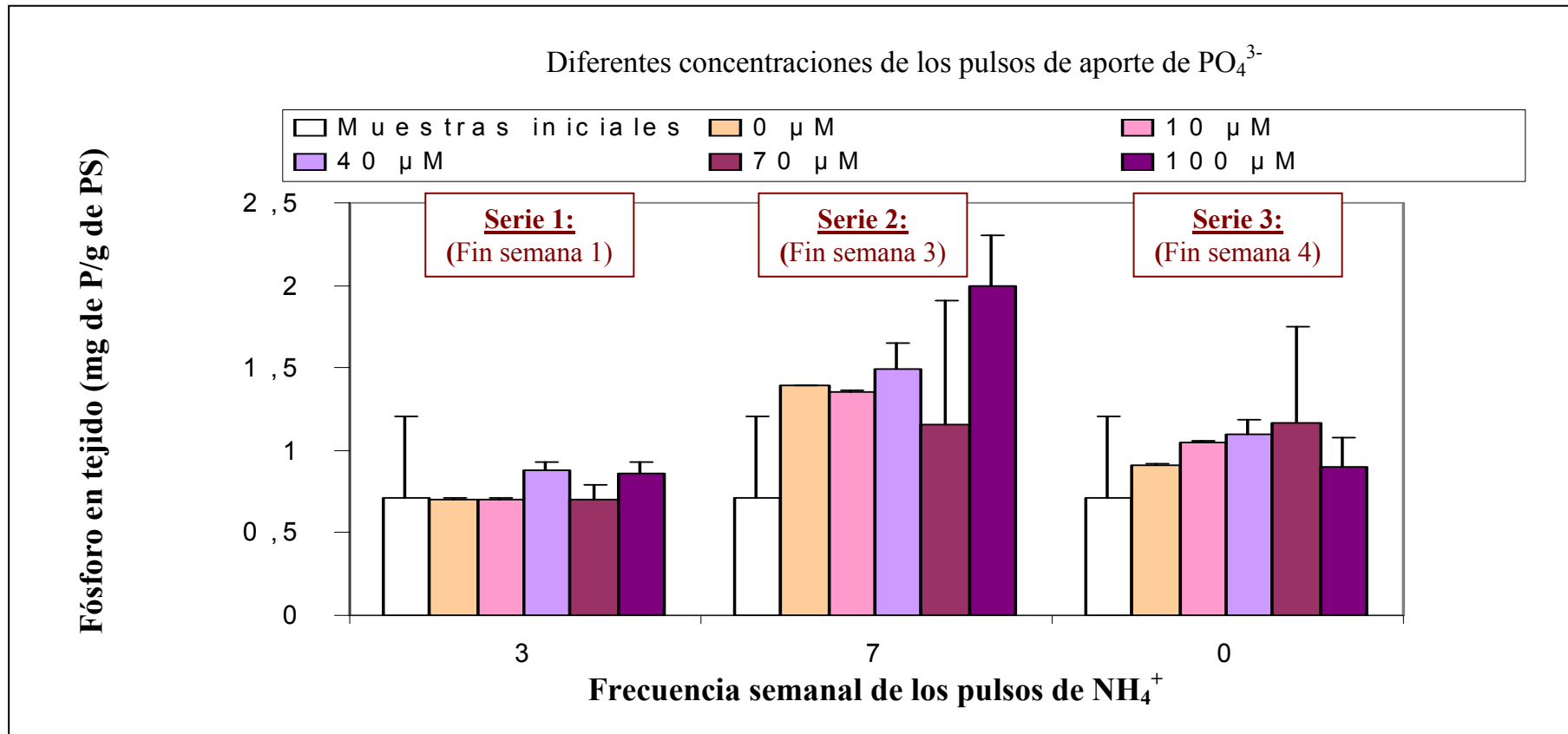


Figura 12.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para *Ulva rigida* mantenida en cámara de cultivo, en función de varias combinaciones de aportes de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 6 para P y n = 10 para N y para la muestra inicial n=2).

2-2- Experimentos en planta piloto

♦ *Gracilaria cornea*

Al analizar los datos del contenido de fósforo en tejido de *Gracilaria cornea* mantenida bajo condiciones de invernadero (Fig. 13), los resultados mostraron que existían diferencias significativas entre el contenido de fósforo en tejido en función de los diferentes niveles de aporte de fosfatos al medio ($p=0,000$). Siendo el valor registrado para $0 \mu\text{M}$ ($2,0 \pm 0,2 \text{ mg de P/g PS}$) inferior al valor registrado a $10 \mu\text{M}$ ($3,0 \pm 0,1 \text{ mg de P/g PS}$) y este ultimo inferior a los valores registrados a 40 y $70 \mu\text{M}$ (respectivamente $4,7 \pm 0,1$ y $5,1 \pm 0,2 \text{ mg de P/g PS}$).

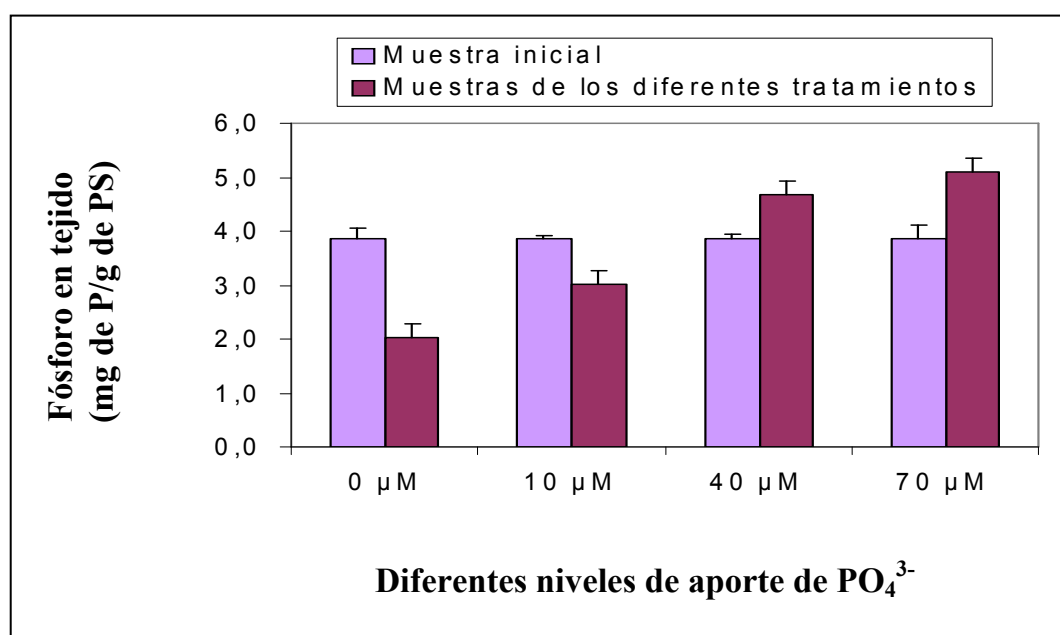


Figura 13.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero, en función del nivel de aporte de los fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n=2$).

♦ *Ulva rigida*

Al analizar los datos de contenido de fósforo en tejido para *Ulva rigida* mantenida bajo condiciones de invernadero (Fig. 14), los resultados no mostraron diferencias significativas en el contenido en P en función de los diferentes niveles de aporte de fosfatos ($p=0,51$).

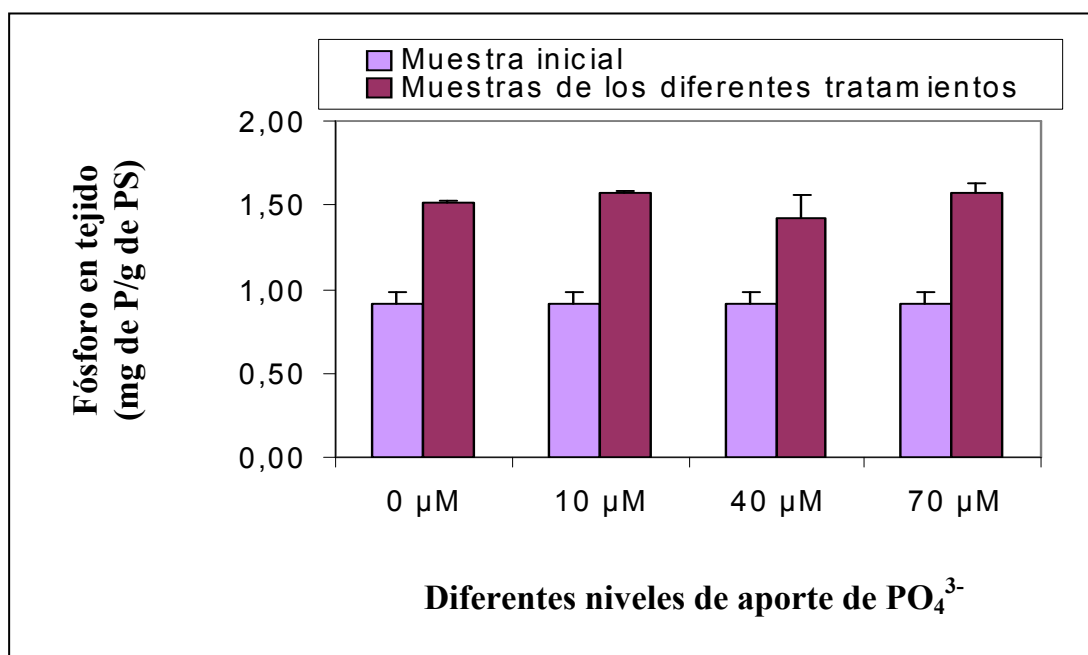


Figura 14.- Variación del contenido de fósforo en tejido, para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de invernadero, en función del nivel de aporte de los fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n=2$).

II- Tasas de crecimiento

1- Experimentos en cámara de cultivo.

♦ *Gracilaria cornea*

Los datos de crecimiento de *Gracilaria cornea* (Fig. 15) muestran un efecto significativo ($p=0,000$) de la frecuencia de aporte de amonio sobre las tasas de crecimiento. Registrándose el valor máximo a una frecuencia de aporte de 3 pulsos por semana ($2,4 \pm 0,1 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$), y el valor mínimo a una frecuencia de 0 pulsos por semana ($-0,5 \pm 1,2 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$), pasando por un valor medio a una frecuencia de 7 pulsos por semana ($1,7 \pm 0,4 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$) (Tabla 9).

Tabla 9.- Variación de la Tasa de Crecimiento Específica TC ($\text{\%} \cdot \text{d}^{-1} \pm \text{DS}$) para *Gracilaria cornea*, en condiciones de cámara de cultivo, en función de la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

	<i>Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+</i>		
	<i>3 (semanas 1 y 2)</i>	<i>7 (semanas 3 y 4)</i>	<i>0 (semanas 5 y 6)</i>
TC ($\text{\%} \cdot \text{d}^{-1}$)	$2,4^a \pm 0,1$	$1,7^b \pm 0,4$	$-0,5^c \pm 1,2$

Los resultados expresados corresponden al valor medio obtenido a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=6$ para P y $n=10$ para N). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

Por otra parte, se vio que el nivel de aporte de los fosfatos no tenía ningún efecto significativo sobre las tasas de crecimiento de las algas ($p=0,501$). Sin embargo, analizando los valores de crecimiento del alga en relación al contenido de fósforo en tejido (Fig. 16 y 17), se deduce que hay una correlación positiva ($r = 0,829$) entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido cuando esta concentración es inferior a $2,5 \text{ mg P/g PS}$. A contenidos superiores de fósforo la tasa de crecimiento disminuye (inferior a $0,6 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$). Por otro lado, en las fotos de la figura 18 se puede

observar un cambio morfológico en los talos sometidos a diferentes aportes de fósforo. Asimismo las muestras del alga mantenidas bajo altas concentraciones de P (40, 70 y 100 μM) presentan talos poco ramificados, más compactos, menos extendidos y con diferente coloración que las muestras mantenidas a bajas concentraciones de P (Control y 10 μM).

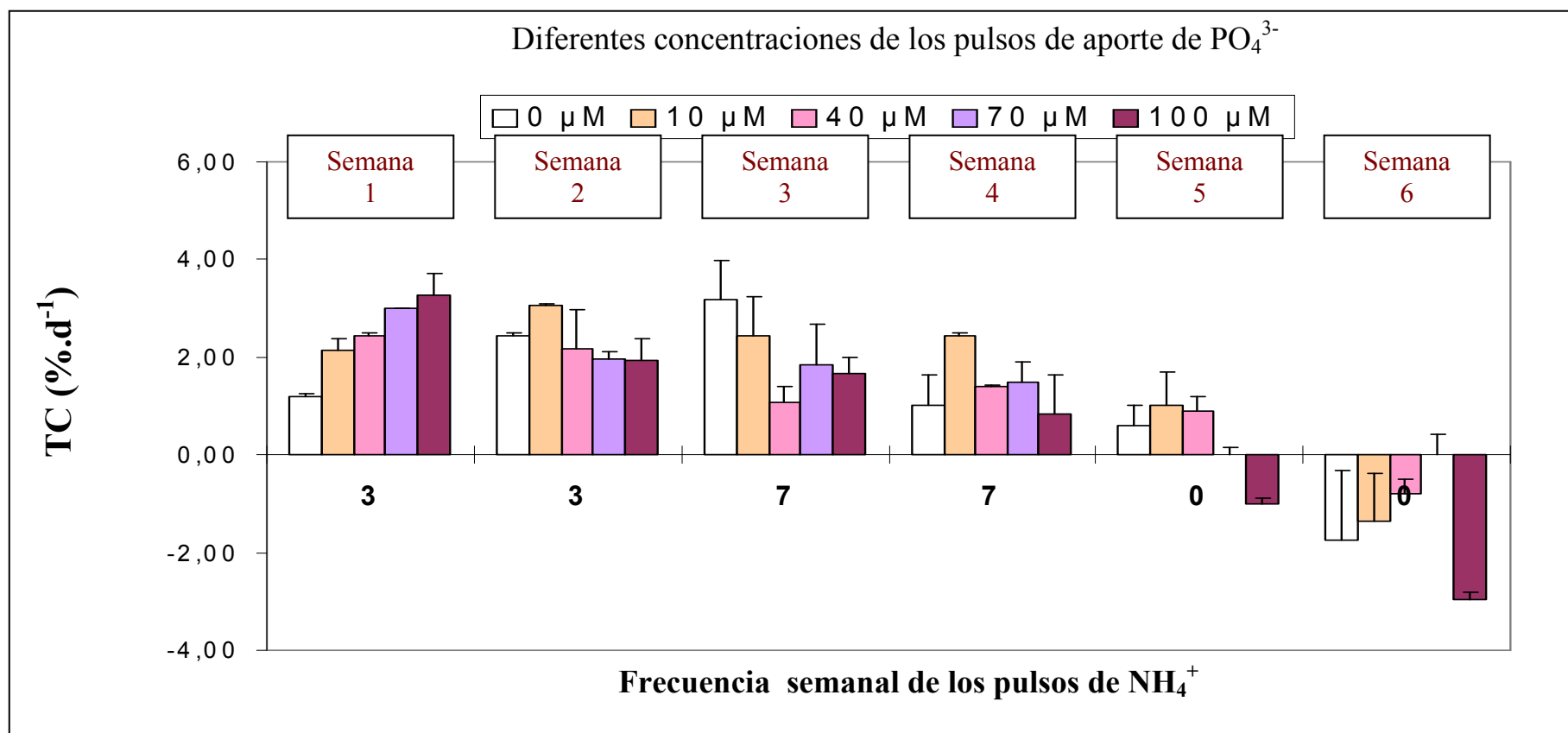
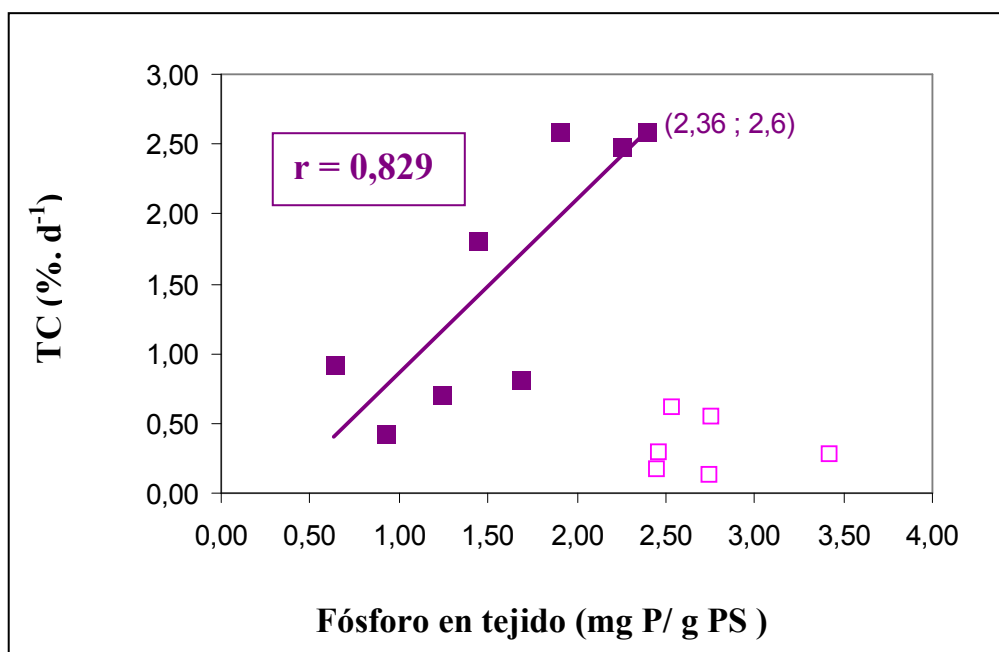


Figura 15.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n= 6 para P y n= 10 para N).



■: serie (1) de puntos correspondientes a las muestras cuyos contenidos en fósforo es inferior a 2,39 mg P/g PS.

□: serie (2) de puntos correspondientes a las muestras cuyos contenidos en fósforo es superior a 2,39 mg P/g PS.

Figura 16.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo.

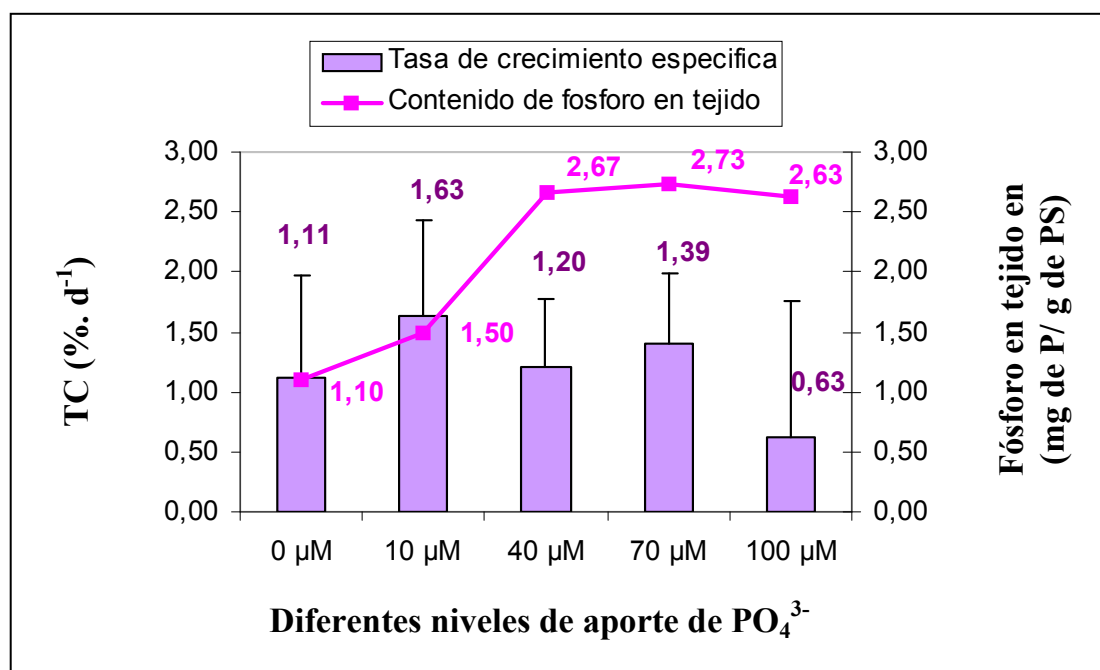
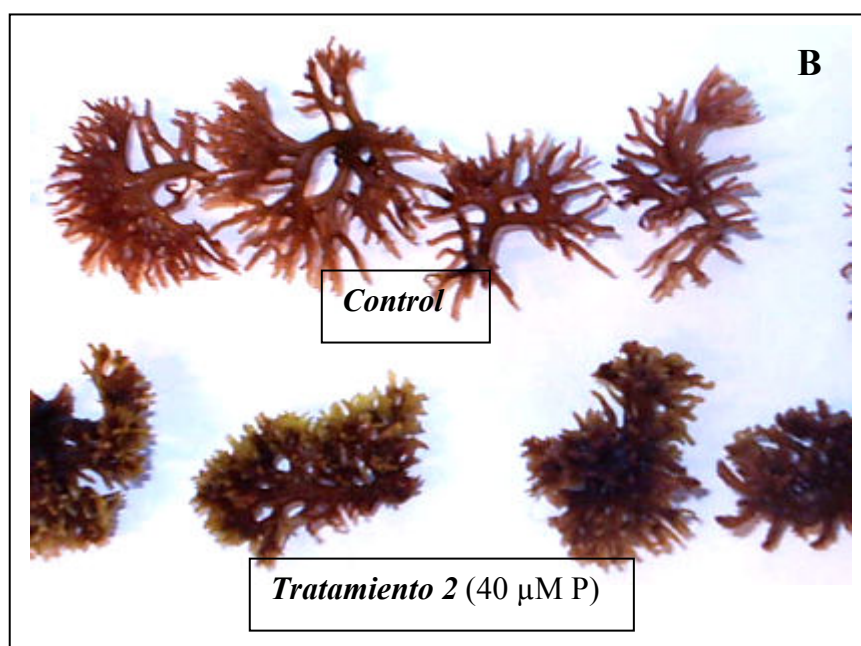
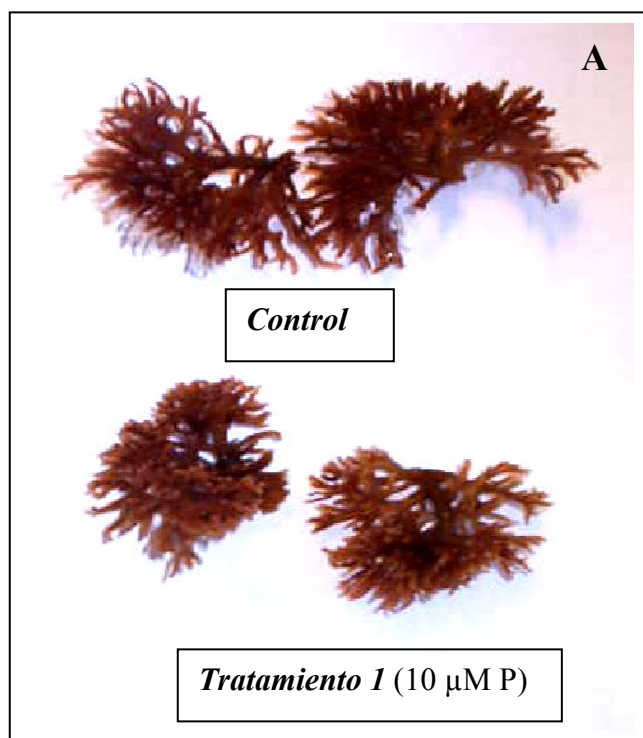


Figura 17.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de cámara de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del contenido de fósforo en tejido.



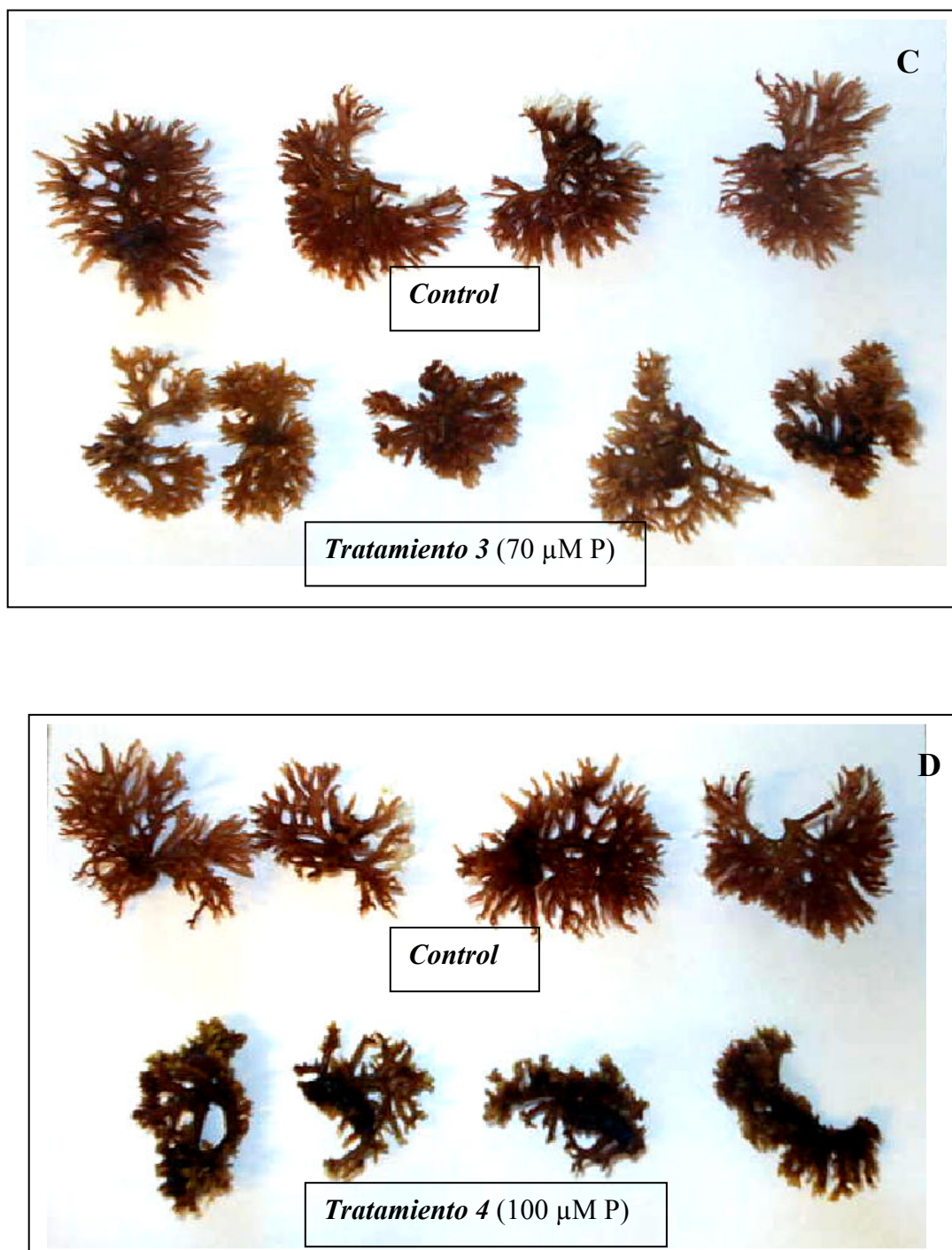


Figura 18.- Comparación de muestras, de *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo y bajo diferentes tratamientos: (A) Control versus Tratamiento 1, (B) Control versus Tratamiento 2, (C) Control versus Tratamiento 3 y (D) Control versus Tratamiento 4 (ver Tablas 1 y 2).

♦ *Ulva rigida*

Los datos de crecimiento de *Ulva rigida* en cámara de cultivo (Fig. 19) muestran un efecto significativo ($p=0,000$) de la frecuencia de aporte de amonio sobre las tasas de crecimiento del alga. Siendo los valores de crecimiento mas altos registrados para una frecuencia de aporte de 3 pulsos por semana ($3,5 \pm 1,3 \text{ \% d}^{-1}$), los mínimos registrados para una frecuencia de 0 pulsos ($-0,06 \pm 0,7 \text{ \% d}^{-1}$), pasando por una producción media a una frecuencia de aporte de amonio de 7 pulsos por semana ($2,8 \pm 1,2 \text{ \% d}^{-1}$) (Tabla. 10).

Tabla 10.- Variación de la Tasa de Crecimiento Especifica TC ($\text{\% d}^{-1} \pm DS$) para *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, en función de la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

	<i>Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+</i>		
	<i>3 (Serie 1)</i>	<i>7 (Serie 2)</i>	<i>0 (Serie 3)</i>
<i>TC (\% d^{-1})</i>	$3,5^a \pm 0$	$2,8^b \pm 0,1$	$-0,1^c \pm 0$

Los resultados expresados corresponden al valor medio obtenido a partir de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=4$ para P, $n=10$ / $n=5$ para N). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

Por otra parte, se observó un efecto significativo ($p=0,000$) del nivel de aporte de fósforo sobre el crecimiento del alga (Fig. 19). Asimismo, a una concentración de aporte de fosfatos de $70 \text{ }\mu\text{M}$ la tasa de crecimiento registrada fue mayor ($3,4 \pm 2,2 \text{ \% d}^{-1}$) que las registradas a 100 , 40 , 10 y $0 \text{ }\mu\text{M}$ (respectivamente $2,3 \pm 2,2$; $2,0 \pm 1,6$; $2,9 \pm 2,2$ y $0,7 \pm 1,1 \text{ \% d}^{-1}$).

Si se contrastan estos datos con los datos de contenido de fósforo en tejido (Fig. 20), bajo un aporte de $70 \text{ }\mu\text{M}$ la asimilación de fósforo fue menor, $1,0 \text{ mg de P/g PS}$, que para los otros niveles de aporte de fosfatos.

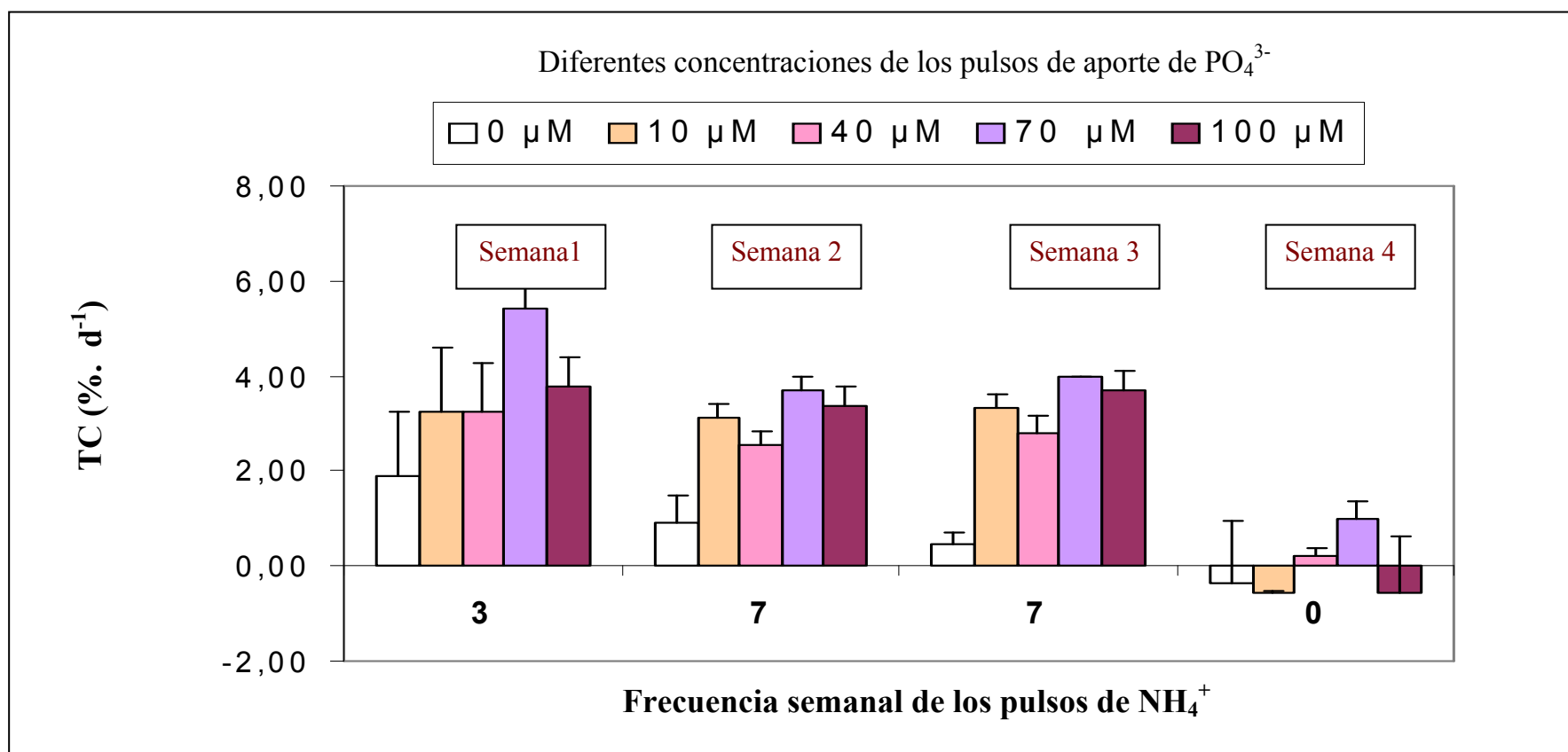


Figura 19.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Ulva rigida* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias semanales de los duplicados de cada replica de tratamiento (n= 8 para P y n= 10 para N).

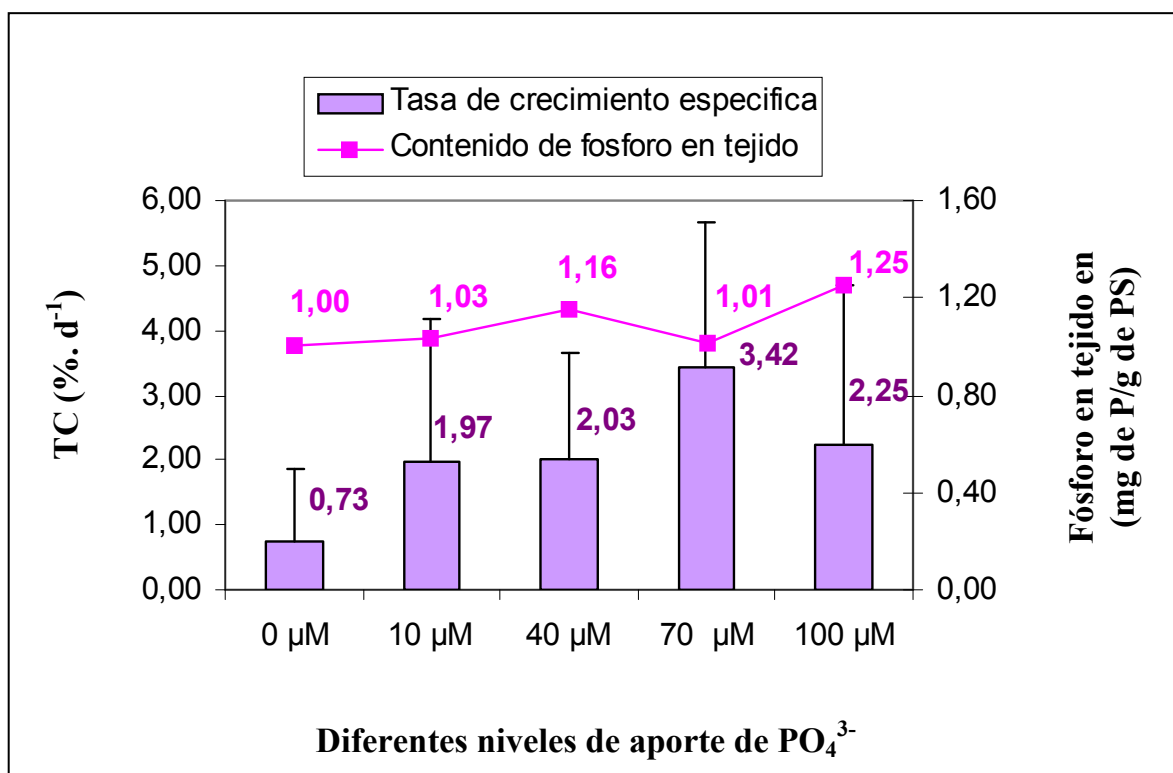


Figura 20.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de cámara de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.

2- Experimentos en planta piloto.

♦ *Gracilaria cornea*

Los datos de producción de *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero (Fig. 22) muestran que hay un efecto significativo ($p=0,014$) entre el nivel de aporte del fósforo y la tasa de crecimiento específica del alga.

Se observa que la tasa de crecimiento específica es máxima a un nivel de aporte de fósforo de $10 \mu\text{M}$ ($6,2 \pm 1,4 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$) y por encima o por debajo de este nivel la tasa de crecimiento específica disminuye (Fig. 21 y 22). La tasa de crecimiento óptima tiene lugar a contenidos de fósforo en tejido cercanos a $3,0 \text{ mg P/g PS}$.

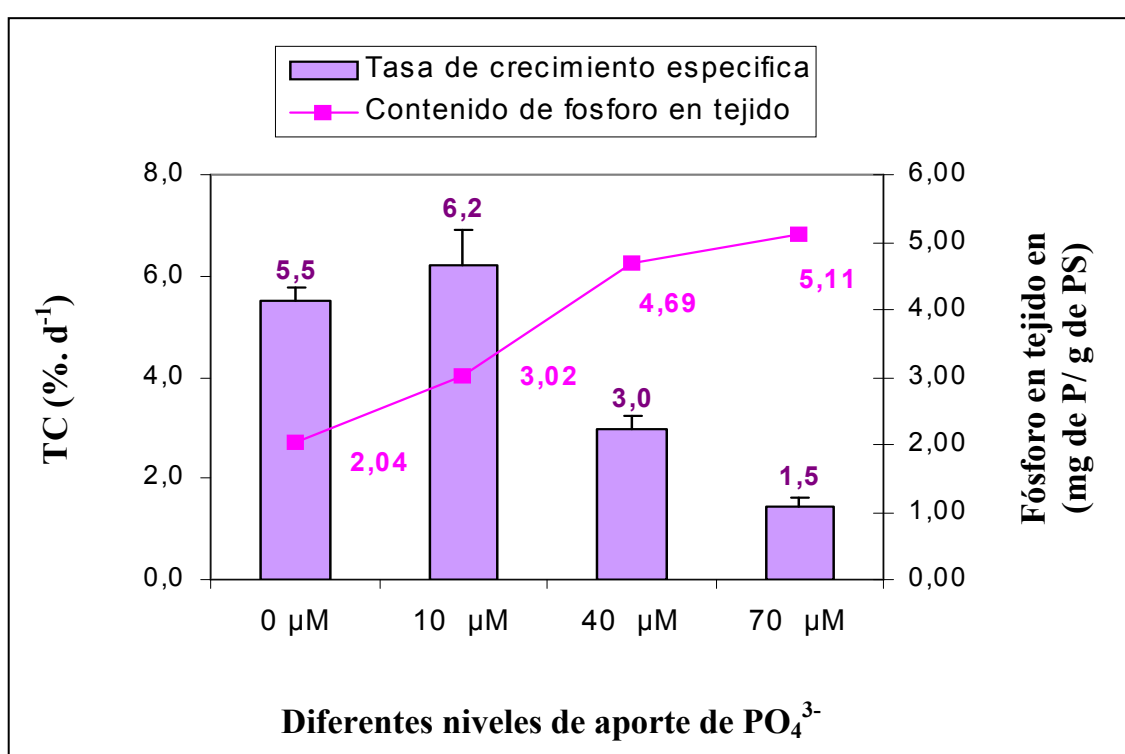


Figura 21.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del nivel de contenido de fósforo en tejido.

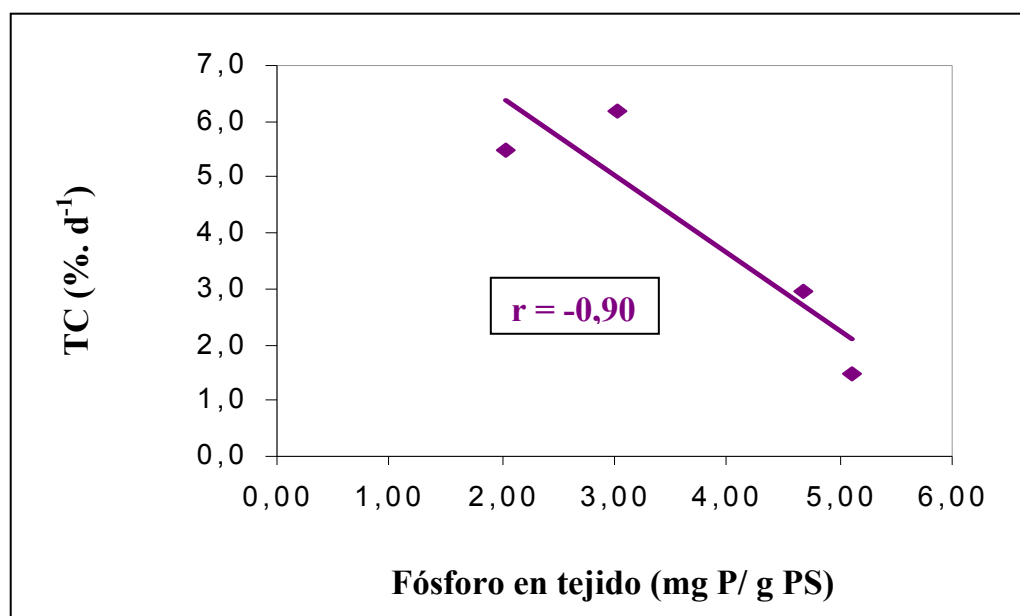


Figura 22.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero.

♦ *Ulva rigida*

Los datos de producción de *Ulva rigida* mantenida bajo condiciones de invernadero (Fig. 23) muestran que hubo un efecto significativo ($p=0,047$) del nivel de aporte de los fosfatos sobre la tasa de crecimiento específica del alga.

El valor máximo de la tasa de crecimiento específica fue observado a una concentración de 10 μM de fosfatos ($11,5 \pm 1,8 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$) siendo los valores registrados a niveles de fosfatos superiores e inferiores más bajos. Si se contrastan estos valores con los valores de contenido de fósforo en tejido se observa que la tasa de crecimiento óptima corresponde a un contenido de fósforo en tejido de 1,6 mg de P/ g PS.

Por otra parte se observa una correlación positiva entre la tasa de crecimiento específica y los niveles de fósforo en tejido hasta un límite de 1,6 mg de P/g PS (Fig. 23 y 24).

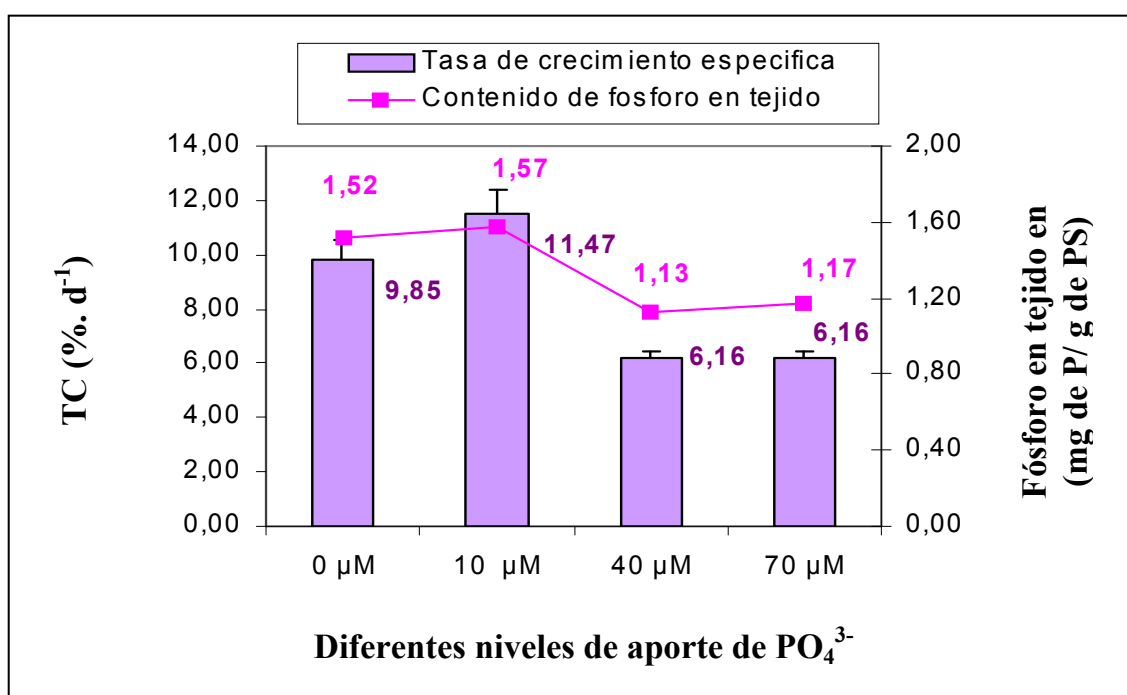


Figura 23.- Variación de la tasa de crecimiento específica, para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de invernadero de cultivo, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos y del nivel de contenido de fósforo en tejido.

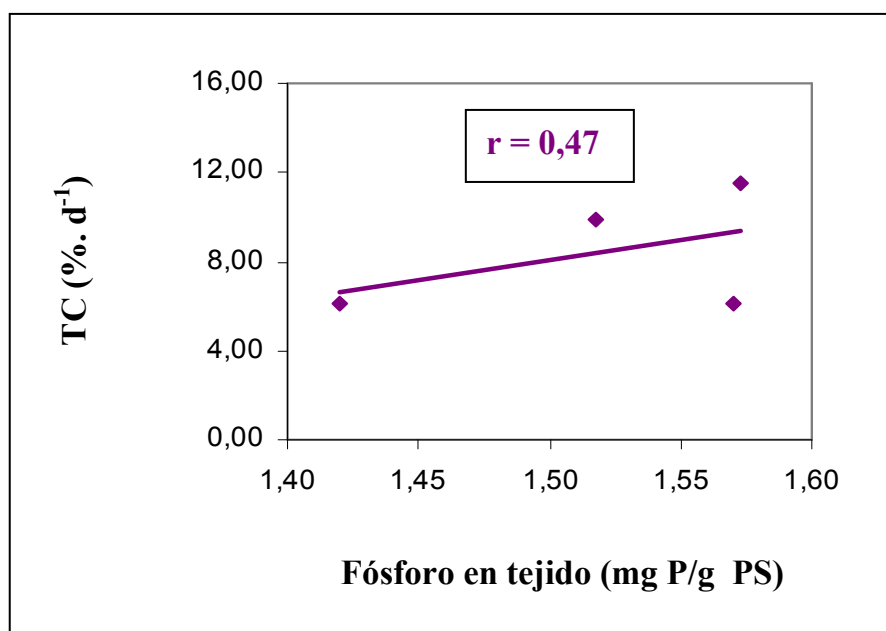


Figura 24.- Correlación entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido para Ulva rigida mantenida en condiciones de invernadero.

II- Composición química

1- Carbohidratos

1-2-Experimentos en cámara de cultivo.

♦ *Gracilaria cornea*

Los datos mostrados en la figura 25 y la tabla 11 muestran que no hay un efecto significativo, ni del nivel de aporte de amonio ($p=0,11$) ni de fosfatos ($p=0,069$) sobre el contenido de carbohidratos en tejido.

Por otra parte, no existe correlación entre los contenidos de fósforo y carbohidratos en tejido de esta especie.

Tabla 11.- Variación del contenido de Carbohidratos en tejido (% de PS \pm DS) para *Gracilaria cornea*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}					Media
	0 μM	10 μM	40 μM	70 μM	100 μM	
³ (Serie 1)	32,8 \pm 6,0	36,0 \pm 2,6	30,4 \pm 1,3	32,1 \pm 5,1	32,2 \pm 0,9	32,7 \pm 2,1
⁷ (Serie 2)	32,4 \pm 3,9	34,2 \pm 2,8	34,4 \pm 0,3	38,0 \pm 0,9	33,7 \pm 9,6	34,5 \pm 2,1
⁰ (Serie 3)	34,8 \pm 2,1	44,7 \pm 0,5	34,9 \pm 2,2	39,2 \pm 0,0	29,4 \pm 0,2	36,7 \pm 5,5
Media	33,3 \pm 1,3	38,3 \pm 5,6	33,2 \pm 2,5	36,4 \pm 3,8	32,0 \pm 1,9	
Contenido en carbohidratos de la muestra inicial (% de PS \pm DS)					43,0 \pm 2,2	

Los resultados expresados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=6$ para P, $n=10$ para N y $n=2$ para la muestra inicial). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

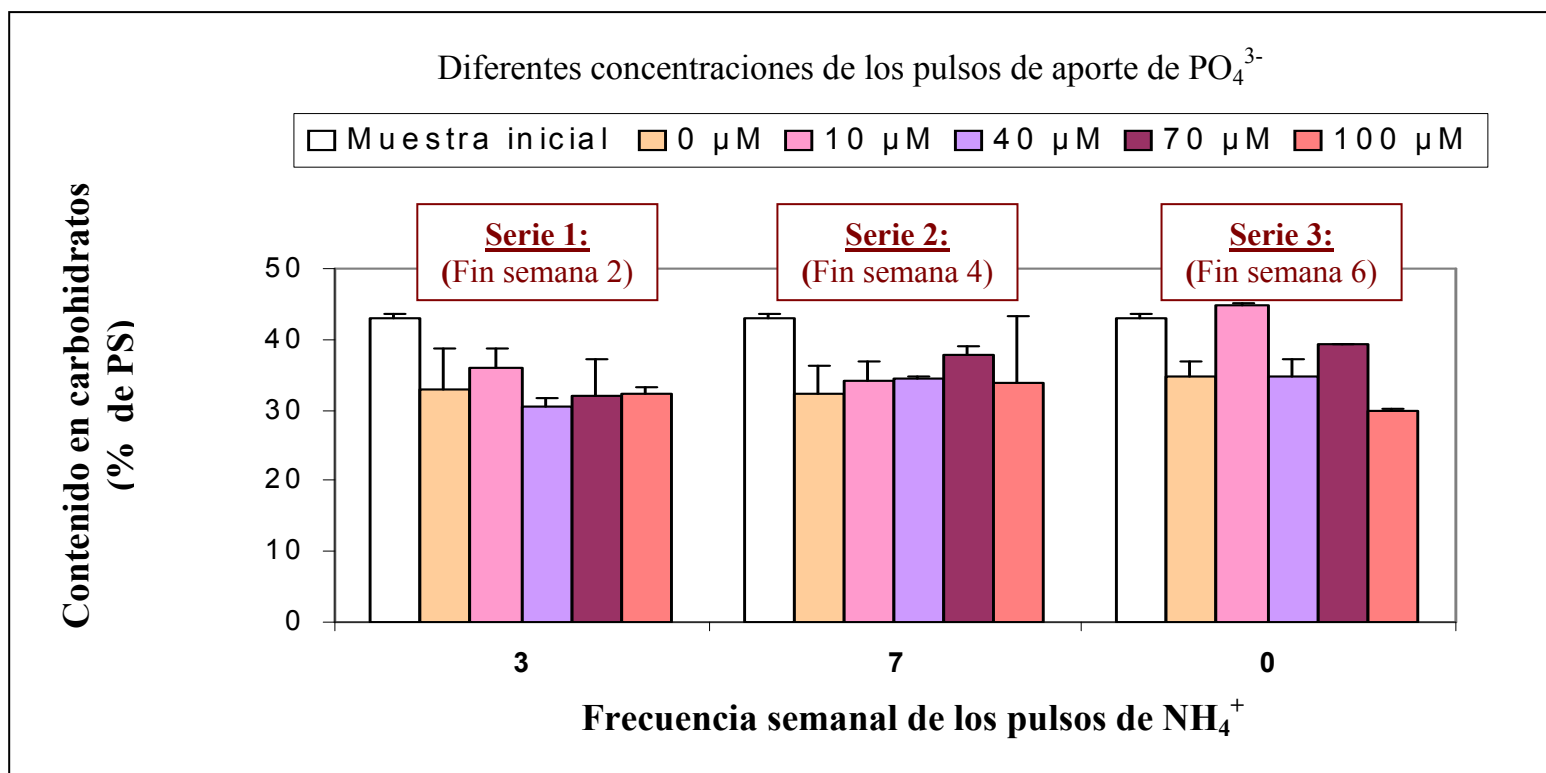


Figura 25.- Variación del contenido en carbohidratos, para *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 6 para P, n= 10 para N y para la muestra inicial n=2).

♦ *Ulva rigida*

Los datos obtenidos muestran un efecto significativo del nivel de aporte del amonio ($p=0,000$) sobre el contenido de carbohidratos en tejido de *Ulva rigida*. Mientras que no se observa un efecto significativo ($p=0,42$) entre el nivel de aporte de fosfatos sobre el contenido de carbohidratos de esta especie (Fig. 26 y Tabla 12).

Tabla 12.- Variación del contenido de Carbohidratos en tejido (% de PS \pm DS) para *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}					
	$0 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$40 \mu\text{M}$	$70 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$	Media
³ (Serie 1)	$17,1 \pm 5,8$	$18,1 \pm 2,9$	$19,9 \pm 4,7$	$19,4 \pm 1,7$	$16,8 \pm 0,3$	$18,3 \pm 1,4$
⁷ (Serie 2)	$11,4 \pm 5,6$	$10,8 \pm 0,5$	$8,9 \pm 1,8$	$12,7 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,0$	$11,0 \pm 1,4$
⁰ (Serie 3)	$13,2 \pm 0,9$	$18,2 \pm 2,2$	$20,2 \pm 4,2$	$21,0 \pm 2,9$	$18,8 \pm 3,1$	$18,3 \pm 3,0$
Media	$13,9 \pm 2,9$	$15,7 \pm 4,3$	$16,4 \pm 6,5$	$17,7 \pm 4,4$	$15,6 \pm 3,9$	
Contenido en carbohidratos de la muestra inicial (% de PS \pm DS)						$14,3 \pm 6,0$

Los resultados representados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=6$ para P, $n= 10$ para N y $n= 2$ para la muestra inicial). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

Sin embargo, se observó una correlación lineal negativa entre el contenido de carbohidratos en tejido y los contenidos de fósforo ($r^2= 0,582$) y nitrógeno ($r^2= 0,56$) en tejido (Fig. 27).

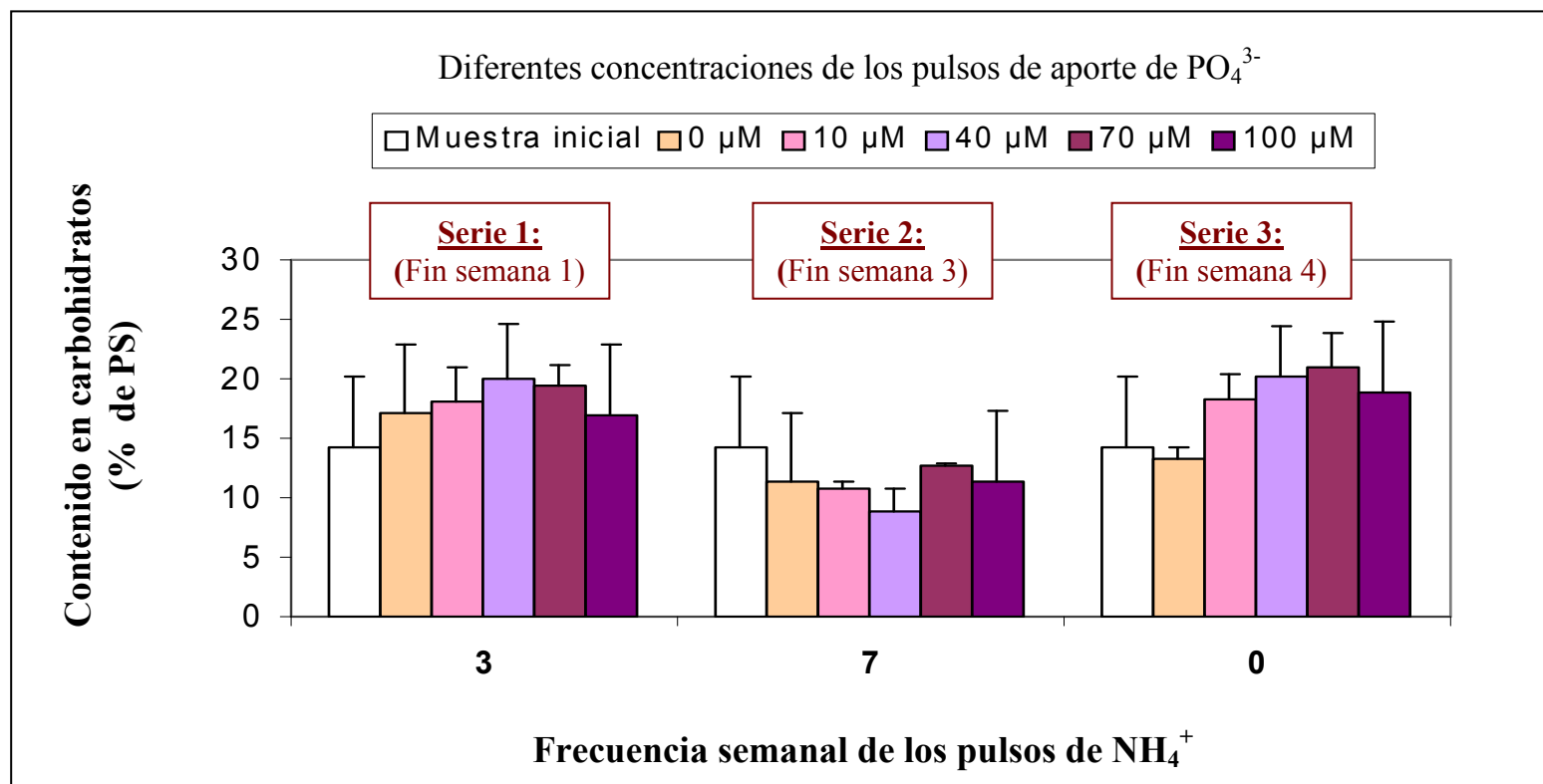


Figura 26.- Variación del contenido en carbohidratos, para *Ulva rigida* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 6 para P, n= 10 para N y para la muestra inicial n=2).

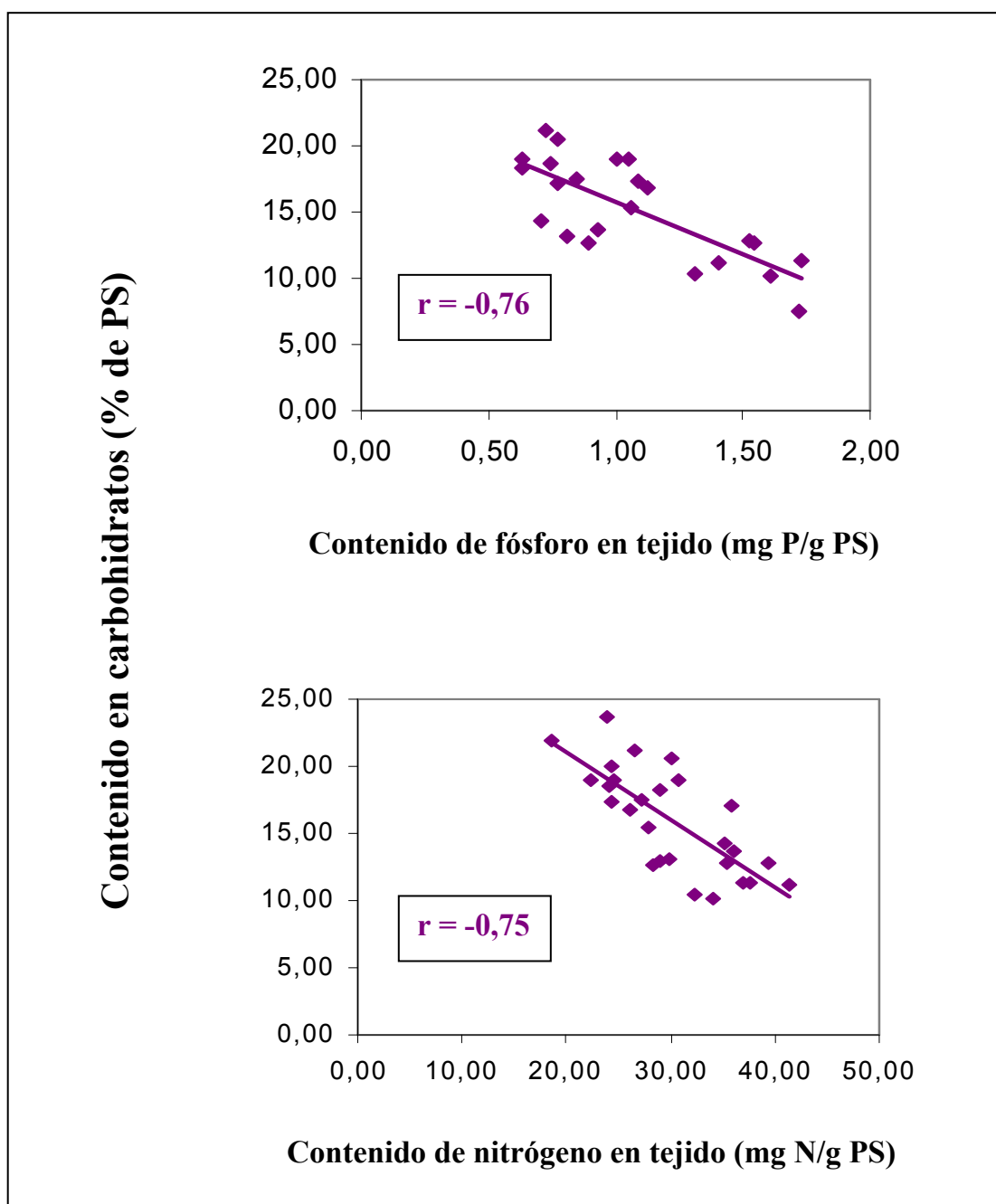


Figura 27.- Correlación entre el contenido carbohidratos y los contenidos en tejido de fósforo y nitrógeno Ulva rigida mantenida en condiciones de cámara de cultivo.

2-2-Experimentos en planta piloto.

♦ *Gracilaria cornea*

Según los datos presentados en la figura 28, el nivel de aporte de fosfatos no tuvo un efecto significativo ($p=0,164$) sobre el contenido de carbohidratos de *G. cornea*.

No se observó ninguna correlación significativa entre el nivel de contenido en fósforo en tejido y la concentración de carbohidratos. Debido a problemas técnicos con el equipo no se han podido obtener todos los datos del contenido en nitrógeno de *Gracilaria cornea*, con lo que no se ha podido estudiar el efecto del contenido de nitrógeno en tejido de *Gracilaria cornea* sobre el contenido en carbohidratos.

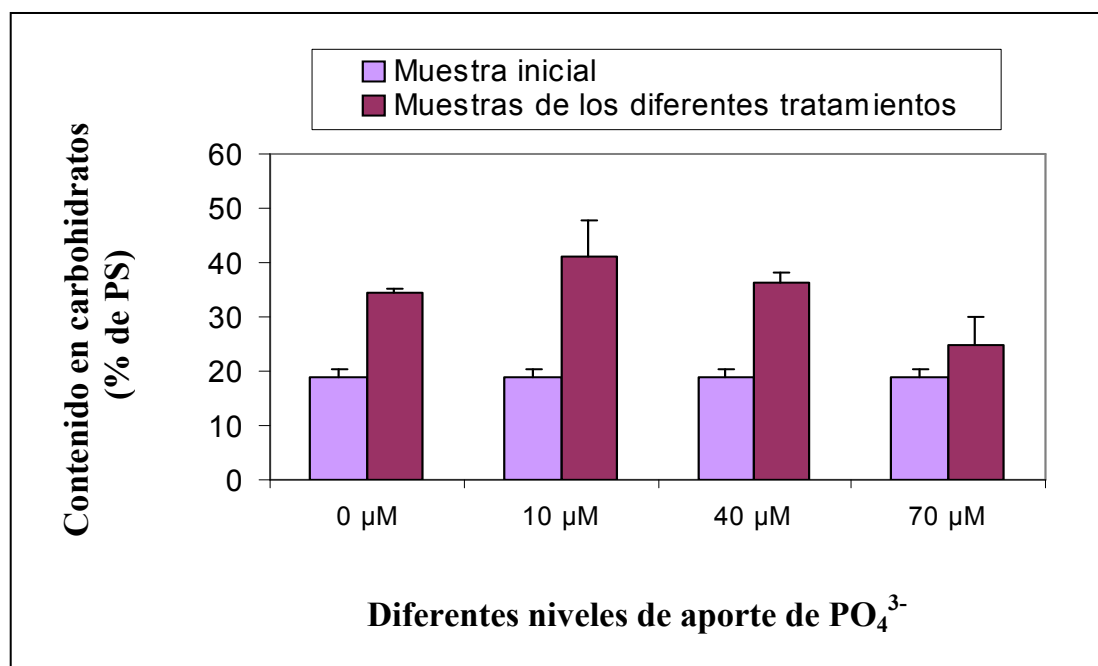


Figura 28.- Variación del contenido en carbohidratos, para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.

La gráfica representa los valores de las medias de los duplicados de cada réplica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n=2$).

♦ *Ulva rigida*

Según los datos presentados en la figura 29, el nivel de aporte de fosfatos no tuvo un efecto significativo ($p=0,163$) sobre el contenido de carbohidratos de *Ulva rigida*.

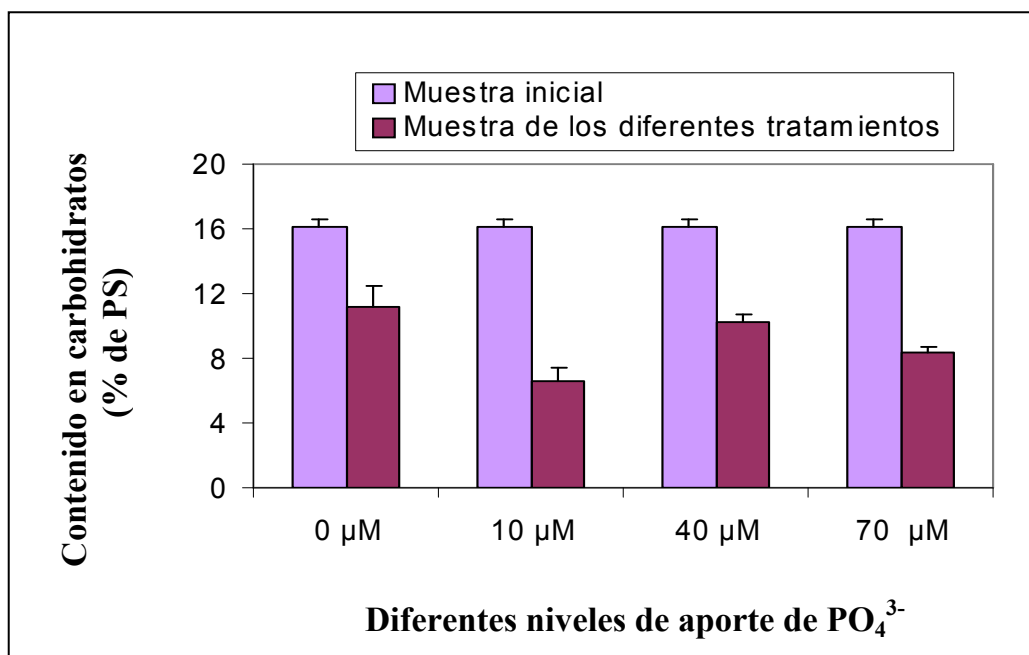


Figura 29.- Variación del contenido en carbohidratos, para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de invernadero, en función de diferentes niveles de aporte de fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n=2$).

Por otro lado, los datos de la figura 30 muestran que existe una correlación, significativa, negativa y lineal entre el contenido en carbohidratos y los contenidos en tejido de fósforo ($r = -0,92$) y de nitrógeno ($r = -0,93$) para *Ulva rigida*.

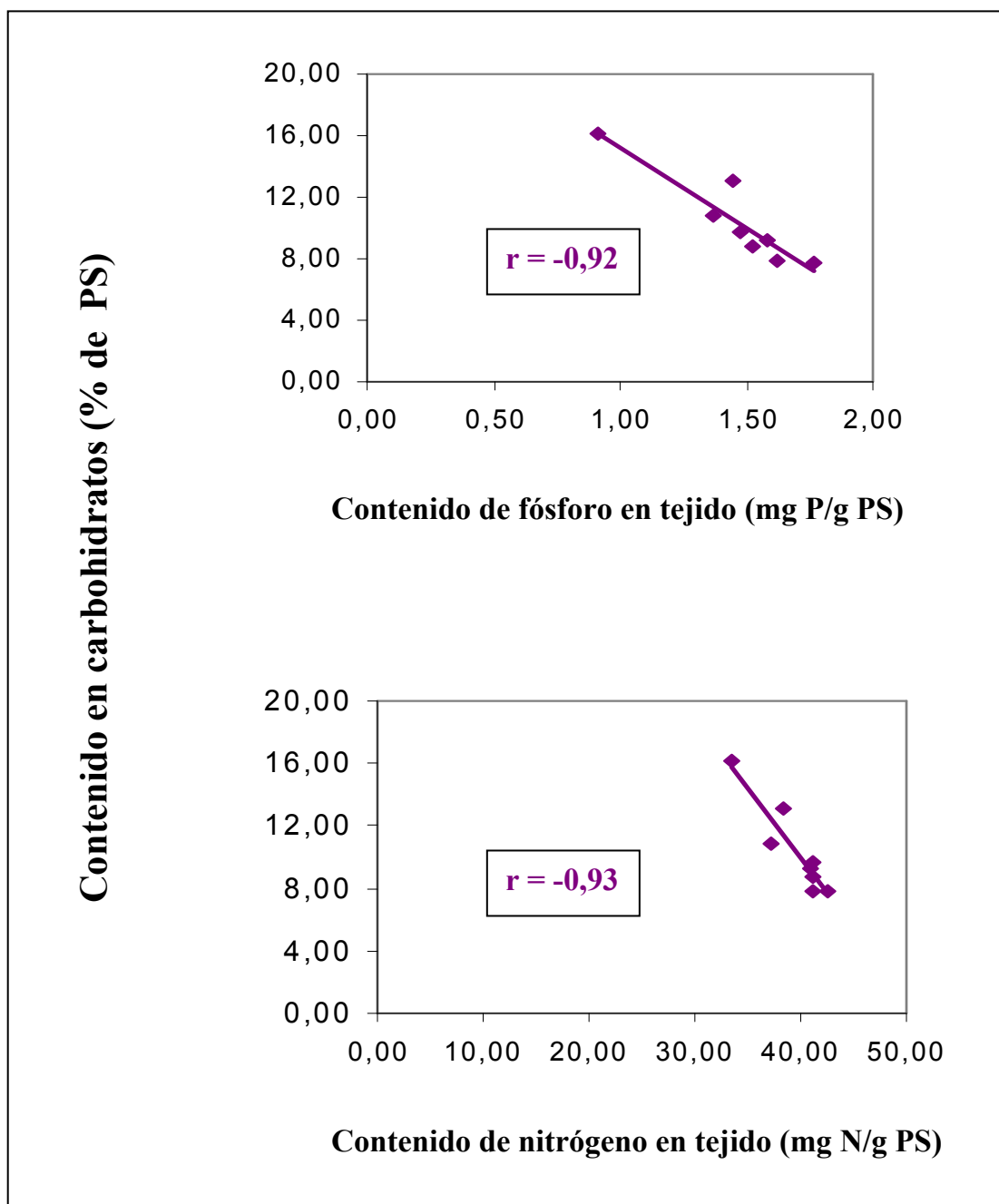


Figura 30.- Correlación entre el contenido en carbohidratos y los contenidos en tejido de fósforo y nitrógeno para Ulva rigida mantenida en condiciones de invernadero.

1- Proteínas

1-2-Experimentos en cámara de cultivo.

♦ *Gracilaria cornea*

Debido a problemas técnicos no se pudieron obtener todos los datos de contenido de nitrógeno de *Gracilaria cornea*, por eso se usó el contenido en ficoeritrina, como indicador del contenido tisular en proteínas. Los datos presentados en la figura 31, muestran la existencia de un efecto significativo tanto del nivel de aporte de fosfatos ($p=0,00$) como del nivel de aporte de amonio ($p=0,00$) sobre el contenido en ficoeritrina.

Tabla 13.- Variación del contenido de ficoeritrina en tejido (mg/g PS \pm DS) para *Gracilaria cornea*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}					
	0 μM	10 μM	40 μM	70 μM	100 μM	Media
3 (Serie 1)	2,4 \pm 0,3	1,9 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,0	1,7 \pm 0,5	2,0 ^{aa} \pm 0,4
7 (Serie 2)	5,6 \pm 0,0	3,3 \pm 0,0	3,9 \pm 0,0	2,7 \pm 0,0	3,4 \pm 0,0	3,8 ^{ab} \pm 1,1
0 (Serie 3)	1,8 \pm 0,1	1,1 \pm 0,5	2,2 \pm 0,3	1,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	1,7 ^{ac} \pm 0,4
Media	3,3 ^a \pm 2,0	2,1 ^b \pm 1,1	2,9 ^a \pm 0,9	2,0 ^b \pm 0,6	2,3 ^b \pm 1,0	

Los resultados expresados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada réplica de tratamiento ($n=4$ para P y $n=10$ para N). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

Los niveles de ficoeritrina evolucionaron proporcionalmente con la frecuencia de los pulsos de amonio; registrándose el valor máximo de $3,8 \pm 1,1$ mg/g PS a una frecuencia de 7 pulsos, el valor mínimo de $1,7 \pm 0,4$ mg/g PS con una frecuencia de 0 pulsos a la semana; y un valor medio de $2,0 \pm 0,4$ mg/g PS a una frecuencia de 3 pulsos por semana.

Por otro lado, los niveles máximos de ficoeritrina ($3,3 \pm 2,0$ y $2,9 \pm 0,9$ mg/g PS) fueron registrados para un nivel de aporte de 10 y 40 μ M de fosfatos respectivamente. Sin embargo, no se observó una correlación significativa ($r^2 = 0,1$) entre el contenido de fósforo en tejido y el contenido de ficoeritrina.

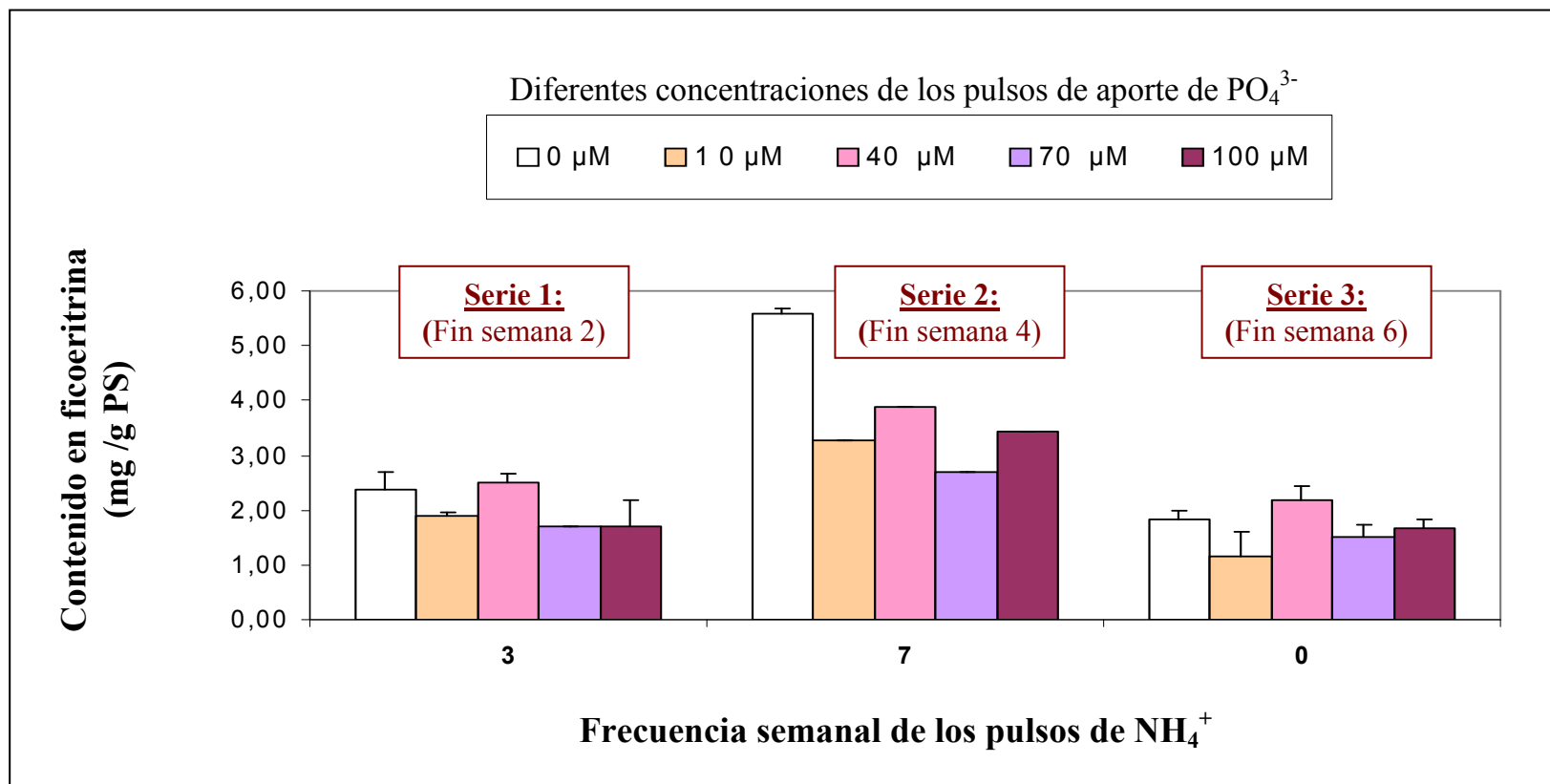


Figura 31.- Variación del contenido en ficoeritrina, para *Gracilaria cornea* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 4).

♦ *Ulva rigida*

Los datos presentados en la figura 32 muestran que no hubo un efecto significativo ($p=0,153$) del nivel de aporte de los fosfatos sobre el contenido en proteína del alga. Por otra parte no existe una correlación significativa entre los contenidos en tejido de fósforo y proteína ($r^2=0,33$).

Sin embargo, si existe un efecto significativo ($p=0,000$) del aporte de amonio sobre el contenido en proteínas, siendo la variación del contenido en proteína proporcional al nivel de aporte de amonio ($16,5 \pm 4,0$ % en proteína de PS a 0 pulsos; $18,8 \pm 1,3$ % a 3 pulsos y $21,4 \pm 1,7$ % en proteína de PS a 7 pulsos).

Tabla 14.- Variación del contenido de Proteína en tejido (% de PS \pm DS) para *Ulva rigida*, en condiciones de cámara de cultivo, en función del nivel de aporte de fosfatos y la frecuencia de los pulsos de aporte del amonio.

Frecuencia semanal de aporte de NH_4^+	Concentración de los pulsos de PO_4^{3-}					
	0 μM	10 μM	40 μM	70 μM	100 μM	Media
3 (Serie 1)	17,3 \pm 1,0	20,8 \pm 2,3	18,4 \pm 1,9	18,4 \pm 0,6	18,9 \pm 0,3	18,8^{aa} \pm 1,3
7 (Serie 2)	19,6 \pm 3,0	23,0 \pm 3,9	21,3 \pm 0,0	20,0 \pm 3,1	23,3 \pm 0,3	21,4^{ab} \pm 1,7
0 (Serie 3)	23,6 \pm 1,5	14,6 \pm 0,8	15,6 \pm 0,9	13,4 \pm 2,5	15,2 \pm 0,2	16,5^{ac} \pm 4,1
Media	20,2^a \pm 3,2	19,5^a \pm 4,3	18,5^a \pm 2,9	17,3^a \pm 3,4	19,1^a \pm 4,0	

Los resultados representados corresponden a las medias de los valores obtenidos, al final de cada serie, a partir de los duplicados de cada replica de tratamiento ($n=4$ y $n=2$ para la muestra inicial). Valores, en una misma línea o misma columna, con distinto superíndice indican diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$).

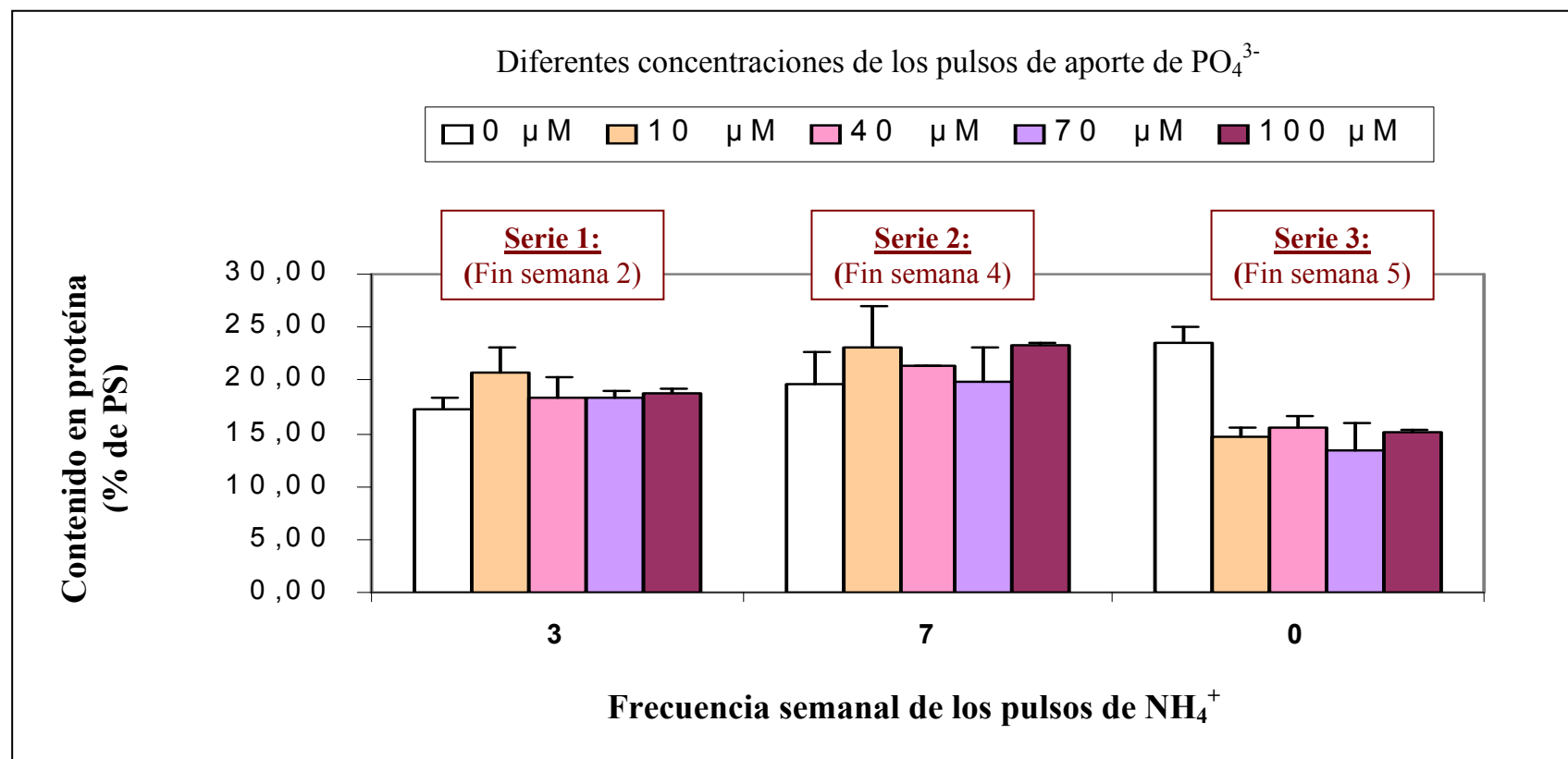


Figura 32.- Variación del contenido en proteína, para *Ulva rigida* mantenida en cámara de cultivo, bajo diferentes combinaciones de aporte de amonio y fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidos al final de las 2 semanas de cada serie (n= 4).

2-2-Experimentos en planta piloto.

♦ *Gracilaria cornea*

Los datos presentados en la figura 33 muestran que no hay un efecto significativo ($p=0,25$) del aporte de los fosfatos sobre el contenido en ficoeritrina del alga. Sin embargo existe una correlación positiva ($r=0,66$) entre los contenidos de ficoeritrina y fósforo en tejido del alga (Fig. 34)

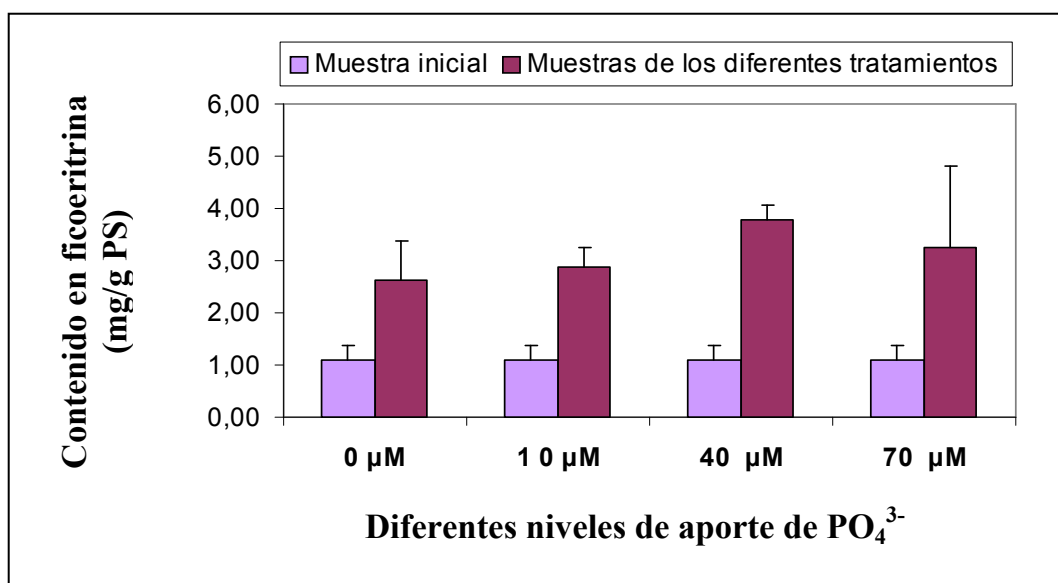


Figura 33.- Variación del contenido en ficoeritrina, para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero, bajo diferentes niveles de aporte de fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n= 2$).

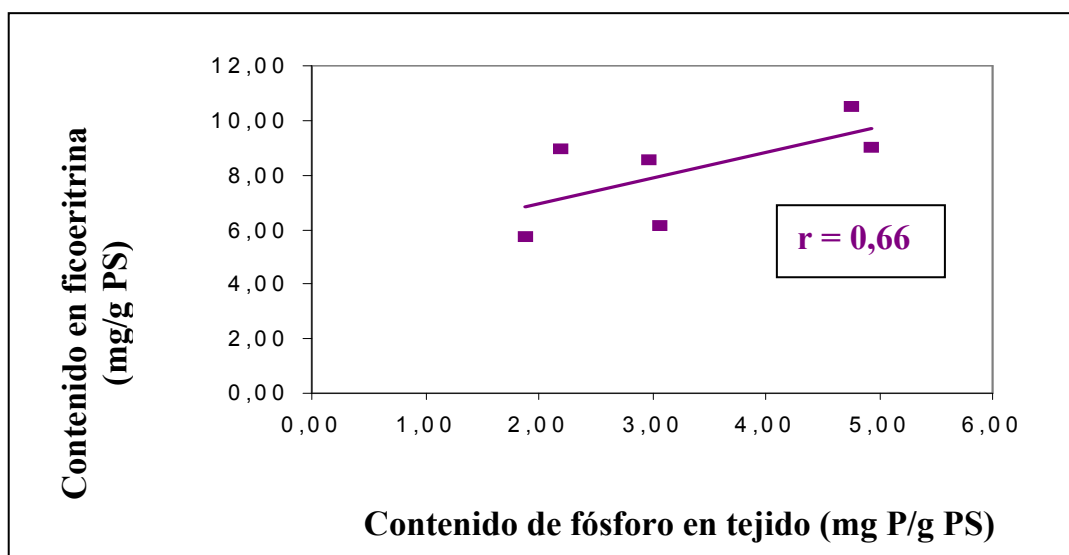


Figura 34.- Correlación entre los contenidos en ficoeritrina y fósforo en tejido para *Gracilaria cornea* mantenida en condiciones de invernadero.

♦ *Ulva rigida*

Los datos presentados en la figura 35 muestran que no se observa un efecto significativo ($p=0,5$) del aporte de fosfatos en el medio y el contenido en proteína del alga. Sin embargo si que existe una correlación positiva ($r= 0,83$) entre el contenido de fósforo en tejido y el proteínas en el alga (Fig. 36).

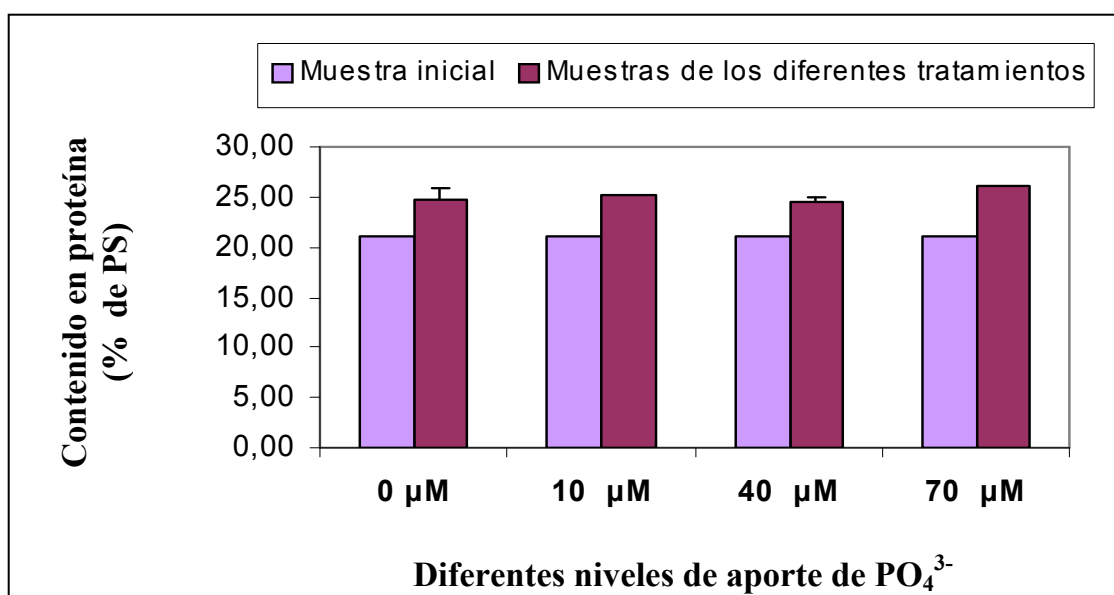


Figura 35.- Variación del contenido en proteína, para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de invernadero, bajo diferentes niveles de aporte de fosfatos.

La grafica representa los valores de las medias de los duplicados de cada replica de tratamiento, obtenidas al final del experimento ($n=4$ y para la muestra inicial $n= 2$).

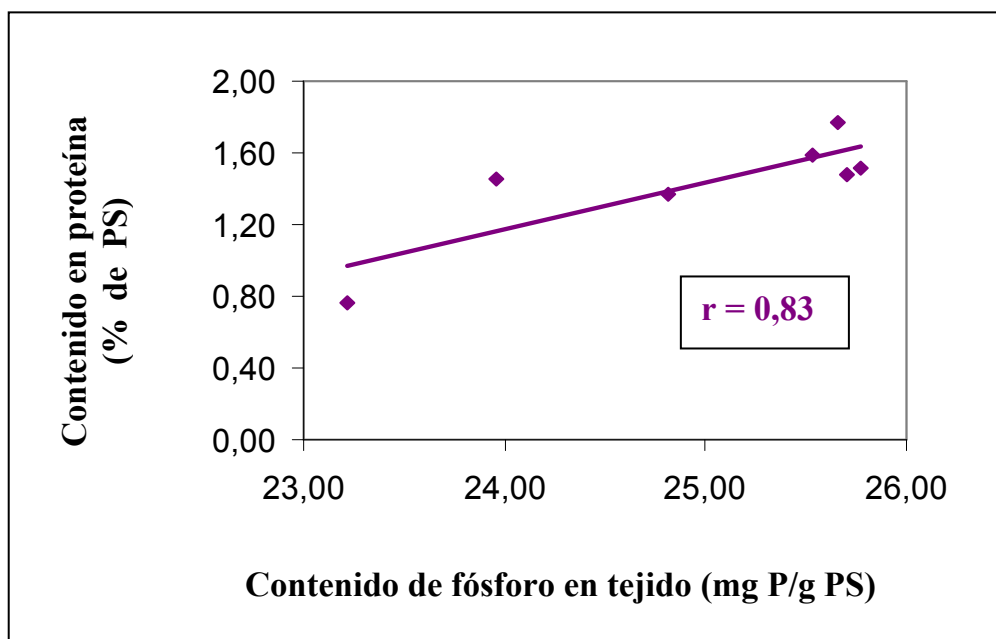


Figura 36.- Correlación entre los contenidos en proteína y fósforo en tejido para *Ulva rigida* mantenida en condiciones de invernadero.

Discusión

I- Biofiltración y asimilación de fosfatos

1- Gracilaria cornea

Los datos de biofiltración obtenidos para la rodofita *Gracilaria cornea* cultivada tanto a escala de laboratorio como en tanques a escala piloto (bajo condiciones de invernadero) muestran que esta especie es capaz de eliminar de forma eficiente los aportes de fosfatos en altas concentraciones, mostrando diferencias en la eficiencia de biofiltración según el tiempo transcurrido después de la adición de fosfatos (eficiencias entre el 99,7 al 43,3 % después de 7 días y del 94,0 al 16,2 % después de 10 horas). Los datos obtenidos son comparables con los datos de tasas de biofiltración de fosfatos obtenidos por otros autores mostrando una eliminación de fosfatos de efluentes de langostinos del 95 % para *Gracilaria edulis*, 84,8 % de eliminación de fosfatos por *Gracilaria conferta* en sistemas de cultivo integrados y un 32 % de eliminación de fosfatos por *Gracilaria chilensis* en un sistema de cultivo integrado con salmones (Martínez-Aragón et al, 2002).

Tanto en condiciones de laboratorio como bajo condiciones de invernadero las tasas de biofiltración máximas (entre 99,7 y 94 %) fueron obtenidas para una concentración de fosfatos en agua de 10 μM , siendo las tasas de biofiltración más bajas a concentraciones de fosfatos más elevadas. Estos datos demuestran que *Gracilaria cornea* presenta mecanismos de saturación en función de la disponibilidad de nutrientes similares a los obtenidos por otras especies de macroalgas que presentan cinéticas de eliminación de fosfatos ajustadas a curvas de saturación de Michaelis-Menten (Lobban y Harisson, 1997). Esto supone que la capacidad de biofiltración se satura a concentraciones elevadas de fosfatos en el medio. Los datos correspondientes al

contenido de fósforo en tejido analizados durante los experimentos demuestran esta consideración ya que los valores se mantienen estables a concentraciones de 40, 70 y 100 μM , lo que evidencia la existencia de saturación del mecanismo de asimilación de fosfatos por esta especie.

2- *Ulva rígida*

Las tasas de biofiltración registradas para la clorofita *Ulva rigida* tanto bajo condiciones de laboratorio como de invernadero (tasas del 93,7 al 21,0 % de eliminación después de 7 días del pulso de fosfatos y del 37,6 al 2,8 % después de 10 horas del pulso de fosfatos) han demostrado que la capacidad de biofiltración de fosfatos de *Ulva rigida* es menor que la de *Gracilaria cornea*.

Un gran número de factores, como las variaciones inter-específicas de las algas, el historial de nutrición, el tipo de tejido o la fase del ciclo biológico en la cual se encuentra el alga, afectan la absorción de nutrientes (Harrison y Hurd, 2001). Según Harrison y Hurd (2001) la relación N:P en tejido del alga puede controlar la variación de la eficiencia de biofiltración ya que el ratio interno N:P del alga regula la tasa de absorción de estos dos nutrientes como forma de mantener esta proporción en su nivel optimo. Las muestras iniciales que se usaron para nuestro experimento tenían una relación N:P de 10:1 para *Gracilaria cornea* y 30:1 para *Ulva rigida* lo que explica que *G. cornea* eliminara los fosfatos del agua con mayor eficiencia y que la filtración de fosfatos no se viera afectada por la disponibilidad de nitrógeno (amonio) en el medio mientras que para *Ulva rigida* se obtuvieron dinámicas diferentes. Cuando la relación N:P en el medio es menor que el nivel óptimo del alga, el crecimiento se verá limitado por la carencia de N, mientras que el exceso de P es excretado al medio o almacenado en tejido (Harrison y Hurd, 2001). Por otro lado, las macroalgas tienen la capacidad de regular la absorción de P para mantener un equilibrio interno del ratio N:P (Björnsäter y

Wheeler, 1990). El bajo contenido inicial en P para *Ulva rigida*, explica el hecho de que el alga no haya filtrado ni asimilado los fosfatos de manera muy eficiente. A esto se suma el hecho que *Ulva* pueda bajo ciertas condiciones liberar el fósforo hacia el medio exterior. Según Runcie et al. (2004), *Ulva lactuca* y *Cantella nipa* pueden liberar parte del fósforo contenido en su pared celular y en algunos compartimentos intracelulares en forma de ortofosfatos y algunos componentes orgánicos. Según estos mismos autores la liberación de fósforo por estas especies sería constante e independiente de la concentración de éste en el medio externo. Esto podría explicar las variaciones continuas en contenido en fósforo registradas a lo largo de los experimentos llevados a cabo con *Ulva rigida*.

Por otra parte, se observó que durante las dos primeras semanas del ensayo de *Ulva rigida* a escala de laboratorio, semanas durante las cuales la frecuencia de aporte de amonio era de 3 pulsos por semana, la tasa de biofiltración del fósforo era alta mientras que el nivel de contenido de fósforo en tejido era bajo. Esta contradicción se puede explicar por la tasa de crecimiento alta que se registro durante esta semana. Después de un periodo de limitación de nutrientes, la posterior adición de fosfatos estimula una fase de absorción ascendente hasta alcanzar niveles extremos de asimilación (definidos en la bibliografía como “surge uptake”). Esta fase se caracteriza por presentar una tasa muy alta de absorción del nutriente produciendo que el alga sobrepase su carencia y mantenga su tasa de crecimiento (Harrison y Hurd, 2001; Runcie et al., 2004).

II- Tasas de crecimiento

1- Gracilaria cornea

Los datos de tasa de crecimiento específica obtenidos para *Gracilaria cornea*, cultivada a escala de laboratorio demuestran que la frecuencia de los aportes de amonio tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del alga. Asimismo se observó que con una frecuencia de 3 pulsos de amonio por semana se obtuvieron mayores valores de crecimiento ($2,4 \pm 0,1 \text{ \% d}^{-1}$) que con aportes de 7 pulsos de amonio por semana ($1,7 \pm 0,4 \text{ \% d}^{-1}$). Otros autores demostraron que para *Gracilaria chilensis* la frecuencia de los pulsos tiene un mayor efecto sobre el crecimiento del alga que su concentración (Smit et al., 1997).

Por otra parte se observó que la tasa de crecimiento de esta especie, tanto bajo condiciones controladas como bajo condiciones de planta piloto, estaba positivamente correlacionado con el contenido de fósforo en tejido hasta el límite de 2,5 mg P/g PS para *Gracilaria cornea* cultivada en condiciones de laboratorio y 3,0 mg P/g PS para *G. cornea* cultivada en condiciones de planta piloto. Esto indica que el fósforo es un elemento importante para el crecimiento de esta especie. Por encima de estos valores se registraron disminuciones de las tasas de crecimiento específica de forma inversamente proporcional al contenido de fósforo en tejido. Esto podría explicar la limitación del crecimiento debida al exceso de fósforo en el medio. Con aportes de fósforo de concentración 6 μM por semana, la tasa de crecimiento de la rodofita *Agardhiella subulata* fue máxima, sin embargo, a concentraciones más elevadas la tasa de crecimiento disminuyeron hasta valores intermedios (Chopin y Wagey, 1999).

Según Navarro-Angulo y Robledo (1999), en ambientes tropicales, niveles bajos de fósforo reducen la capacidad fotosintética de *Gracilaria tikvahiae* limitando su crecimiento y su productividad. Estos mismos autores demostraron que aportes de N:P

de 10:10 inhiben el crecimiento de *Gracilaria cornea* debido al efecto perjudicial de las altas concentraciones de fosfato en el medio. Los resultados obtenidos durante nuestros experimentos demuestran que, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, la productividad de *G. cornea* se vió limitada a valores mucho menores en la relación N:P (15:4 en el laboratorio y 15:1 en invernadero).

2- *Ulva rigida*

Resultados similares, en relación al efecto de la frecuencia de los pulsos de amonio sobre la tasa de crecimiento del alga, a los observados para *Gracilaria cornea* fueron medidos para *Ulva rigida*, cultivada en condiciones de laboratorio. Asimismo se obtuvieron mejores rendimientos con un aporte de amonio en 3 pulsos por semana ($3,5 \pm 1,3 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$) que con un aporte de 7 pulsos por semana ($2,8 \pm 1,2 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$). Estos resultados fueron similares para las dos especies bajo las diferentes condiciones ensayadas, observándose mayores tasas de crecimiento en los periodos posteriores a los días de cultivo bajo limitación de nutrientes.

De la misma manera que para *Gracilaria cornea*, se observó que la tasa de crecimiento específica de *Ulva rigida*, mantenida tanto bajo condiciones controladas como bajo condiciones de planta piloto, estaba positivamente correlacionada con el nivel de aporte de los fosfatos al medio y con el contenido de fósforo en tejido hasta el límite 1,7 mg P/g PS (19,8 mg P/g PF) para las algas bajo condiciones de planta piloto, y 1,0 mg P/g PS (16,5 mg P/g PF) para las cultivadas en condiciones de laboratorio. Este resultado indicaría que el fósforo es un elemento importante a considerar para el óptimo crecimiento de estas especies. Por encima de estos límites se registraron disminuciones en las tasas de crecimiento. Esto podría indicar la existencia de limitación del crecimiento debido al exceso de fósforo en el medio. Björnsäter y Wheeler (1990) describieron que para las clorofitas *Ulva fenestra* y *Enteromorpha*

intestinales, el contenido de fósforo y la tasa de crecimiento específica estaban correlacionados linealmente y positivamente para un contenido de fósforo en tejido inferior a 0,6 % de peso fresco (6 mg de P/g PF). Hafting (1999) por su parte describió que para la rodofita *Porphyra yezoensis*, el fósforo juega un papel importante para su crecimiento demostrando la existencia de una correlación positiva y lineal entre la tasa de crecimiento específica y el contenido de fósforo en tejido, para unos valores de este ultimo inferiores a 2 mg de P/g de PF. Los valores de fósforo en tejido obtenidos en nuestros experimentos, como valores limitantes para el crecimiento *Ulva rigida*, se encuentran por encima de los valores descritos por otros autores, lo que indica que no hay ninguna contradicción entre nuestros resultados y los resultados obtenidos por dichos autores.

II- Composición bioquímica

1- Carbohidratos

1-1-Gracilaria cornea

Diferentes estudios han demostrado que el nivel de fósforo en tejido tiene un efecto negativo sobre el contenido en polisacáridos en dos especies de rodofitas, *Chondrus crispus* y *Agardhiella subulata*, similar al efecto Neish descrito para el nitrógeno (Chopin y Yarish, 1998). Por otra parte, hay trabajos que contradicen este efecto del contenido en fósforo sobre el contenido en carragenatos (polisacárido estructural de estas especies de algas rojas) de *Chondrus crispus*. Chopin y Gallant (1995), demostraron que para esta especie el contenido en fósforo en tejido tenía un efecto negativo sobre el contenido en carragenatos, mientras que Chopin y Wagey (1999) han demostrado que el contenido en fósforo no tenía efecto significativo sobre el contenido en carragenatos para la misma especie. A la vista de estos resultados contradictorios, no hay otros estudios fiables realizados sobre el efecto del fósforo sobre el contenido en carbohidratos para poder comparar de forma efectiva nuestros resultados.

Los datos de aporte de amonio en el medio mostraron que no había efecto significativo sobre el contenido de carbohidratos. Esto puede ser debido, a que la asimilación de amonio muestra saturación a determinados niveles, por lo que un nivel alto de aporte de amonio no corresponde siempre a una alta asimilación de amonio en tejido. No obstante, algunos autores han descrito la correlación negativa existente entre el contenido de nitrógeno en tejido y el contenido en carbohidratos en especies como *Gracilaria tikvahiae* (Friedlander y Dawes, 1985), *Gracilacia gracilis* (Smit et al., 1997), y *Chondrus crispus* (Chopin y Gallant, 1995).

1-2-Ulva rigida

Los datos para *Ulva rigida*, tanto cultivada en cámara como en invernadero, han demostrado que el contenido en carbohidratos está correlacionado negativamente con el contenido de nitrógeno en tejido. Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores para especies de rodofitas (Friedlander y Dawes, 1985; Chopin y Gallant, 1995 y Smit et al., 1997). No se han encontrado antecedentes comparables sobre este efecto en especies de algas verdes.

Esta correlación observada entre el contenido en carbohidratos y el de nitrógeno en tejido es debido a que bajo deficiencias en nitrógeno, el carbono asimilado por las algas es almacenado en forma de compuestos no aminados debido a la disponibilidad de nitrógeno (Smit et al., 1997).

2- Proteínas

2-1- Gracilaria cornea

Los datos que se obtuvieron para la variación del contenido en ficoeritrina, bajo condiciones de laboratorio muestran el efecto del nivel de aporte de los fosfatos en el medio y el contenido en ficoeritrina sin que haya una correlación clara entre los dos parámetros. Sin embargo en los experimentos a escala de planta piloto, se observó una diferencia significativa del contenido en ficoeritrina en función del contenido de fósforo indicando que bajo estas condiciones el fósforo no tiene un efecto claro sobre la acumulación de ficoeritrinas como si ha sido demostrado para el nitrógeno.

Por otra parte, se observó que había un aumento del contenido en ficoeritrina con el aumento del contenido de nitrógeno en tejido. Datos similares se obtuvieron para *Gracilaria gracilis* (Smit et al., 1997) y para *Gracilaria cornea* (Navarro-Angulo y Robledo, 1999). Según, Navarro-Angulo y Robledo (1999), en las algas rojas las

ficobiliproteínas son elementos de almacenamiento de nitrógeno tan importante como los amino ácidos libres, siendo la ficoeritrina el pigmento que mas rápidamente responde a la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

2-2- Ulva rigida

Los datos obtenidos para *Ulva rigida*, tanto bajo condiciones de cámara de cultivo como en invernadero, indican que el contenido de proteínas aumenta tanto en relación al contenido en fósforo como el de nitrógeno.

Conclusiones

A la vista de los resultados, del presente trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- 1- Bajo las condiciones de cultivo ensayadas, tanto a nivel de laboratorio bajo condiciones controladas como a nivel de cultivo a escala de planta piloto, *Gracilaria cornea* (Rhodophyta) es capaz de biofiltrar los fosfatos del agua con mayor eficiencia que *Ulva rigida* (Chlorophyta), pudiendo ser consideradas ambas especies como buenas biofiltradoras a concentraciones bajas del fósforo en el medio (superiores al 90 % a concentraciones de 10 μM de fosfatos).
- 2.- El mecanismo de absorción y asimilación del fósforo de estas especies, se ve afectado por la relación N:P interna (N:P de 10:1 para *Gracilaria cornea* y 30:1 para *Ulva rigida*). A mayores relaciones N:P menores son las eficiencias de absorción y asimilación de fósforo.
- 3.- Tanto para *Ulva rigida* como para *Gracilaria cornea*, se obtuvieron tasas de crecimiento superiores con aportes de amonio de 3 pulsos por semana que con aportes continuos (7 pulsos por semana), demostrándose la mayor importancia de la frecuencia con respecto a la concentración de los pulsos.
- 4.- El fósforo es un elemento importante y necesario para el crecimiento de las dos especies cuyo aporte mejora el nivel de crecimiento, aunque hasta el momento no había sido considerado como tal en las condiciones ensayadas. No obstante, a altas concentraciones y dependiendo de las relaciones N:P específicas

de cada especie, un aporte excesivo puede resultar inhibitor (“tóxico”), siendo el nivel óptimo para el crecimiento de *Ulva rigida* entre 1,0 y 1,6 mg de P. g⁻¹ de PS, y el de *Gracilaria cornea* entre 2,5 y 3 mg de P. g⁻¹ de PS.

5.- En relación al efecto de los aportes de fósforo y nitrógeno sobre la síntesis de carbohidratos de las dos especies ensayadas se concluye que para la rodofita *Gracilaria cornea* el aporte y la asimilación de estos nutrientes no muestran un efecto significativo sobre su contenido. Sin embargo, para la clorofita *Ulva rigida* el contenido en carbohidratos muestra una correlación negativa con los contenidos de fósforo y nitrógeno lo que indica que en presencia de estos nutrientes la síntesis de otro tipo de metabolitos se ve estimulada en detrimento de la acumulación de carbohidratos.

6.- Para las dos especies ensayadas la síntesis y acumulación de proteínas guarda una correlación positiva con los niveles de nitrógeno y fósforo en tejido lo que sugiere un efecto directo de este tipo de nutrientes sobre la acumulación proteica bajo las condiciones de cultivo experimentadas.

Bibliografía

- Beer, S. and Eshel, A. 1985. Determining phycoerythrin nad phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust.J.Mar.Freshwat.Res.* 36, p: 785-792.
- Björnsäter, B.R. and Wheeler, P.A. 1990. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth and tissue composition of *Ulva fenestra* and *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta). *J.Phycol.* 26, p: 603-611.
- Chopin, T. and Gallant, T. 1995. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus Crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production, and photosynthetic pigments and metabolism. *J. Phycol.* 31, p: 283-293.
- Chopin, T., Hanisak, M.D., Kohen, F.E., Mollion, J. and Moreau, S. 1990. Studies on carrageenans and effects of seawater phosphorus concentration on carrageenan content and growth of *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft and Wynne (Rhodophyceae, Solieriaceae). *J.Appl. Phycol.* 2: 3-16.
- Chopin, T., Yarish, C. 1998. Nutrients or not? That is the question in seaweed aquaculture...and the answer depends on the type and purpose of the aquaculture. *Worl Aquac Mag.* 29, p: 31-33, 60-61.
- Chopin, T. and Wagey, B.T., 1999. Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichment on nutrients and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. *Bot.Mar.* vol.42, p: 23-31.
- Cremades Ugarte, J., Bárbara Criado, I. y Veiga Villar, A.J. 1998. Las Macroalgas Marinas y sus Aplicaciones. Universidad da Coruña. 158 pp.

- D'Elia, C.F. and DeBoer, J.A. 1978. Nutritional studies of two reed algae. II kinetics of ammonium and nitrate uptake. *J. Phycol.* 14, p: 266-272.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ana.Chem.* 28, p: 350-356.
- FAO. 1990. Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China (Training Manual 6) prepared for the Gracilaria Culture and Seaweed Processing Training Course conducted by the Zhanjiang Fisheries College and organized by the Regional Seafarming Development and Demonstration Project (RAS/90/002). www.fao.org
- FAO. 2004. El estado mundial de la pesca y la acuicultura - Sofia 2004. Departamento de la pesca de la FAO. ISBN 92-5-305177-9. www.fao.org
- Friedlander M. and Dawes, C.J., 1985. In situ uptake of ammonium and phosphate and chemical composition of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae*. *J.Phycol.* 21, p: 448-45.
- Gracia Rodríguez, M.I. 1999. Utilización de Ulva como biofiltro en acuicultura. Estudio comparativo de la retención de compuestos nitrogenados. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Hafting J.T., 1999. Effect of tissue nitrogen and phosphorus quota on growth of *Porphyra yezoensis* blades in suspension cultures. *Hydrobiologia* 398/399: 305-314.
- Harrison, P.J. and Hurd, C.L. 2001. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cah.Biol.Mar.* 42, p : 71-82.
- IFREMER, <http://www.ifremer.fr>
- Lobban, C.S. and Harrison, P.J. 1997. Seaweed ecology and physiology. 2nd ed. Cambridge University Press. 366 pp.

- MAPA, 1998-2000. Fouling en un sistema de cultivo de peces marinos “off shore” e integración de un sistema de biofiltros con macroalgas (198-2000). Junta Asesora de Cultivoa Marinos (JACUMAR). Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. http://www.mapaya.es/jacumar/planes_nacionales/historico.asp
- Martínez-Aragón, J.F., Hernández, I., Pérez-Lloréns, J.L., Vázquez, R. and Vergara, J.J. 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste water 1. Phosphate. *J. Appl. Phycol.* 14, p: 365-374.
- Martínez M. and Rico J.M. 2004. Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 40, p: 642-650.
- Molina Domínguez L. 2005. Evaluación del impacto ambiental de la acuicultura. Material didáctico para el VI Master en acuicultura. Comunicación personal.
- Murphy, J. and Riley, J.P. 1962. A modified single solution approach for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27, p :31-36.
- Navarro-Angulo, L., Robledo, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia* 398/399, p:315-320.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigiel, M. and Yarish, C. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231 (1-4), p: 361-391.
- Nishihara, G.N., Terada, R. and Noro, T. 2005. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). *J. Appl. Phycol.* 17, p: 371-377.

- Otero Ferrer, F. 2001. Evolucion de un acuario de 400 m³ que reproduce un ecosistema coralino : seguimiento de parámetros fisicoquimicos y biologicos durante su fase de maduracion. Tesina de Master. Master Internacional en Acuicultura. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Perez, R., Kaas, R., Campello, F., Arbault, S. et Barbaroux, O. 1992. La culture des algues dans le monde. Edition IFREMER. 614 pp.
- Perez, R. 1997. Ces algues qui nous entourent : Conception actuelle, rôle dans la biosphere, utilisation, culture. Edition IFREMER. 272 pp.
- Pérez Pastor A. 2005. Evaluación del impacto ambiental de una instalación de acuicultura. Utilización de macroalgas marinas para la disminución de la contaminación por nutrientes. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Runcie, J.W., Ritchie, R.J. and Larkum, W.D. 2004. Uptake kinetics and assimilation of phosphorus by *Catenella nipae* and *Ulva rigida* can be used to indicate ambient phosphate availability. *J. Appl. Phycol.* 16, p: 181-194.
- Ryther, J.H., Goldman, J.C., Gifford, J.E., Huguenin, J.E., Wing, A.S., Clanes, J.P., Williams, L.D. and Lapointe, B.E. 1975. Physical models of integrated waste recycling-marine polyculture systems. *Aquaculture*. 5, p: 163-177.
- Smit, A.J., Robertson, B.L., Du Preez, D.R. 1997. Influence of ammonium –N pulse concentracions and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *J. Appl. Phycol*, p:8, 473-481.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N. and Yarish, C. 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*.