



**MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**  
VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canaria, España

2008-2010

**CULTIVO Y VALORACIÓN DE *HYDROPUNTIA CORNEA*  
(RHODOPHYTA) Y *ULVA RIGIDA* (CHLOROPHYTA) PARA  
LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL. DINÁMICA DE LA  
DISPONIBILIDAD DE AMONIO Y DE LAS CONDICIONES  
DE IRRADIACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE LA BIOMASA.**

RAYCO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE  
DEFENDIDA PARA LA OBTENCION  
DEL TITULO DE  
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria  
a 9 de Diciembre de 2010



## **MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA**

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

### **CULTIVO Y VALORACIÓN DE *HYDROPUNTIA CORNEA* (RHODOPHYTA) Y *ULVA RIGIDA* (CHLOROPHYTA) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL. DINÁMICA DE LA DISPONIBILIDAD DE AMONIO Y DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE LA BIOMASA.**

RAYCO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Trabajo realizado en el Centro de Biotecnología Marina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC); Islas Canarias, España, bajo la dirección del Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti.

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Diploma de Master of Science en Acuicultura otorgado por el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).

**Director:** Juan Luis Gomez Pinchetti      **Autor:** Rayco González González

## **Índice General**

Índice de figuras	3
Índice de tablas	4
Resumen	5
Abstract	6
Lista de Abreviaturas	7
1 Introducción	8
1.1 Sistemas integrados en Acuicultura (IMTA)	10
1.2 El cultivo intensivo de macroalgas	14
1.3 Valoración y aplicaciones de la biomasa	16
2 Objetivos	18
3 Materiales y Métodos	19
3.1 Especies, sistema y condiciones experimentales de cultivo	19
3.2 Determinación de la producción y la tasa de crecimiento	21
3.3 Biofiltración de amonio	22
3.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos	23
3.5 Determinación del rendimiento cuántico óptimo ( $F_v/F_m$ ) del PSII como indicador de estrés (medidas de fluorescencia de la clorofila)	24
3.6 Procesado de la biomasa	24
3.7 Extracción y valoración de lípidos totales y triglicéridos (TG)	24
3.8 Estudio comparativo con la biomasa del Proyecto Bifaro	26
3.9 Estadística	26
4 Resultados	27
4.1 Cultivo de <i>Hydropuntia cornea</i> y <i>Ulva rigida</i>	27
4.2 Capacidad de biofiltración de amonio	32
4.3 Dinámica de la concentración de pigmentos fotosintéticos	35
4.4 Rendimiento cuántico óptimo del PSII como indicador de estrés	38
4.5 Valoración del contenido en lípidos y triglicéridos (TG)	40
5 Discusión	47
6 Conclusiones	52
7 Bibliografía	54
Anexo-1	66

## Índice de figuras.

Figura 1 – Procesos asociados al cultivo de peces	9
Figura 2 – Diagrama esquemático del sistema de cultivo	20
Figura 3 – Influencia de la radiación sobre producción de <i>Hidropuntia cornea</i>	33
Figura 4 – Evolución de la concentración de los pigmentos	36
Figura 5 – Aspecto morfológico externo de <i>Hidropuntia cornea</i>	37
Figura 6 – Evolución del Rendimiento Cuántico Optimo del PSII (Fv/Fm)	39
Figura 7 – Evolución de lípidos totales en <i>Hidropuntia cornea</i>	41
Figura 8 – Evolución de lípidos totales en <i>Ulva rigida</i>	42
Figura 9 – Evolución de los triglicéridos en <i>Hidropuntia cornea</i>	44
Figura 10 – Evolución de los triglicéridos en <i>Ulva rigida</i>	45

## **Índice de tablas**

Tabla 1 – Revisión de sistemas integrados y uso de la biomasa.	12
Tabla 2 – Datos medios de producción de las especies cultivadas	30
Tabla 3 – Datos medios de la tasa de crecimiento de las especies cultivadas	31
Tabla 4 – Valores medios de eficiencia y tasa de eliminación de amonio	34
Tabla 5 – Estimaciones y valoración de rendimientos en lípidos y triglicéridos	46

## **Resumen**

Las macroalgas *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta) y *Ulva rigida* (Chlorophyta) fueron cultivadas en tanques de 90 L de manera intensiva; a escala de planta piloto en un sistema de biofiltración de aguas ricas en nutrientes (N-amonio y P-fosfato) y bajo diferentes condiciones de irradiación: (1) Exterior (outdoor) con radiación natural y, (2) bajo condiciones de invernadero (80% PAR + 10% UVA + 0% UVB), en las instalaciones de cultivo del Centro de Biotecnología Marina (Taliarte, Telde, Gran Canaria). En relación a los nutrientes, la dinámica de circulación establecida consistió en 2 semanas con agua de mar (limitación de nutrientes) y posteriormente 4 semanas bajo flujo continuo con aporte de nutrientes, N-amonio y P-fosfatos. Durante este periodo, se establecieron controles sólo con agua de mar. Bajo la combinación de los efectos de la irradiación y la dinámica de nutrientes, se determinaron los valores de producción y tasa de crecimiento, la capacidad de biofiltración de N-amonio (NUE y NUR) y el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) mediante fluorescencia de la clorofila del PSII, medida *in vivo* como indicador del estrés, además del contenido en los principales pigmentos fotosintéticos, clorofila y ficobiliproteínas. Con la biomasa obtenida, en los diferentes tratamientos durante el periodo experimental, se analizó el contenido en lípidos totales y triglicéridos (TG), con el objetivo de valorar la calidad de la biomasa como fuente de biodiesel. Una comparativa se realizó con muestras obtenidas en los desarrollos del Proyecto Bifaro, en los que la dinámica de cultivo fue invertida, 4 semanas con aporte de nutrientes y 2 semanas con agua de mar.

Los resultados, obtenidos de los diferentes tratamientos, revelan la fuerte interrelación entre los efectos de la irradiación y la dinámica de nutrientes sobre la producción (máximos superiores a  $30 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) y calidad de la biomasa recolectada en las unidades de biofiltración (p.e. NUE superiores al 50%). En cuanto a la producción de lípidos y triglicéridos, los cálculos de los rendimientos en las condiciones más favorables alcanzaron valores de  $1.7 \text{ g lípidos m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $6.4 \text{ t lípidos ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y  $0.7 \text{ g TG m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $2.4 \text{ t TG ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) para *Hydropuntia cornea* y  $1.2 \text{ g lípidos m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $4.3 \text{ t lípidos ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y  $0.6 \text{ g TG m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $2.1 \text{ t TG ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), calculados para *Ulva rigida*.

**Palabras clave:** amonio, biofiltración, cultivo en tanque, estrés, ficobiliproteínas, fluorescencia de la clorofila, *Hydropuntia cornea*, lípidos, triglicéridos, *Ulva rigida*

## **Abstract**

Macroalgae species *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta) and *Ulva rigida* (Chlorophyta) were intensively grown in 90 L tanks at a pilot scale, in a biofiltration unit supplied with water rich in nutrients and different light conditions: (1) outdoor (natural radiation) and (2) under greenhouse conditions (80% PAR + 10% UVA + 0% UVB), at the culture facilities of the Center of Marine Biotechnology (Taliarte, Telde, Gran Canaria). In relation to nutrients, water flow dynamic was established in 2 first weeks with tanks supplied with seawater (nutrients limited) and the next 4 weeks under a continuous flow of nutrients (N-ammonium and P-phosphate). Controls were tanks supplied only with seawater. Under these combined effects of light quality and nutrients supply dynamic, yield and growth rate, N-ammonium biofiltration capacity (NUE and NUR), maximum quantum yield (Fv/Fm) as stress indicator, and photosynthetic pigments content, chlorophyll and phycobiliproteins, were estimated. In addition, with biomass obtained under the different treatments, total lipids and tryglicerides (TG) were determined in order to evaluate macroalgal biomass as a source of biodiesel. A comparative analysis was carried out with samples obtained from the experimental set of the Project Bifaro, where cultures dynamic was inverted, 4 first weeks under nutrients supply and 2 next weeks only with seawater (nutrients limited).

Results obtained with the different treatments showed a strong relationship between light radiation and nutrients dynamic on the yield (maximum values higher than  $30 \text{ g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) and biomass quality harvested from the biofiltration system (i.e. NUE higher than 50%). In relation with total lipids and tryglicerides contents, yields calculated for the most favourable conditions reached values closed to  $1.7 \text{ g total lipids m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $6.4 \text{ t total lipids ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ) and  $0.7 \text{ g TG m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $2.4 \text{ t TG ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ) for *Hydropuntia cornea* and  $1.2 \text{ g total lipids m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $4.3 \text{ t total lipids ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ) and  $0.6 \text{ g TG m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $2.1 \text{ t TG ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ), calculated for *Ulva rigida*.

*Key words:* ammonium, biofiltration, tank culture, stress, phycobiliproteins, chlorophyll fluorescence, *Hydropuntia cornea*, lipids, tryglicerides, *Ulva rigida*

## **Lista de abreviaturas**

PAR –	Photosintetic Active Radiation
NUE –	Nitrogen uptake efficiency
NUR –	Nitrogen uptake rate
IMTA –	Integrated Multi-Trophic Aquaculture
Fv/Fm –	Índice estimador de la integridad del fotosistema II
PSII –	Fotosistema II
“cpt” –	Polietileno de alta densidad



## **1. Introducción**

En la actualidad, la producción de alimentos de origen acuático asciende a  $157 \cdot 10^6$  toneladas por año, aproximadamente un 2% de la producción mundial total de alimento, y supone alrededor del 16% del consumo humano de proteína (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009; Duarte *et al.*, 2009). En las últimas dos décadas las capturas de la pesca han ido disminuyendo progresivamente y muchos stocks han sido sobreexplotados, de tal forma que la oferta global de pescado per capita se ha visto igualmente disminuida aún cuando, y de acuerdo con datos globales, las capturas se mantienen dos veces por encima de los niveles considerados sostenibles (Duarte *et al.*, 2009).

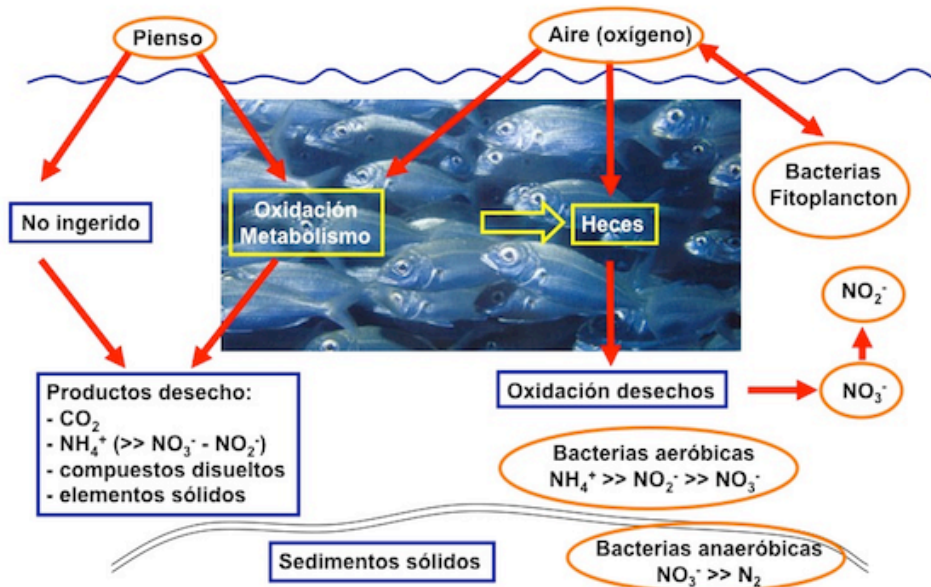
En contraste, la producción de la Acuicultura ha ido creciendo de forma constante a tasas que alcanzan duplicaciones por periodos de 10 años ( $> 7\%$  por año), en las últimas 5 décadas, generando el 39% de los alimentos de origen acuático (FAO, 2009). De entre estos productos, la producción de organismos marinos (o Maricultura) está dominada, datos en peso, por las algas (46.2%), seguidas por los bivalvos (42.9%), peces diádromos (5.3%), peces marinos (3.7%) y crustáceos (1.8%). En la última década, la producción de crustáceos ha mostrado el mayor crecimiento (23% por año), dos veces más que las peces diádromos (11.5%) y los peces marinos (10.5%), y casi cuatro veces más que los bivalvos (6.2%). De acuerdo con estos datos y la tendencia a que la producción de animales marinos siga aumentando, se estima que en los próximos 20 años ésta sobrepasará las capturas de la pesca, y en los siguientes 30 años excederá la producción de proteína animal terrestre (Duarte *et al.*, 2009).

Para mantener el ritmo de crecimiento de esta actividad de forma sostenible, será necesario resolver algunos aspectos que forman un importante “cuello de botella” principalmente relacionado con la disponibilidad, adecuación y coste del alimento (piensos); la introducción de enfermedades; el efecto de los escapes sobre la biodiversidad; la disponibilidad de espacios; y el aumento del impacto medioambiental negativo que genera (Buschmann *et al.*, 2008a; Duarte *et al.*, 2009; Troell *et al.*, 2009; Chávez-Crooker y Obreque-Contreras, 2010).

En relación a este último aspecto señalado, la generación y descarga al medio, desde las infraestructuras de producción intensivas y a gran escala, de

cantidades importantes de aguas residuales conteniendo tanto elementos inorgánicos disueltos como material particulado en forma de heces y alimento no ingerido, pueden causar importantes problemas de deterioro, tanto en la columna de agua como en los sedimentos, que generen complejos procesos de eutrofización (Buschmann *et al.*, 2008a; Chávez-Crooker y Obreque-Contreras, 2010).

Esta generación de residuos se produce a través de la entrada de alimento, como fuente de energía externa, del que aproximadamente el 25-30% es recuperado en forma de biomasa de los organismos cultivados. A través de la actividad metabólica que convierte el alimento en músculo, se generan productos de desecho, básicamente materia particulada y nutrientes disueltos (Fig. 1). En una granja de peces carnívoros bien gestionada, aproximadamente el 30% del alimento usado se convierte en desecho sólido particulado (Lupatsch y Kissil, 1998; Roque d'Orbcastel y Blancheton, 2006). Estos desechos, en forma de heces y alimento no ingerido, constituyen uno de los principales problemas en la gestión de los residuos generados. Los compuestos solubles producidos (disueltos) están básicamente constituidos por nitrógeno (N) y fósforo (P) en proporciones entre el 50 y el 70% del N y el 20% del P que forman parte del pienso ingerido y que son excretados principalmente en forma de amonio y ortofosfato (Lupatsch y Kissil, 1998; Roque d'Orbcastel y Blancheton, 2006).



**Figura. 1.-** Principales procesos metabólicos asociados al cultivo de peces y la generación de productos de desecho.

La preocupación por los efectos ambientales que este tipo de residuos puedan causar sobre el medio está actualmente asociada al desarrollo de procedimientos, ecológicamente bien equilibrados a todas las escalas y grados de intensificación posibles, que disminuyan los impactos negativos de una forma real y eficiente (Troell *et al.*, 2009). Esta aproximación pasa por la valoración de los residuos generados no como un producto final, sino como un elemento más en la integración de factores y componentes biológicos, físicos y químicos que permitan la diversificación de la producción de una forma sostenible (Chopin *et al.*, 2008; Troell *et al.*, 2009).

### 1.1 **Sistemas integrados en Acuicultura (IMTA)**

La canalización y conversión de los residuos generados en los sistemas de cultivo en biomasa extractiva a través de la combinación de rutas metabólicas, tanto heterotróficas como autotróficas, es el principio básico del término Acuicultura Multi-trófica Integrada (IMTA) (Chopin *et al.*, 2008; Neori, 2008; Troell *et al.*, 2009). En estos sistemas integrados (al igual que en los sistemas de recirculación, o simplemente en los sistemas de poli- o co-cultivo), diferentes organismos, desarrollando procesos diferenciados, son cultivados en el mismo espacio/flujo de agua y tiempo, y los desechos producidos por cada unidad independiente se convierten en un recurso aprovechable por el siguiente nivel trófico, estableciéndose un sistema de producción bien equilibrado (Chávez-Crooker y Obrique-Contreras, 2010).

Esta técnica utiliza múltiples especies de diferentes niveles tróficos: moluscos, equinodermos, macroalgas, microalgas o halófitas para reducir la descarga de residuos (particulados y disueltos) producidos en los niveles superiores (peces o crustáceos), aumentando así la productividad del sistema respecto a la entrada de alimento y la salida de contaminantes (Shpigel *et al.*, 1993; Neori *et al.*, 1998, 2000, 2004; Chow *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Troell *et al.*, 2003), asegurando así una mejor utilización de los recursos y la diversificación especies producidas en el sistema (Krom *et al.*, 1995; Troell *et al.*, 1997; Neori, 2008; Bunting y Shpigel, 2009).

Con las posibilidades descritas, los estudios realizados para el desarrollo de posibles combinaciones y la mejora de resultados han sido múltiples en los últimos

años (ver Tabla 1), demostrando cómo las aguas residuales producidas en sistemas intensivos, semi-intensivos y recientemente en jaulas en mar abierto (Buschmann *et al.*, 2008a; Chopin *et al.*, 2008) son una fuente interesante de nutrientes para otros niveles de la escala trófica reduciéndose, de este modo, la descarga de residuos en la columna de agua.

El papel que juegan las algas (micro- o macroalgas) en estos sistemas integrados se basa en el aprovechamiento, a través del proceso fotosintético, del exceso de nutrientes disueltos generados por los animales, principalmente N y P, además del CO<sub>2</sub> producido por el proceso respiratorio, convirtiéndolos en biomasa y O<sub>2</sub>. En general, plantas y algas (autótrofos) permiten el establecimiento de equilibrios con respecto a los animales o microbios (heterótrofos) en el sistema, no sólo en cuanto a los nutrientes se refiere sino también a parámetros como el O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y pH del medio. Además, muchas especies de algas muestran propiedades antimicrobianas por lo que son consideradas como beneficiosas para el sistema (Wang, 2003; Bansemir *et al.*, 2006).

Las macroalgas, particularmente, han sido descritas como auténticas “trampas” para los nutrientes disueltos en los sistemas IMTA. Diferentes géneros cultivables (*Ulva*, *Codium*, *Gracilariopsis*, *Gracilaria*, *Palmaria*, *Hypnea*, *Chondrus*, *Kappaphycus*, *Porphyra*, *Falkenbergia* y *Laminaria*) han sido ensayados con éxito como biofiltros eficaces para los efluentes con nutrientes disueltos, principalmente amonio, bajo factores y condiciones muy diferentes (Troell *et al.*, 2003) mostrando tasas de eliminación (efficiency) y asimilación (uptake) elevadas (Neori *et al.*, 2004). Sin embargo, la utilización de macroalgas como biofiltro ha estado centrada principalmente en esa capacidad para la eliminación de nutrientes disueltos, y no en el mercado potencial y su valor añadido como un organismo adicional producido en el sistema. Aún en los casos en los que la eficiencia de biofiltración de las macroalgas no es muy elevada y su valor de mercado bajo, la producción de algas puede ser utilizada para alimentar otras especies de alto valor añadido tales como el “abalón” y otras especies de moluscos y equinodermos (Schuenhoff *et al.*, 2003; Troell *et al.*, 2009).

**Tabla 1.-** Revisión de los sistemas integrados descritos en la literatura reciente, incluyendo las aplicaciones de la biomasa de algas producida.

<b>Especies Macroalga – Animal</b>	<b>Sistema</b>	<b>Resultados</b>	<b>Aplicación biomasa algas</b>	<b>Referencia</b>
<i>Gracilaria chilensis – Isacia conteptionis;</i> <i>Crassostrea gigas; Loxechinus albus</i>	Tanques	Altos niveles de biofiltración	Valoración agar	Chow <i>et al.</i> , 2001
<i>Gracilaria edulis – Penaeus japonicus;</i> <i>Saccostrea commercialis</i>	Tanques escala laboratorio	Alta biofiltración	Ninguna	Jones <i>et al.</i> , 2001
<i>Gracilaria edulis - Penaeus japonicus;</i> <i>Saccostrea commercialis</i>	Raceways con recirculación	Problemas sedimentación	Ninguna	Jones <i>et al.</i> , 2002
<i>Ulva rotundata; Enteromorpha intestinalis;</i> <i>Gracilaria gracilis – Dicentrarchus labrax</i>	Tanques	Altas tasas de asimilación de amonio	Ninguna	Hernández <i>et al.</i> , 2002
<i>Gracilaria parvispora – Chanos chanos</i>	Tanques	Alta producción	Ninguna	Nagler <i>et al.</i> , 2003
<i>Ulva lactuca – Abalone; seabream</i>	Tanques outdoor en cascada / recirculación parcial	Alta producción / alta biofiltración	Ninguna	Neori <i>et al.</i> , 2003
<i>Ulva rigida – Dicentrarchus labrax; Sparus aurata</i>	Tanques – Laguna	Biofiltración baja; crecimiento estacional	Ninguna	Porrello <i>et al.</i> , 2003a/b
<i>Ulva lactuca – Haliotis discus;</i> <i>Paracentrotus lividus; Sparus aurata</i>	Tanques outdoor en cascada / recirculación parcial	Alta producción / alta biofiltración / alta estabilidad del sistema	Alimento abalón y erizo	Schuenhoff <i>et al.</i> , 2003
<i>Palmaria mollis – Haliotis discus hannai</i>	Tanques – co-cultivo	Alta biofiltración – alto crecimiento	Alimento abalón	Demetropoulos y Langdon, 2004b
<i>Ulva rigida – No indicado</i>	En laboratorio / flujo continuo	Alta biofiltración	Ninguna	Bartoli <i>et al.</i> , 2005
<i>Porphyra spp. – Virtual</i>	Matraces escala laboratorio	Alta biofiltración en efluentes moderados	Ninguna	Carmona <i>et al.</i> , 2006
<i>Chondrus crispus; Gracilaria bursa pastoris;</i> <i>Palmaria palmata – Dicentrarchus labrax;</i> <i>Scophthalmus maximus</i>	Tanques outdoor; cascada	Alta biofiltración y crecimiento estacional	Adición piensos	Matos <i>et al.</i> , 2006
<i>Kappaphysuc alvarezii – Litopenaeus vannamei</i>	Co-cultivo en jaulas flotantes	Crecimiento normal	Ninguna	Lombardi <i>et al.</i> , 2006

Tabla 1.- Continuación: Especies	Sistema	Resultados	Aplicación	Referencia
<i>Gracilaria sp.</i> ; <i>Rizhopora sp.</i> (mangle) – <i>Crassostrea iredalei</i> ; <i>langostino</i>	Estanques	Alta biofiltración	Ninguna	Shimoda <i>et al.</i> , 2006
<i>Ulva pertusa</i> - <i>Apostichopus japonicus</i>	Sistema a escala comercial de recirculación en flujo discontinuo	Efectividad de eliminación de nitrógeno >60 %	Alimento para los adultos de erizo	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Ulva pertusa</i> - <i>Pagrus major</i>	Sistema de poli-cultivo integrado	Peces con mejor color	Procesada para alimento de peces	Hirata <i>et al.</i> , 2007
<i>Kappaphycus spp.</i> – <i>Chanos chanos</i>	Acuarios	Biofiltración media	Valoración carragenato	Rodrigueza y Montaña, 2007
<i>Codium fragile</i> – Virtual	Escala laboratorio	Alta biofiltración; estacional	Ninguna	Kang <i>et al.</i> , 2008
<i>Kappaphycus alvarezii</i> – <i>Trachinotus carolinus</i>	Tanques con recirculación	Alta biofiltración; baja tasa de crecimiento	Valoración carragenato	Hayashi <i>et al.</i> , 2008
<i>Ulva lactuca</i> - <i>Haliotis midae</i>	Sistema de recirculación	Optimizar tasa de recirculación	Alimento abalón	Robertson-Andersson <i>et al.</i> , 2008
<i>Porphyra yezoensis</i> – No indicado	Redes en mar abierto	Alta biofiltración y producción	Ninguno	He <i>et al.</i> , 2008
<i>Macrocystis</i> ; <i>Gracilaria</i> – <i>Salmón</i>	Lineas; mar abierto	Alta biofiltración; alto crecimiento	Alimento abalón	Buschmann <i>et al.</i> , 2008b
<i>Ulva clathrata</i> – No indicado	A escala piloto; flujo de agua (continuo y estacionario)	Buena candidata; ciclo vital corto	Ninguno	Copertino <i>et al.</i> , 2009
<i>Gracilaria caudata</i> - <i>Litopenaeus vabbamei</i>	Laguna, cajas y redes	Biofiltración media; crecimiento bajo	Ninguno	Marinho-Soriano <i>et al.</i> , 2009
<i>Gracilaria lemaneiformis</i> - <i>Chlamys farreri</i>	Sistema de acuicultura multi-trófica integrada	Biofiltración y producción de biomasa	Uso no especificado; valoración de agar	Mao <i>et al.</i> , 2009
<i>Asparagopsis armata</i> ; <i>Ulva rigida</i> – No indicado	Tanques	Alta biofiltración amonio; altas producciones	Ninguno	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Ulva clathrata</i> – <i>Litopenaeus vabbamei</i>	Tanques outdoor – co-cultivo	Beneficio crecimiento langostinos	Ninguno	Cruz-Suárez <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilaria</i> ; <i>Laminaria</i> - <i>Lateolabra japonicus</i> ; <i>Pseudosciaena crocea</i>	Jaulas flotantes	Estrategia biorremediación	Biorremediación	Jiang <i>et al.</i> , 2010

## 1.2 El cultivo intensivo de macroalgas

La evolución del cultivo comercial de macroalgas tiene una larga historia (Duarte *et al.*, 2009). En la actualidad existen aproximadamente 200 especies de macroalgas que se aprovechan industrialmente (Zemke-White y Ohno, 1999), de las cuales 10 géneros son cultivados de forma importante siendo los principales: *Laminaria*, *Undaria*, *Porphyra*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Monostroma* y *Enteromorpha* (Lüning y Pang, 2003). La demostración de los beneficios de su consumo, el potencial de producción y los nuevos usos y productos obtenidos de las algas han ayudado al aumento del esfuerzo investigador alrededor del desarrollo de los sistemas de cultivo y las posibilidades de aumentar el número de especies cultivables.

El cultivo de macroalgas libre (no-fijado a un sustrato) y “outdoor” (bajo condiciones de radiación natural) puede ser dividido principalmente en semi-intensivo, llevado a cabo en estanques y lagunas sin control efectivo; e intensivo, en tanques fabricados en cemento (raceways), fibra o plásticos de diferentes escalas (volúmenes y superficies) donde se puede establecer un sistema de agitación del medio (y la biomasa) y un alto grado de control y mecanización. En estos últimos, las producciones por unidad de superficie cultivada son mayores que en los estanques semi-intensivos (Friedlander y Levy, 1995). La principal desventaja del desarrollo de los sistemas intensivos es su alto coste, en comparación con otros métodos de cultivo (p.e. cultivo en mar abierto) debido a los elevados costes de bombeo de agua, agitación del medio y en ocasiones el enriquecimiento extra de CO<sub>2</sub>.

El control de variables físicas, químicas y biológicas, y sus inter-relaciones en los sistemas de cultivo intensivo de macroalgas, han sido ampliamente estudiados a través del desarrollo hasta la escala comercial del cultivo de especies de interés industrial, principalmente de los géneros *Gracilaria* y *Chondrus* (Bidwell *et al.*, 1985; Friedlander y Levy, 1995; Braud, 2006). La importancia de factores como el diseño del tanque, el bombeo y movimiento/agitación del agua/medio de cultivo, la irradiación, la temperatura, el aporte de nutrientes, el carbono inorgánico y su efecto sobre el pH del medio, la densidad (óptima y máxima) y la competición de especies (crecimiento de epifitos) muestran un efecto directo sobre el principal proceso fisiológico de las algas, la fotosíntesis, y por lo tanto, sobre los valores

máximos de producción ( $\text{g Peso Seco m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) y eficiencia del sistema (% conversión de energía luminosa en biomasa). A mayor control de estas variables, mayor posibilidad de incrementar la producción y modificar la calidad de la biomasa obtenida (Friedlander y Levy, 1995).

Los beneficios de la incorporación de los sistemas de cultivo de macroalgas, en el desarrollo de los ya comentados sistemas multi-tróficos integrados, no están únicamente relacionados con la posibilidad de disminuir los desechos producidos que puedan causar problemas de eutrofización (y sus aspectos ecológicos relacionados). La posibilidad de cultivar peces con algas y otros organismos marinos disminuiría los costes, permitiendo la producción de dos o más organismos en un solo sistema y así, considerando algunos de los factores descritos anteriormente como el flujo y aporte de nutrientes y  $\text{CO}_2$ , aumentar los rendimientos de la producción (Neori *et al.*, 1991; Buschmann *et al.*, 2001; Demetropoulos y Langdon, 2004a).

Para poder interpretar, los resultados obtenidos en los sistemas de cultivo y biofiltración con algas, conceptos como la eficiencia de asimilación de nutrientes y la tasa de asimilación de nutrientes deben ser bien entendidos (Buschmann *et al.*, 2001). La eficiencia de asimilación de un nutriente, p.e. nitrógeno (NUE), se define como la reducción media (%) en la concentración del nutriente, mientras que la tasa de asimilación (NUR) es la cantidad de un nutriente asimilada/eliminada por unidad de tiempo. Ambos conceptos varían dependiendo de las condiciones ambientales que afecten al sistema de cultivo en un periodo determinado, pero también de variables de cultivo como la profundidad del tanque, la densidad de inoculación o la tasa de renovación del medio. Jiménez del Rio *et al.* (1994) encontraron que la eficiencia de asimilación de nitrógeno disuelto (NUE) en un biofiltro de *Ulva* estaba inversamente relacionada con la tasa de renovación del medio y directamente relacionada con la densidad de inoculación del alga en los tanques de cultivo. Además, demostraron como la tasa de asimilación de nitrógeno (NUR) estaba directamente relacionada con ambas, el flujo de agua y la densidad del alga. Estos principios son importantes a la hora de establecer los objetivos; si la idea es obtener descargas de aguas limpias, la eficiencia de eliminación es un buen indicador, pero si el objetivo es aumentar la producción de biomasa dando como resultado una menor reducción de los nutrientes, la tasa de asimilación/eliminación es el parámetro a controlar (Buschmann *et al.*, 2001).



Todas estas consideraciones y variables que intervienen e influyen directamente sobre el crecimiento de las macroalgas en los sistemas de cultivo intensivos, incluyendo los biofiltros, también pueden alterar las características fisiológicas de la biomasa y causar situaciones de estrés que pueden limitar la producción del sistema (Figuerola *et al.*, 2006). La determinación de la actividad fotosintética es uno de los parámetros controlables y monitorizables más utilizados en el estudio de las situaciones y causas de estrés. Una de las determinaciones de la actividad fotosintética más utilizadas, por ser una técnica no-intrusiva y rápida, es la medida *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila asociada al PSII. Recientemente esta técnica ha sido utilizada y recomendada para la determinación de estrés, la caracterización fisiológica y los procesos de degradación en macroalgas cultivadas en aguas residuales provenientes de tanques de peces (Figuerola *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2006).

### 1.3 **Valoración y aplicaciones de la biomasa**

En las últimas décadas, la producción mundial de macroalgas ha estado dirigida, en su mayor parte, al consumo humano y la industria de los ficocoloides (agar, carragenatos y alginatos) (Zemke-White y Ohno, 1999). Otras aplicaciones de importancia industrial con relevancia son la obtención de fertilizantes agrícolas, el consumo animal o, más recientemente, los mercados de la cosmética y la talasoterapia (McHugh, 2003). Con un mercado menor, pero potencialmente muy interesante, la obtención de metabolitos con actividad biológica, farmacológica, medicinal o biotecnológica de las algas en general, y de las macroalgas en particular, ha aumentado significativamente (Smit, 2004; Dhargalkar y Pereira, 2005; Cardozo *et al.*, 2007). Entre estas sustancias se encuentran como ejemplos representativos: pigmentos (ficobiliproteínas y carotenoides), polisacáridos sulfatados, compuestos halogenados, sustancias “antifouling”, lectinas, fucoidanos y sustancias con actividad antioxidante.

En el escenario actual en el que aumenta el interés por el aprovechamiento de biomasa para la producción alternativa de biocarburantes, las algas se encuentran en el punto de mira por diversos motivos, entre los que se encuentran: la nula competición por terreno para el cultivo de especies terrestres y la capacidad para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> a través del proceso fotosintético. La eficiencia

fotosintética de los vegetales marinos se encuentra alrededor del 6-8%, valores mayores a los estimados para vegetales terrestres (1.8-2.2%), y teniendo en cuenta su composición bioquímica, la biomasa de micro- y macroalgas puede ser considerada seriamente para la conversión de energía solar y la producción de biocarburantes (Aresta *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2008; Goh y Lee, 2010), añadiendo así una aplicación potencial con interés añadido a la producción de biomasa de macroalgas en los sistemas integrados.

Aunque fisiológicamente el metabolismo del carbono y su relación con la producción de polisacáridos, lípidos y ácidos grasos en macroalgas han sido ampliamente estudiados, no existe demasiada información sobre la producción de biodiesel, al contrario de lo que sucede con las microalgas (Chisti, 2007), probablemente debido a las bajas concentraciones de lípidos, frente a las altas de polisacáridos, encontradas en macroalgas (Rupérez y Saura-Calixto, 2001). El biodiesel es una mezcla de ésteres mono-alquilo de ácidos grasos de cadena larga obtenidos por un proceso de transesterificación a partir de lípidos neutros de almacenamiento (triglicéridos). El porcentaje de triglicéridos en especies de los diferentes géneros cultivables, p.e. *Ulva*, es predominante en altas condiciones de irradiación y disminuye bajo intensidades más bajas, sugiriendo que los cambios en la composición de lípidos puede ser un mecanismo de adaptación y supervivencia a diferentes condiciones de radiación (Khotimchenko y Yakovleva, 2004). Paralelamente, la composición bioquímica de *Ulva rigida*, incluyendo la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos, se ve afectada de forma directa por la dinámica del aporte de nutrientes, particularmente nitrógeno (Gómez Pinchetti *et al.*, 1998; Gordillo *et al.*, 2001), lo que probablemente afectaría el rendimiento en la producción de biodiesel a partir de este tipo de biomasa.

Teniendo en cuenta que en los últimos años, algunos de los proyectos desarrollados en nuestro Centro han estado orientados al efecto que la dinámica del aporte de nutrientes (principalmente N-amonio y P-fosfato y su relación con el metabolismo del carbono) y otros parámetros tienen sobre la biomasa cultivada de forma intensiva y algunos de sus productos, p.e. polisacáridos o aminoácidos tipo micosporina (MAA's); la valoración de lípidos y sus componentes (p.e. triglicéridos y ácidos grasos) y la posibilidad de su modificación a través de los cambios en las condiciones de cultivo, fueron considerados como un objetivo interesante a la hora de plantear el presente trabajo.

## **2. Objetivos**

De acuerdo con los antecedentes expuestos, los objetivos planteados en el presente trabajo fueron:

- 1.- Determinar la producción y el crecimiento de dos especies de macroalgas: *Ulva rigida* (Chlorophyta) e *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta).
- 2.- Comparar las diferentes condiciones establecidas sobre la capacidad de biofiltración de N-amonio de las dos especies estudiadas.
- 3.- Evaluar la capacidad fotosintética (nivel de estrés) utilizando medidas *in vivo* de fluorescencia de la clorofila.
- 4.- Valorar y cuantificar el contenido en lípidos totales y triglicéridos para la obtención de biodiesel.

### **3. Material y Métodos**

#### **3.1 Especies, sistema y condiciones experimentales de cultivo**

Las dos especies utilizadas en este estudio fueron *Ulva rigida* C. Agardh (Ulvaceae; Chlorophyta) e *Hydropuntia cornea* (J. Agardh) M.J. Wynne (Gracilariaceae; Rhodophyta), anteriormente descrita como *Gracilaria cornea*.

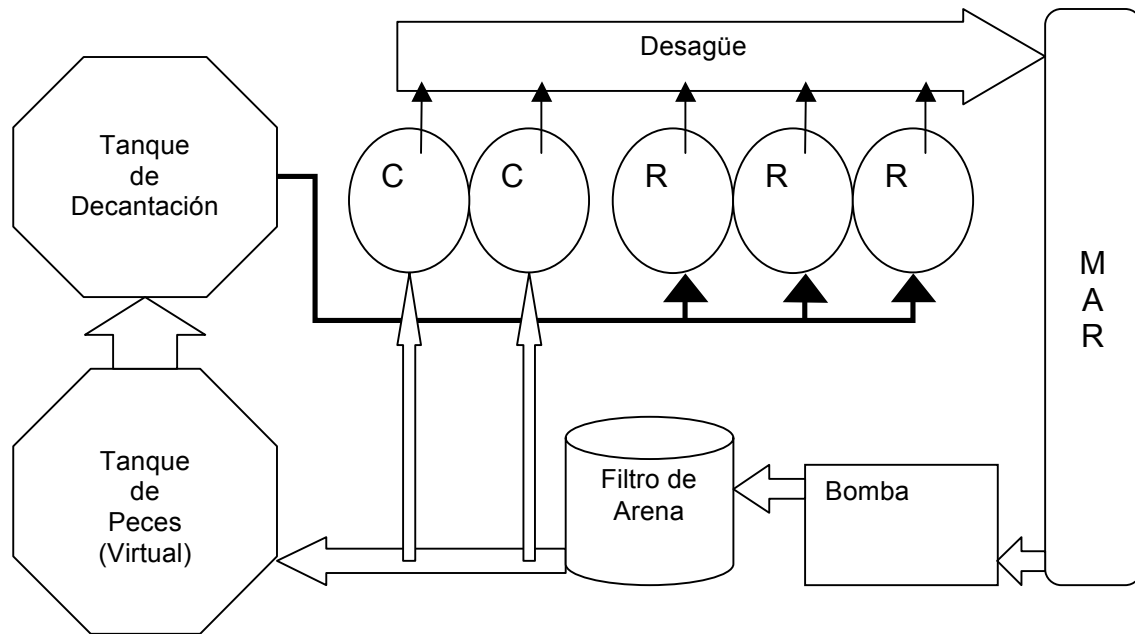
*Ulva rigida* es un alga verde (*Phylum Chlorophyta*) perteneciente a la familia *Ulvaceae* dentro del orden *Ulvales* con las siguientes características: un talo laminar, con dos capas de células (distromáticos), que esta irregularmente lobulado y presenta en el margen dientes microscópicos. Las células presentan de 2 a 3 (4) pirenoides, además las células basales; justo por encima de la región rizoidal; son rectangulares (2-4 veces mas altas que anchas).

*Hydropuntia cornea* es un alga roja (*Phylum Rhodophyta*) perteneciente a la familia *Gracilariaceae* dentro del orden *Gracilariales* con las siguientes características: talo pseudoparenquimatoso multiaxial cuyo corte transversal es cilíndrico y su ramificación es irregular y/o alterna (nunca es dicótoma). Las células se distribuyen en dos zonas claramente diferenciadas, una interior (médula), con células relativamente más grandes, y una exterior (córtez) donde se observan células más pequeñas y con gran cantidad de cloroplastos.

Los cultivos originales han sido mantenidos, creciendo de forma vegetativa, en los sistemas de cultivo intensivo del Centro de Biotecnología Marina (ULPGC) durante los últimos años.

El diseño experimental desarrollado (Fig. 2; Anexo 1) incorpora un modelo en el que se determinan los trasvases de nutrientes contenidos en las aguas residuales provenientes de tanques para el cultivo intensivo de dorada (*Sparus aurata*), principalmente nitrógeno y fósforo disueltos en forma de amonio y fosfato respectivamente y la calidad de los efluentes obtenida después de su paso en flujo continuo a través de los tanques para el cultivo intensivo de macroalgas.

El agua de mar se obtiene mediante bombeo directo del mar y se dirige a los tanques de peces previo paso por un sistema de filtros de arena.



**Figura. 2.-** Diagrama esquemático del sistema de cultivo experimental indicando los flujos de agua y nutrientes, utilizado paralelamente dentro y fuera del invernadero. C: tanques control; R: tanques con aporte de nutrientes a partir de la semana 3. Las flechas indican la dirección del flujo de agua.

Los efluentes son bombeados desde 2 tanques de  $11 \text{ m}^3$  con una densidad óptima de peces de  $20 \text{ Kg m}^{-3}$  y tasas de renovación de agua entre  $6 - 8 \text{ vol d}^{-1}$ . Después de su paso por un tanque de decantación para la separación de la materia particulada, el agua es bombeada directamente a los tanques de macroalgas que actúan como biofiltro (Fig. 2).

Durante los periodos en los que no hay posibilidad de mantener peces de forma continuada, se establece un “modelo virtual” (de acuerdo a los modelos descritos por: Porter *et al.*, 1987; Losordo y Westers, 1994), en el que a partir de una solución concentrada de cloruro de amonio y fosfato de potasio se realiza un aporte con concentraciones y flujos controlados, para simular la presencia de peces a una densidad de  $20 \text{ Kg m}^{-3}$ , a partir del tanque de decantación previo al bombeo hacia el biofiltro.

Para el presente trabajo, el sistema de biofiltración y cultivo de macroalgas fue organizado con tanques circulares de cultivo, contruidos de polietileno de alta densidad (Allibert Mantenición, Barcelona), con un volumen de  $90 \text{ l}$  ( $0,09 \text{ m}^3$ ) y una superficie aérea de  $0,2 \text{ m}^2$  ( $S:V = 2,2 \text{ m}^{-1}$ ) (Anexo 1). La aireación (bombas ELMO model 2BH 1600, Siemens, Alemania) para la rotación de la biomasa es

suministrada a través de un tubo de polietileno lineal situado en el fondo del tanque. El flujo abierto de agua se mantiene a través de un desagüe situado en la parte superior del tanque y cubierto con una malla para evitar el escape de algas.

Dos condiciones “outdoor” fueron establecidas para dos juegos de cinco tanques cada uno; (1) bajo radiación natural (100% PAR + UVR) y (2) bajo condiciones de invernadero (80% PAR, 10% UVA, 0% UVB). Los datos de irradiación ( $W\ m^{-2}$ ) fueron obtenidos de forma permanente con un radiómetro ELDONET (Real Time Computer, Erlangen, Alemania). Este radiómetro toma lecturas en tres canales (PAR, 400-700 nm; UV-A, 315-400 nm; UV-B, 280-315 nm) a intervalos de 1 seg., y almacena los datos a través del software WinDose 2000, que calcula la dosis diaria acumulada. A partir de estos valores se calcularon las dosis PAR medias semanales ( $kJ\ m^{-2}\ d^{-1}$ ).

El periodo de cultivo para cada especie fue establecido en 6 semanas de duración; *Hydropuntia cornea* durante el periodo comprendido entre el 6 de julio y el 17 de agosto de 2009 y *Ulva rigida* entre el 17 de agosto y el 28 de septiembre de 2009. Durante las dos primeras semanas, los tanques fueron llenados con agua de mar, sin adición extra de nutrientes, en flujo abierto con una tasa de renovación de 20 vol.  $d^{-1}$  ( $1,25\ l\ min^{-1}$ ). Las siguientes cuatro semanas se mantuvieron dos tanques en las mismas condiciones (control) y otros tres tanques fueron mantenidos con agua proveniente del tanque de decantación, enriquecida con N-amonio y P-fosfato, en las mismas condiciones. La tasa de renovación fue regulada diariamente.

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

### 3.2 Determinación de la producción y la tasa de crecimiento

De forma general, los tanques fueron cosechados semanalmente y la biomasa ajustada a las densidades volumétricas óptimas, determinadas previamente, para los tanques utilizados;  $13\ g\ l^{-1}$  para *Hydropuntia cornea* y  $10\ g\ l^{-1}$  para *Ulva rigida*. Después de escurrir la biomasa cosechada para la obtención del peso fresco escurrido (PF) la Producción fue calculada de acuerdo a DeBoer y Ryther (1977):

$$P \text{ (g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = [(P_t - P_0) / t] * (PS/PF) / A$$

donde:

$P_t - P_0$ ; excedente en gramos de PF, a los  $t$  días

PS/PF; relación peso seco / peso fresco escurrido

A = Area superficial del tanque de cultivo en  $m^2$

Las relaciones PS/PF fueron determinadas para cada especie con muestras secadas en la estufa a  $90^\circ\text{C}$  hasta obtener el peso constante (0,12 y 0,21 para *H. cornea* y *U. rigida*, respectivamente).

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

$$\mu \text{ (% d}^{-1}) = 100 * \text{Ln} (P_t / P_0) / t$$

donde:

$P_t$ ; peso fresco de la biomasa alcanzada en  $t$  días

$P_0$ ; peso fresco de la biomasa inicial

### 3.3 Biofiltración de amonio

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

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

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

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

donde:

Q = flujo de agua ( $l\ h^{-1}$ ),

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

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

A = superficie del tanque ( $m^2$ ).

### 3.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de pigmentos, muestras de 2 g fueron recolectadas de cada tanque de cultivo y congeladas a  $-20^{\circ}C$ . Para el análisis de pigmentos, muestras de 1 g fueron homogeneizadas.

Para la determinación de **clorofila a** la muestra fue homogeneizada en 4 ml de metanol. Después de centrifugar, la concentración de pigmentos fue cuantificada de acuerdo con la ecuación (Wellburn, 1994):

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

Para la determinación de **ficobiliproteínas** (ficoeritrina y ficocianina), 1 g de muestra fue homogeneizado en 4 ml de tampón fosfato (0,1 M; pH 6.0). Después de centrifugar a 9.000 rpm durante 5 min a  $15^{\circ}C$ , el extracto obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (Shimadzu UV-160) de acuerdo con las ecuaciones de Beer y Eshel (1985):

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

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

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Para posteriores comparaciones, los datos obtenidos fueron normalizados a valores de peso seco,  $mg\ mg^{-1}\ PS$  o  $\mu g\ mg^{-1}\ PS$ .



### 3.5 Determinación del rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) del PSII como indicador de estrés (medidas de fluorescencia de la clorofila)

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

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

donde  $F_0$ , es el nivel mínimo de fluorescencia  
 $F_m$ , es el nivel de fluorescencia máximo en un pulso de saturación  
 $F_v$ , es la fluorescencia variable  
PSII, fotosistema II

Para ello las algas fueron adaptadas a la oscuridad durante un tiempo de 15 min. antes de aplicar un pulso de luz de 2.000  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (100% de saturación) durante un intervalo de 5 s. Las medidas fueron tomadas por triplicado, al menos una vez cada semana, durante el periodo experimental.

### 3.6 Procesado de la biomasa

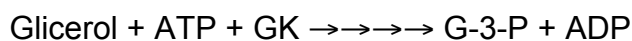
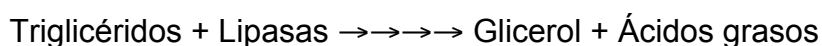
Los excedentes de la producción semanal fueron envasados y congelados a -20 °C antes de ser secados por liofilización (Freezone 6L, Labconco, USA). Las muestras secas fueron envasadas al vacío y almacenadas en oscuridad hasta el momento de su análisis.

### 3.7 Extracción y valoración de lípidos totales y triglicéridos (TG)

Los lípidos totales de las muestras seleccionadas fueron extraídos por el método de Folch (Folch et al., 1957) y cuantificados gravimétricamente. Con el objetivo de eliminar sales, las muestras fueron tamizadas durante 15 min., 1 g de muestra fue extraído con cloroformo:metanol (2:1) en una proporción de 30 ml  $\text{g}^{-1}$  PS. Para evitar la degradación oxidativa durante la extracción, se añadió BHT

(butylated hydroxytoluene) en una proporción del 0.01%. La extracción se realizó en un baño termostático ajustado a 30 °C, durante un periodo de 1h. Después de filtrar a través de papel de filtro y obtener la fracción I, se realizó una segunda extracción en las mismas condiciones (fracción II). Las dos fracciones fueron mezcladas antes de añadir KCl (0.88% en agua) en una proporción 1:4 (v/v). Después de agitar vigorosamente y una vez separadas las fases, la fracción lipídica fue evaporada completamente en un rotavapor (Buchi) a 35°C. Los lípidos fueron pesados en una balanza de precisión. Los análisis fueron realizados por triplicado y los datos expresados en mg g<sup>-1</sup> PS o porcentaje (%).

Las muestras de lípidos fueron resuspendidas en isopropanol y almacenadas a -20°C. Para la cuantificación del contenido en triglicéridos (TG) se utilizó el reactivo para triglicéridos Ref. AE2-24 (Alfa Wassermann, NL). El método se basa en una reacción enzimática que da como resultado la formación de peróxido de hidrógeno que es determinado colorimétricamente a 505 nm. El principio se resume en las siguientes reacciones:



donde: ATP = Adenosina-5'-trifosfato

ADP = Adenosina-5'-difosfato

GK = Glicerol kinasa

G-3-P = Glicerol-3-fosfato

GPO = Glicerol-3-fosfato oxidasa

POD = Peroxidasa

500 µl de reactivo fueron añadidos a 10 µl de muestra en tubos de vidrio y la mezcla fue incubada a 37°C durante 10 min. Después de obtener los valores de absorbancia a 505 nm, la concentración de triglicéridos fue determinada a partir de una curva estándar de trioleína (Supelco).

Combinando los datos de los contenidos en lípidos totales y triglicéridos obtenidos y las producciones máximas medias de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* se estimaron los rendimientos en la producción de lípidos y triglicéridos del sistema ensayado.

### 3.8 Estudio comparativo con la biomasa del Proyecto Bifaro

Paralelamente a los análisis de lípidos y TG, se llevó a cabo un estudio comparativo con la biomasa obtenida en los desarrollos experimentales del Proyecto Bifaro, que consistió en cultivo y estudio de varias especies presentes en Canarias para comprobar las moléculas con actividad antioxidante presentes. En el mismo sistema de cultivo descrito, *Ulva rigida* (septiembre – diciembre, 2006) e *Hydropuntia cornea* (junio – agosto, 2007) fueron cultivadas con el mismo diseño experimental pero aplicando la dinámica inversa, es decir, las algas fueron cultivadas durante 4 semanas, con aporte de N-amonio y posteriormente 2 semanas, en agua de mar sin aporte de nitrógeno. Los controles fueron algas cultivadas durante el periodo completo sin aporte de nitrógeno.

### 3.9 Estadística

Los datos obtenidos de los diferentes procesos fueron almacenados en hojas de Microsoft Office Excel 2003, además se introdujeron en Sigmaplot v.10.0 Sisoft Software, ink. 2006., para su posterior tratamiento estadístico y gráfico. El tratamiento estadístico consistió en un ANOVA de dos vías (Tanque y Tratamiento) además se realizaron comparaciones de la Media mediante la prueba T-students para comparación entre muestras del exterior y del interior.

## **4. Resultados**

### **4.1 Cultivo de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida***

Los datos medios de producción y tasa de crecimiento semanales, durante el periodo experimental de cada una de las especies y bajo las condiciones de cultivo establecidas, son mostrados en las tablas 2 y 3 respectivamente. Comparativamente, los máximos valores de producción y tasa de crecimiento fueron alcanzados con *Hydropuntia cornea* en condiciones de aporte de nutrientes exterior frente a los mayores obtenidos con *Ulva rigida* correspondientes a los tanques sin aporte de nutrientes interiores, que superaron los valores medios obtenidos bajo estas condiciones con *H. cornea* (tabla 2).

Para *Hydropuntia cornea*, los datos medios durante las dos semanas iniciales y para los tanques control durante las cuatro semanas posteriores fueron aproximadamente la mitad, tanto en producción como en tasa de crecimiento, en comparación a los valores obtenidos para los tanques enriquecidos con nutrientes durante las cuatro semanas posteriores. El mayor valor medio de producción fue obtenido en las condiciones de aporte de nutrientes y bajo radiación natural,  $58.4 \pm 19.8 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $213 \pm 72 \text{ t PS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) (tabla 2). Los valores fueron mayores para los tanques situados en el exterior bajo radiación natural que los situados bajo condiciones de invernadero (80% PAR), alcanzándose valores de producción máximos de  $94.3 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $9.3 \% \text{ d}^{-1}$ ) frente a los  $63.4 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $6.9 \% \text{ d}^{-1}$ ) máximos obtenidos en los tanques interiores. Los menores valores de producción ( $18.8 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) durante el periodo experimental fueron obtenidos en los tanques sin aporte de nutrientes bajo condiciones de invernadero.

La temperatura media del agua durante el periodo de cultivo de *H. cornea* (6 de julio – 17 de agosto de 2009) varió entre  $25.2 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $27.3 \pm 2.8 \text{ }^\circ\text{C}$ , con valores medios de  $25.4 \pm 0.9 \text{ }^\circ\text{C}$  en los tanques exteriores y  $26.1 \pm 0.9 \text{ }^\circ\text{C}$  en los del interior del invernadero. Los datos de radiación PAR diaria en términos de energía (Dosis PAR diaria acumulada), medidos en el exterior al invernadero durante el periodo experimental, alcanzaron valores de  $15112 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (8 de julio de 2009), siendo el mínimo de  $7294 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (16 de julio). Las medias integradas semanalmente fueron disminuyendo desde  $14469 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (semana 1) a  $12250 \text{ kJ}$

$\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (semana 6) alcanzándose una dosis mínima semanal de  $12143 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  la semana 2 del experimento. Para el interior del invernadero, los datos de irradiación calculados como el 80% de la radiación PAR exterior, alcanzaron los  $12090 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , variando las medias semanales desde  $11575$  a  $9800 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  y alcanzándose un mínimo de  $9714$  la semana 2.

Para *Ulva rigida*, los datos medios durante las dos semanas iniciales y para los tanques control durante las cuatro semanas posteriores fueron mayores, tanto en producción como en tasa de crecimiento, hasta 3 veces en comparación a los valores obtenidos para los tanques enriquecidos con nutrientes durante las cuatro semanas posteriores (Tabla 2). Este hecho estuvo relacionado con procesos de esporulación en el periodo de luna llena y afectó en mayor medida a los tanques con aporte de nutrientes. El mayor valor medio de producción fue obtenido en las condiciones sin aporte de nutrientes (SW) y bajo condiciones de invernadero,  $39.1 \pm 18.0 \text{ g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$  ( $143 \pm 66 \text{ t PS ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ ). Los valores fueron mayores para los tanques situados en el interior del invernadero que los situados bajo condiciones de radiación natural, alcanzándose valores de producción máximos de  $75.0 \text{ g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$  ( $6.3 \% \text{d}^{-1}$ ) frente a los  $52.5 \text{ g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$  ( $4.7 \% \text{d}^{-1}$ ) máximos obtenidos en los tanques exteriores. Los menores valores de producción ( $9.0 \text{ g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) durante el periodo experimental fueron obtenidos en los tanques con aporte de nutrientes bajo condiciones de invernadero.

La temperatura media del agua durante el periodo de cultivo de *U. rigida* (17 de agosto – 28 de septiembre de 2009) varió entre  $24.0 \pm 2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $26.5 \pm 3.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , con valores medios de  $24.8 \pm 0.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en los tanques exteriores y de  $25.9 \pm 0.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en los del interior del invernadero. Los datos de radiación PAR diaria en términos de energía, medidos en el exterior al invernadero durante el periodo experimental, alcanzaron valores de  $13411 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (6 de septiembre de 2009), siendo el mínimo de  $3243 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (20 de septiembre). Las medias integradas semanalmente fueron disminuyendo desde  $12100 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (semana 1) a  $10248 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (semana 6) alcanzándose una dosis mínima semanal de  $8197 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  la semana 5 del experimento. Para el interior del invernadero, los datos de irradiación del periodo, alcanzaron los  $10729 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , variando las medias semanales desde  $9680$  a  $8198 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  alcanzándose una dosis mínima semanal de  $6558 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  la semana 5.

La incidencia de epífitos para las dos especies ensayadas, *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* fue nula en los tratamientos con agua de mar y muy escasa en los tratamientos con aporte de nutrientes.

**Tabla 2.-** Datos medios (media  $\pm$  sd;  $n \geq 9$ ) de producción (g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) de las especies cultivadas en tanques “cpt” (90 l) bajo las diferentes condiciones ensayadas; Interior: bajo invernadero, Exterior: irradiación natural. R: Rhodophyta, C: Chlorophyta.

Especie (Division)	Periodo experimental	Producción (g PS m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )			
		Interior		Exterior	
		Sin N/P <sup>(1)</sup>	Con N/P <sup>(2)</sup>	Sin N/P <sup>(1)</sup>	Con N/P <sup>(2)</sup>
<i>Hydropuntia cornea</i> (R)	Jul – Ago 09	26.1 $\pm$ 7.4	49.3 $\pm$ 14.1	23.3 $\pm$ 6.1	58.4 $\pm$ 19.8
<i>Ulva rigida</i> (C)	Ago – Sep 09	39.1 $\pm$ 18.0	13.7 $\pm$ 6.0	38.5 $\pm$ 9.7	22.2 $\pm$ 8.1

<sup>(1)</sup> Sin aporte de nitrógeno y fósforo (SW) durante un periodo de 2 semanas

<sup>(2)</sup> Con aporte de nitrógeno y fósforo durante las 4 semanas posteriores

**Tabla 3.-** Datos medios (media  $\pm$  sd;  $n \geq 9$ ) de tasa de crecimiento ( $\% d^{-1}$ ) de las especies cultivadas en tanques “cpt” (90 l) bajo las diferentes condiciones ensayadas; Interior: bajo invernadero, Exterior: irradiación natural. R: Rhodophyta, C: Chlorophyta.

Especie (Division)	Periodo experimental	Tasa de crecimiento ( $\% d^{-1}$ )			
		Interior		Exterior	
		Sin N/P <sup>(1)</sup>	Con N/P <sup>(2)</sup>	Sin N/P <sup>(1)</sup>	Con N/P <sup>(2)</sup>
<i>Hydropuntia cornea</i> (R)	Jul – Ago 09	3.2 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 1.3	3.0 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 2.1
<i>Ulva rigida</i> (C)	Ago – Sep 09	3.4 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.5

<sup>(1)</sup> Sin aporte de nitrógeno y fósforo (SW) durante un periodo de 2 semanas

<sup>(2)</sup> Con aporte de nitrógeno y fósforo durante las 4 semanas posteriores



La influencia de los valores de radiación, tomados como dosis PAR diaria acumulada, sobre la producción de *Hydropuntia cornea* en las diferentes condiciones ensayadas se muestran en la Figura 3. Los valores de producción media aumentaron con la radiación de forma general, siendo mayores tanto fuera (Fig. 3A) como dentro del invernadero (Fig. 3B), para los tanques correspondientes a los periodos con aporte de nutrientes. En estas condiciones específicas, los valores de producción de los tanques exteriores fueron superiores a los obtenidos en los tanques situados en el interior del invernadero. Las producciones de los tanques control y sin aporte de nutrientes (primeras 2 semanas del periodo experimental) se mantuvieron constantes, en relación al aumento de los valores de radiación, de forma general, mostrando valores inferiores a los obtenidos de los tanques con aporte de nutrientes.

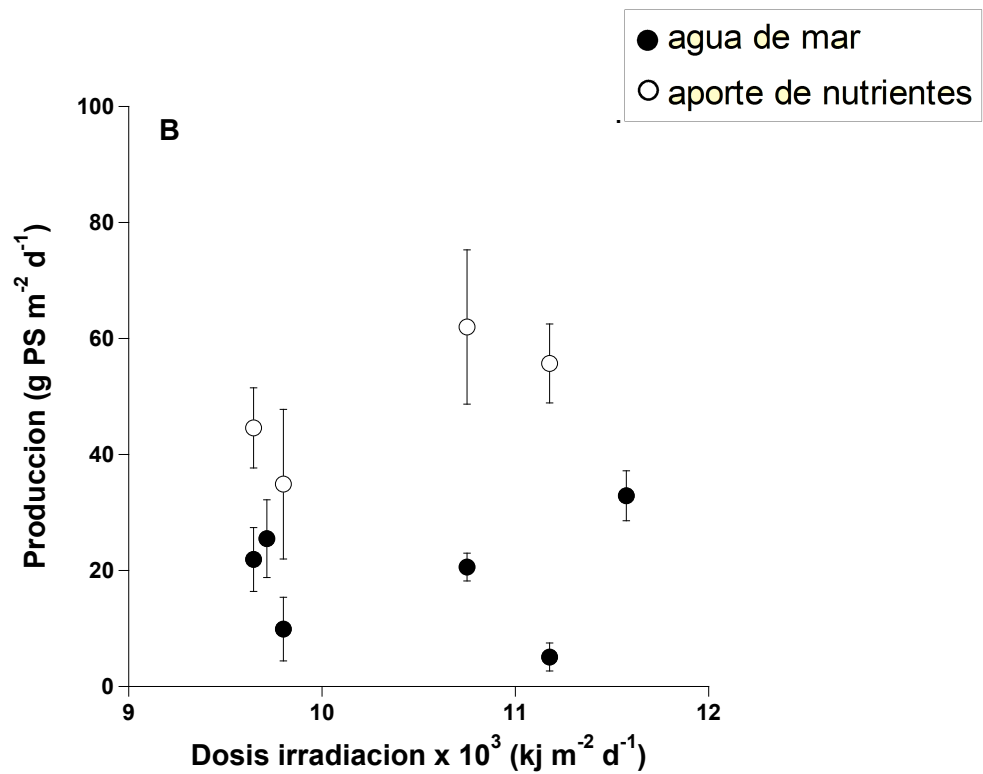
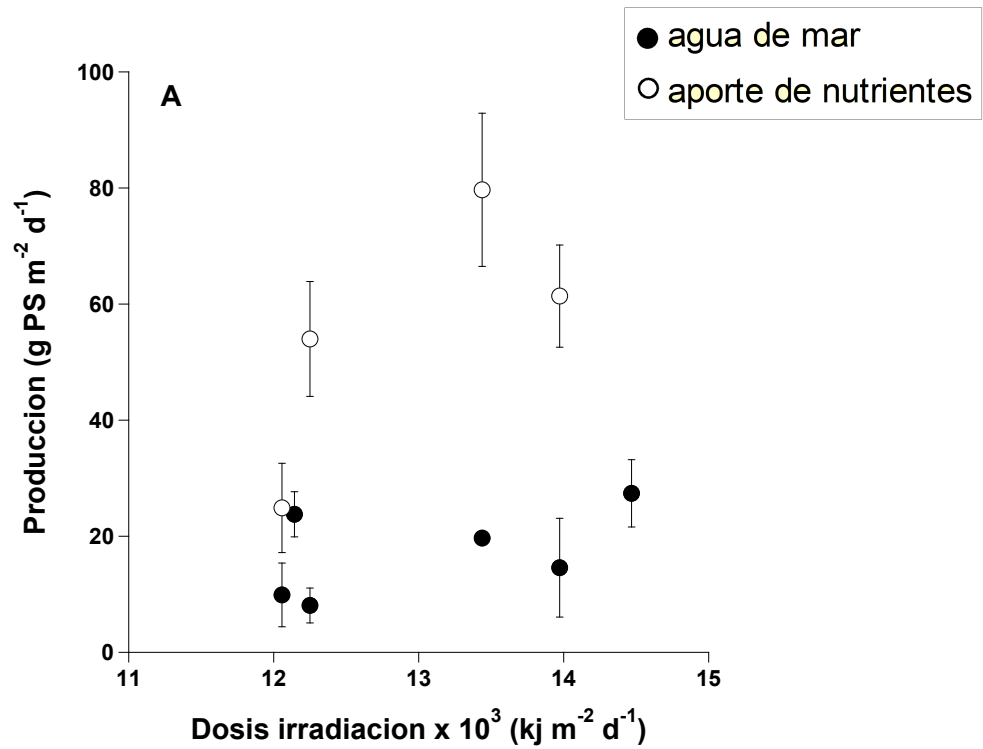
Aunque cabría esperar la misma dinámica para los datos de producción de *Ulva rigida*, los problemas de esporulación durante el periodo experimental en los tanques con aporte de nutrientes, no permitieron obtener datos de producción suficientes para realizar la comparativa.

#### 4.2 Capacidad de biofiltración de amonio

Los datos de biofiltración de amonio de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* durante las 4 últimas semanas de tratamiento con aporte continuo de nutrientes (N-amonio y P-fosfatos) se presentan en la tabla 4.

El flujo de N-amonio durante el periodo experimental de cultivo de *Hydropuntia cornea* mostró valores medios de  $4.5 \pm 0.5$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup>. En estas condiciones los valores de eficiencia de eliminación de amonio fueron superiores al 75% en los tanques interiores frente a valores medios del 84% para los tanques en el exterior. Las tasas de eliminación/asimilación por unidad de superficie fue igualmente superior en los tanques exteriores ( $18.1 \pm 5.8$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) que en los del interior del invernadero ( $17.6 \pm 3.0$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) no observándose diferencias significativas.

En el caso de *Ulva rigida*, el flujo de N-amonio durante el periodo experimental mostró valores medios de  $2.9 \pm 1.0$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup>. Bajo estas



**Figura 3.-** Influencia de la irradiación (dosis PAR acumulada,  $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) sobre la producción de *Hydropuntia cornea* ( $\text{g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) en las condiciones ensayadas. A: Tanques exteriores; B: Tanques en el interior invernadero (80% PAR). Medias  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ).

**Tabla 4.**- Valores medios (media  $\pm$  sd;  $n \geq 9$ ) de eficiencia de eliminación NUE (%) y tasa de eliminación de amonio NUR ( $\text{mmoles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) de las especies cultivadas en tanques “cpt” (90 l) con aporte de N-amonio y P-fosfatos, bajo las diferentes condiciones ensayadas; interior: bajo invernadero, exterior: irradiación natural. R: Rhodophyta; C: Chlorophyta.

Especie (Division)	Periodo experimental	Flujo amonio ( $\text{mmoles h}^{-1}$ )	Biofiltración de amonio			
			NUE (%)		NUR ( $\text{mmoles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	
			Interior	Exterior	Interior	Exterior
<i>Hydropuntia cornea</i> (R)	Jul – Ago 09	$4.5 \pm 0.5$	$76.1 \pm 20.2$	$83.9 \pm 19.1$	$17.6 \pm 3.0$	$18.1 \pm 5.8$
<i>Ulva rigida</i> (C)	Ago – Sep 09	$2.9 \pm 1.0$	$98.3 \pm 2.6$	$98.3 \pm 4.5$	$15.2 \pm 6.1$	$14.7 \pm 5.7$

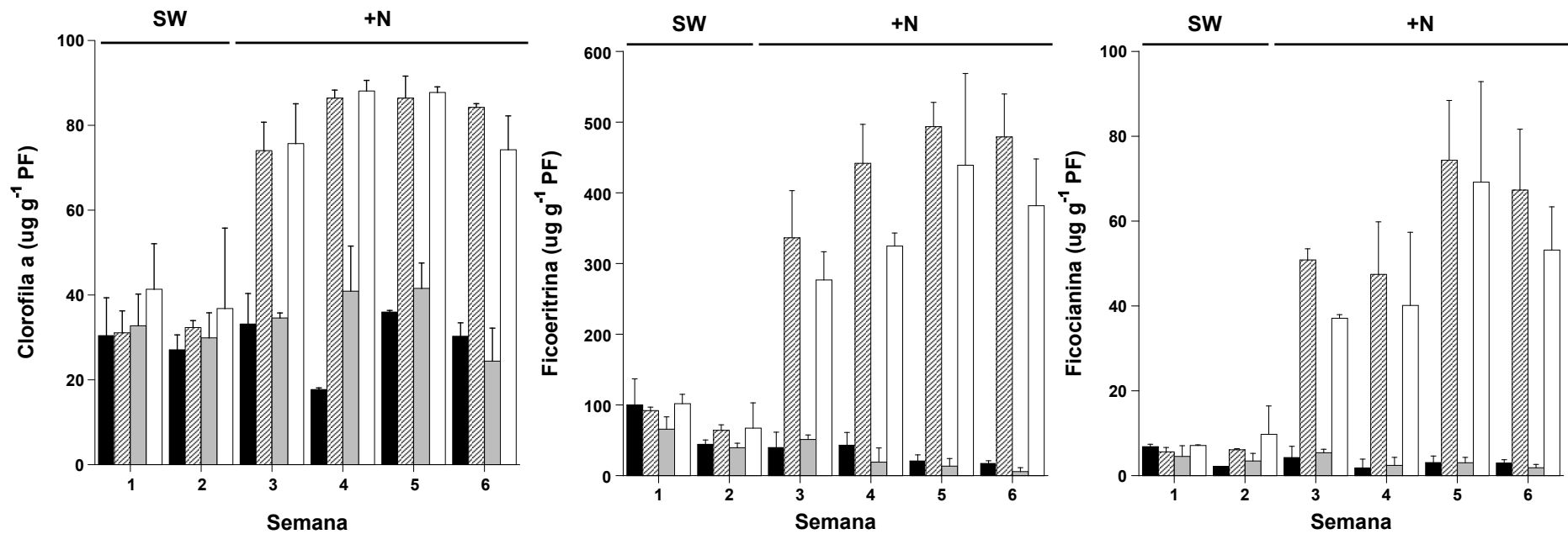
condiciones los valores de eficiencia de eliminación de amonio fueron superiores al 98% tanto en los tanques interiores como en los exteriores (Tabla 4), alcanzándose en algunas de las muestras valores del 100%. Las tasas de eliminación/asimilación, por unidad de superficie fueron ligeramente superiores en los tanques interiores ( $15.2 \pm 6.1$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) en comparación a los tanques exteriores ( $14.7 \pm 5.7$  mmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) no observándose diferencias significativas.

Comparativamente los valores de eficiencia de eliminación (NUE) en los tanques de *Ulva rigida* fueron superiores a los de *Hydropuntia cornea* a pesar de que los rangos en los valores medios de ésta última fueron amplios (valores mínimos cercanos al 50-60% y máximos del 100%). Los valores medios de las tasas de eliminación (NUR) fueron ligeramente superiores para *H. cornea* en comparación a los obtenidos con *U. rigida* a pesar de que no se observaron diferencias significativas.

#### 4.3 Dinámica de la concentración de pigmentos fotosintéticos

Los resultados de la dinámica y evolución de los pigmentos fotosintéticos, clorofila *a* y ficobiliproteínas (R-ficoeritrina y R-ficocianina) de *Hydropuntia cornea* bajo las condiciones ensayadas se muestran en la figura 4. Los datos de clorofila correspondientes al experimento de *Ulva rigida* no se muestran por la imposibilidad de realizar un análisis coherente de los datos obtenidos, debido a los problemas de esporulación y pérdida de biomasa en los tanques con aporte de nutrientes.

En *Hydropuntia cornea* la dinámica mostró, en los tanques control durante todo el experimento y en los tanques con tratamiento durante las 2 primeras semanas sin aporte de nutrientes, una disminución continuada en las concentraciones de ambas ficobiliproteínas hasta alcanzar los valores mínimos en la semana 6. Sin embargo, la concentración de clorofila *a* no mostró variaciones significativas durante todo el periodo experimental (Fig. 4). De forma inversa, se observó un aumento de los valores de las diferentes concentraciones de los tres pigmentos mayoritarios en los tanques con aporte continuo de nutrientes durante las 4 últimas semanas, alcanzándose los valores máximos entre las semanas 4 y 5. En la semana 6, aunque los valores se mantienen en los niveles máximos, se observa una ligera disminución en los tres pigmentos analizados (Fig. 4).



**Fig. 4.-** Evolución de la concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PF) de clorofila *a* y ficobiliproteínas (R-ficoeritrina y R-ficocianina) de *Hydropuntia cornea* bajo las condiciones ensayadas. SW: 2 semanas sin aporte de nitrógeno; +N: 4 semanas con aporte de nutrientes. Barra negra: control interior con agua de mar; barra trama diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior con agua de mar; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ). Los valores medios en la semana 0 fueron: clorofila *a* =  $84.0 \pm 16.2 \mu\text{g g}^{-1}$  PF; ficoeritrina =  $113,4 \pm 8,0 \mu\text{g g}^{-1}$  PF; ficocianina =  $19,0 \pm 3,7 \mu\text{g g}^{-1}$  PF. Para la transformación de los datos a  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS se utiliza una relación PS/PF para *H. cornea* = 0.12.

El aumento en la concentración de clorofila *a* de *Hydropuntia cornea* evolucionó de forma paralela tanto para los tanques situados en el interior del invernadero como los exteriores, alcanzándose valores máximos cercanos a 90  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF (750  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS). La dinámica fue observada igualmente para las ficobiliproteínas. Sin embargo, los valores fueron superiores para los tanques situados en el interior del invernadero en comparación a los tanques situados en el exterior (Fig. 4). La R-ficoeritrina fue el pigmento mayoritario en *H. cornea*, incluso en comparación a la clorofila *a*, alcanzando concentraciones máximas superiores a 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF (4.2  $\text{mg g}^{-1}$  PS). La R-ficocianina alcanzó valores máximos superiores a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF (667  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS).

Las diferencias en la concentración de pigmentos de las algas cultivadas sin aporte de nutrientes con respecto a las cultivadas con aporte continuo de N y P fueron observadas morfológicamente de forma clara, tal y como se muestra en la figura 5.



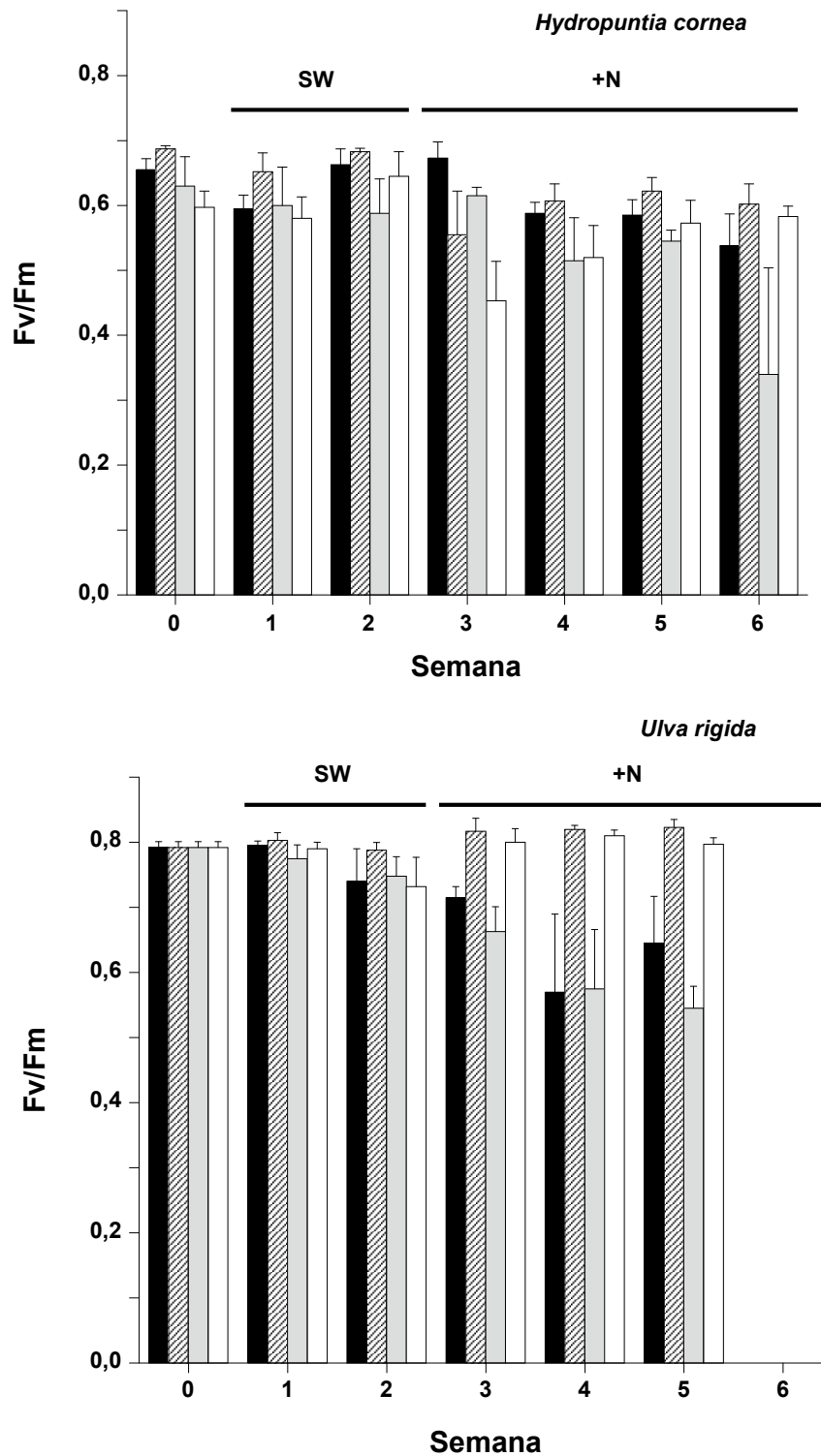
**Figura 5.-** Aspecto morfológico externo de *Hydropuntia cornea* cultivada con aporte de nutrientes (color rojo oscuro) y sin aporte de nutrientes (color pardo-amarillo).

#### 4.4 Rendimiento cuántico óptimo del PSII como indicador de estrés

La dinámica de los valores correspondientes al rendimiento cuántico óptimo del PSII, como indicador de estrés de la biomasa, medidos *in vivo* a través de la fluorescencia de la clorofila, se presentan en la figura 6.

Los valores de la relación Fv/Fm obtenidos para *Ulva rigida* en el estado considerado “óptimo” o “sin estrés” fueron superiores a los observados para *Hydropuntia cornea* (0.8 y 0.6 respectivamente). De forma general, las dos especies mantuvieron su condición fisiológica estable durante las 6 semanas de duración del experimento. Sin embargo, en los tanques control de *U. rigida* se observó una disminución en los valores de Fv/Fm a partir de la semana 4. A partir de la semana 3, coincidiendo con la inyección de nutrientes en los tanques correspondientes, los valores sufrieron un ligero ascenso indicando el efecto positivo de esta adición sobre la capacidad fotosintética de la biomasa (Fig. 6).

Para *Hydropuntia cornea* la dinámica se mantuvo estable en los tanques situados en el interior del invernadero, bajo las diferentes condiciones establecidas, mostrando valores cercanos al 0.6. Sin embargo, los valores de Fv/Fm obtenidos para los tanques situados en el exterior, con irradiación natural, fueron menores que los observados en los tanques interiores, incluso en el periodo de aporte de nutrientes. Los valores mínimos, por debajo del 0.4, fueron obtenidos para los tanques control, exteriores sin aporte de nutrientes, en la semana 6 (Fig. 6).



**Figura 6.-** Evolución del rendimiento cuántico óptimo del PSII (Fv/Fm) en *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* cultivadas bajo las diferentes condiciones ensayadas. SW: 2 semanas sin aporte de nitrógeno; +N: 4 semanas con aporte de nutrientes. Barra negra: control interior; barra trama diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 4$ ). Las medidas en la semana 0 se realizaron con la biomasa del día de inoculación de los tanques (día 0).



#### 4.5 Valoración del contenido en lípidos y triglicéridos (TG)

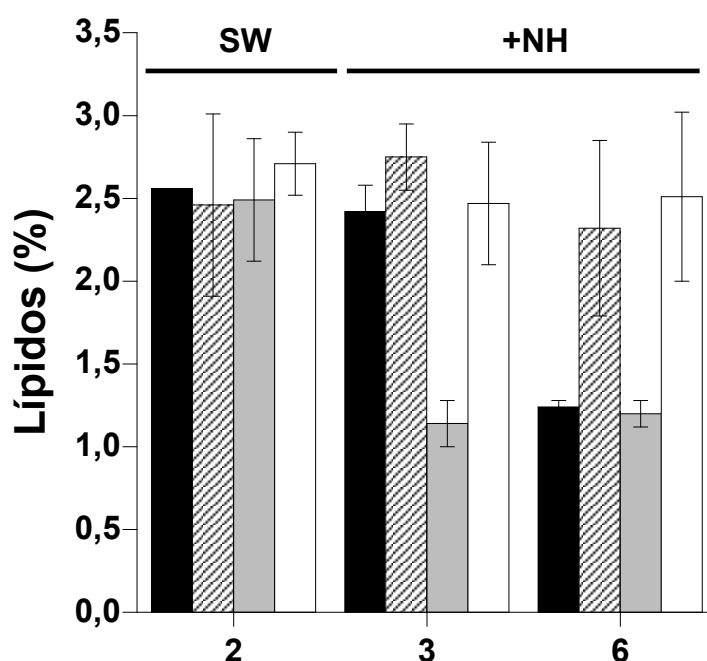
Los resultados de los análisis de lípidos totales extraídos de las muestras de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* se muestran en las figuras 7 y 8. Las muestras obtenidas, en el trabajo experimental descrito, fueron comparadas y analizadas conjuntamente con las obtenidas en los experimentos del Proyecto Bifaro, en los que muestras de las mismas especies cultivadas en periodos similares, bajo las mismas condiciones de irradiación (interior y exterior), fueron cultivadas con una dinámica inversa de nutrientes, es decir, 4 semanas con aporte de nutrientes y 2 semanas finales sólo con agua de mar.

En general, el contenido en lípidos de ambas especies mostró niveles por debajo del 3%, siendo ligeramente superiores en las muestras de *Hydropuntia cornea* en comparación a los observados en *Ulva rigida* (Fig. 7 y 8).

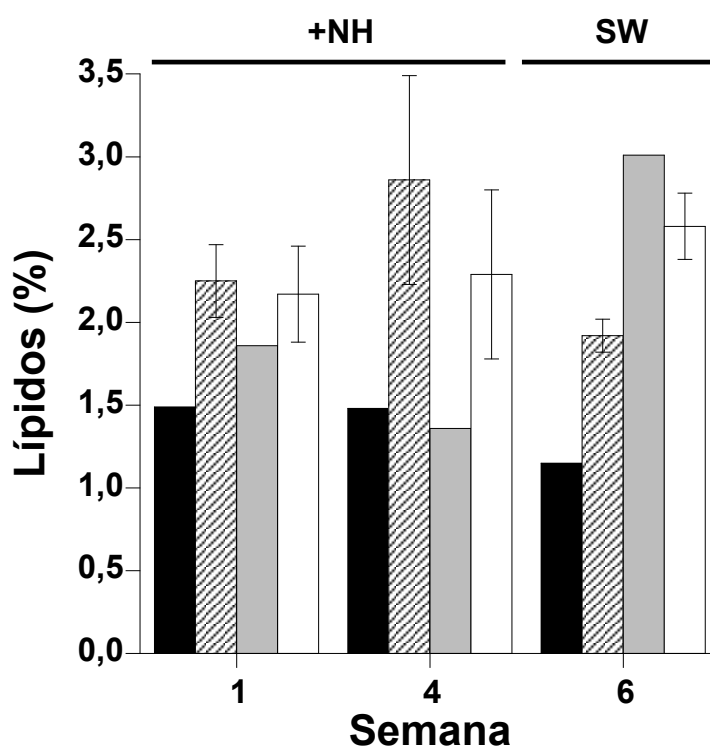
Para las muestras de *Hydropuntia cornea* obtenidas en el presente trabajo, el contenido en lípidos totales se mantuvo estable, durante las dos primeras semanas en agua de mar y en las semanas posteriores para los tanques con aporte de nutrientes, sin observarse cambios significativos entre los tanques exteriores en comparación a los situados en el interior del invernadero. Sin embargo, los tanques control con agua de mar mostraron una disminución considerable en la concentración de lípidos totales, tanto dentro como fuera del invernadero, alcanzando concentraciones cercanas al 1% (Fig. 7A). La misma dinámica fue observada para las muestras del Proyecto Bifaro (Fig. 7B), valores menores para los controles, excepto en la semana 6 para el control exterior, y valores máximos y estables para los tanques con aporte de nutrientes durante las 4 primeras semanas y en las 2 semanas posteriores sólo con agua de mar.

En el caso de *Ulva rigida* las diferencias entre los valores del contenido en lípidos totales fueron más acusadas entre las algas cultivadas con aporte de nutrientes en los dos tipos de experimento y las muestras obtenidas de los tanques control o sin aporte de nutrientes (Fig. 8). En estos resultados también se observa la disminución en la concentración de lípidos, en las muestras obtenidas de los tanques con aporte de nutrientes después de 4 semanas; semana 6 para este experimento (Fig. 8A) y semana 4 para las muestras del Proyecto Bifaro (Fig. 8B).

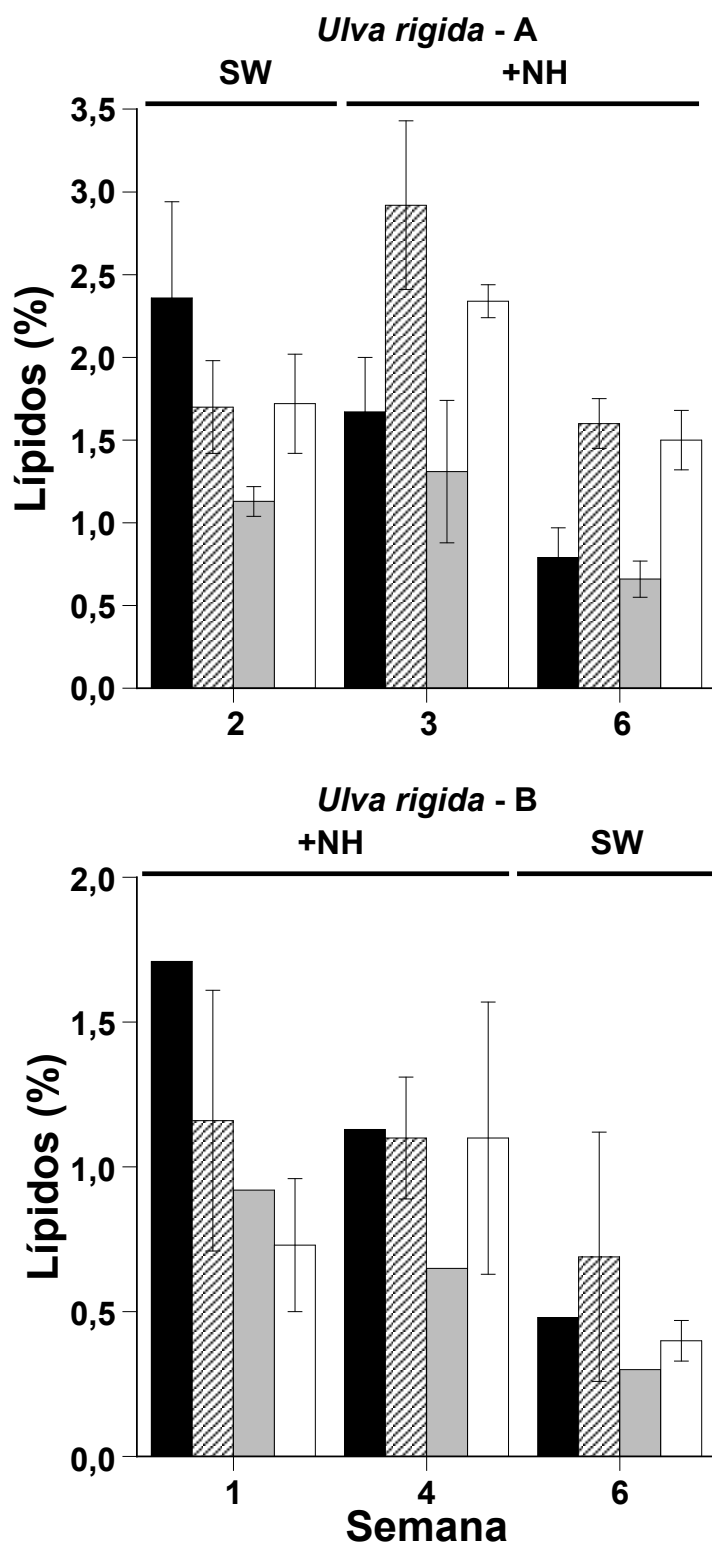
*Hydropuntia cornea* - A



*Hydropuntia cornea* - B



**Figura 7.-** Evolución del contenido en lípidos totales extraídos de *Hydropuntia cornea* bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las muestras fueron seleccionadas en las semanas indicadas; SW: semanas con agua de mar; +NH: semanas con adición de nutrientes. A: Experimento planificado en este trabajo; B: Muestras obtenidas del Proyecto Bifaro con la dinámica inversa. Barra negra: Control interior con agua de mar; barra trama diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior con agua de mar; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ).

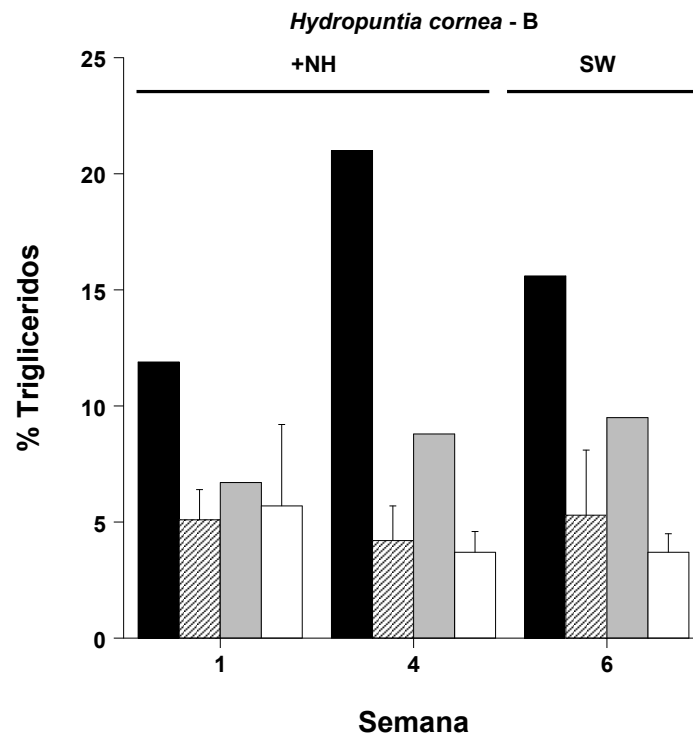
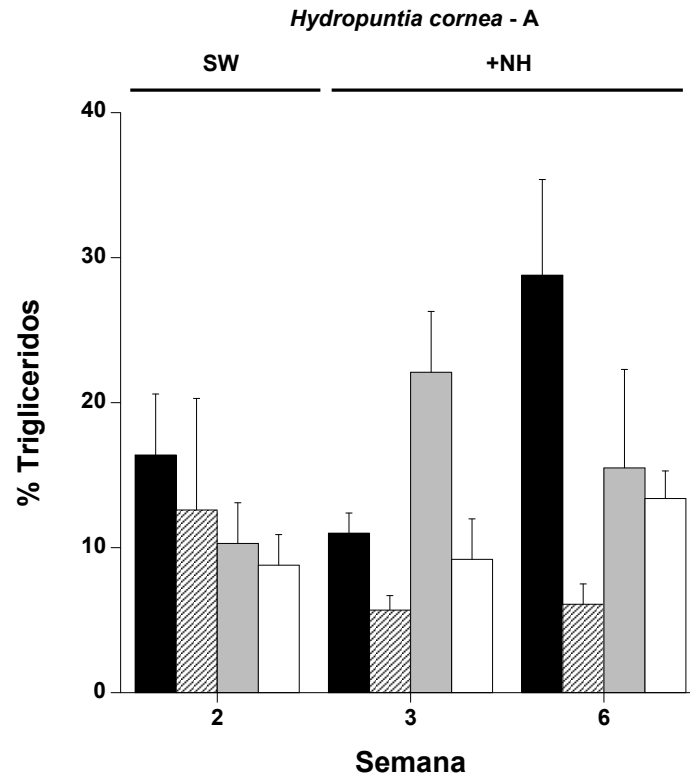


**Figura 8.-** Evolución del contenido en lípidos totales extraídos de *Ulva rigida* bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las muestras fueron seleccionadas en las semanas indicadas; SW: semanas con agua de mar; +NH: semanas con adición de nutrientes. A: Experimento planificado en este trabajo; B: Muestras obtenidas del Proyecto Bifaro con la dinámica inversa. Barra negra: Control interior con agua de mar; barra trama diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior con agua de mar; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ).

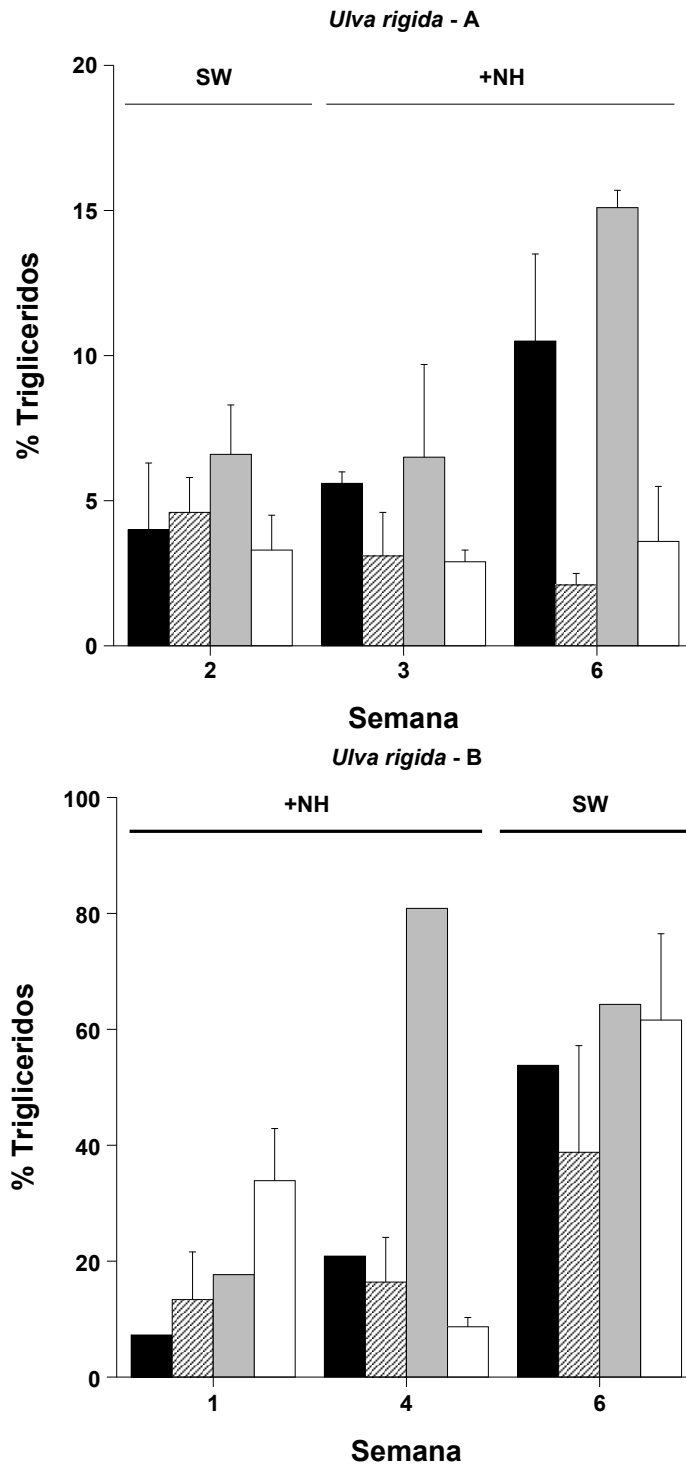
Los datos (en % respecto a los lípidos totales) y la evolución del contenido en triglicéridos de las muestras analizadas se muestran en las figuras 9 y 10. De forma general, para las muestras de las dos especies en los diferentes experimentos, se observaron contenidos en TG superiores en las muestras control, sin aporte de nutrientes, tanto en los tanques exteriores como interiores, independientemente de la dinámica establecida (Fig. 9 y 10). El contenido en TG fue superior en las muestras de *Hydropuntia cornea* en comparación a los obtenidos para *Ulva rigida*, excepto los valores obtenidos para esta especie en las muestras de la semana 4 y 6 del Proyecto Bifaro (Fig. 10B) que superaron el 40% con respecto a los lípidos totales. En estas muestras el valor máximo de 80%, que corresponde a 0.48 g TG g<sup>-1</sup> lípidos, fue obtenido para la muestra control exterior de la semana 4.

En el caso de *Hydropuntia cornea* se alcanzaron máximos superiores al 30%, 0,39 g TG g<sup>-1</sup> lípidos, valores correspondientes a la muestra control interior en la semana 6.

Combinando los resultados máximos de los contenidos en lípidos y triglicéridos obtenidos y las producciones máximas medias de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* se estimaron los rendimientos en la producción de lípidos y triglicéridos del sistema ensayado. Los resultados en peso de producto por unidad de área y tiempo (g producto m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>; t producto ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) de estas estimas, se presentan en la tabla 5. Los rendimientos máximos en ambos casos fueron obtenidos para *H. cornea* que alcanzó valores de 1.7 g lípidos m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (6.4 t lípidos ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) y 0.7 g TG m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (2.4 t TG ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) frente a los 1.2 g lípidos m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (4.3 t lípidos ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) y 0.6 g TG m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (2.1 t TG ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), calculados en las condiciones más favorables para *Ulva rigida* (Tabla 5).



**Figura 9.-** Evolución del contenido en triglicéridos (% de los lípidos totales) de *Hydropuntia cornea* bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las muestras fueron seleccionadas en las semanas indicadas; SW: semanas con agua de mar; +NH: semanas con adición de nutrientes. A: Experimento planificado en este trabajo; B: Muestras obtenidas del Proyecto Bifaro. Barra negra: Control interior con agua de mar; barra trama diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior con agua de mar; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ).



**Figura 10.-** Evolución del contenido en triglicéridos (% de los lípidos totales) de *Ulva rigida* bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las muestras fueron seleccionadas en las semanas indicadas; SW: semanas con agua de mar; +NH: semanas con adición de nutrientes. A: Experimento planificado en este trabajo; B: Muestras obtenidas del Proyecto Bifaro. Barra negra: Control interior con agua de mar; barra trazo diagonal: tanques tratamiento (+N) interior; barra gris: control exterior con agua de mar; barra blanca: tanques tratamiento (+N) exterior. Datos expresados como media  $\pm$  sd ( $n \geq 3$ ).

**Tabla 5.-** Estimaciones y valoración de los rendimientos en la producción de lípidos y triglicéridos (TG) de *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* en el presente estudio, utilizando los valores máximos óptimos en cada uno de los casos (3% lípidos totales; 0.39 g TG g<sup>-1</sup> lípidos para *H. cornea*; 0.48 g TG g<sup>-1</sup> lípidos para *U. rigida*).

Especie	Periodo experimental	Producción máxima media (g PS m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ) (t PS ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	Producción lípidos (g lípidos m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ) (t lípidos ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	Producción triglicéridos (g TG m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ) (t TG ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )
<i>Hydropuntia cornea</i>	Jul – Ago 09	58.4	1.7	0.7
		213	6.4	2.4
<i>Ulva rigida</i>	Ago – Sep 09	39.1	1.2	0.6
		143	4.3	2.1

## **5. Discusión**

Para el correcto desarrollo del IMTA, debemos buscar y/o conocer las especies de macroalgas, locales, que mejor se adapten a las condiciones ambientales de un sistema de biofiltro (Chopin *et al.*, 2001; Copertino *et al.*, 2009). Nuestras algas ya han demostrado, en estudios anteriores (Gómez-Pinchetti *et al.*, 1998; Mata *et al.*, 2010), que son muy adaptables y maleables en diferentes condiciones ambientales; por eso, nuestro estudio esta dirigido a la búsqueda de las variaciones dadas cuando cambiamos los factores ambientales de irradiación y nutrientes en la calidad de la biomasa, haciendo hincapié en la presencia de lípidos (Harwood y Guschina, 2009).

Hemos obtenido resultados interesantes (ver tablas 3 y 4) en cuanto a la producción y tasa de crecimiento (SGR). La adición de nutrientes al medio, sobre todo nitrógeno, redundo en el incremento de la biomasa de las especies autótrofas (Buschmann *et al.*, 2008a). Por ello, las producciones y tasas de crecimiento obtenidas durante el cultivo han sido altas; aunque hay una alta desviación estándar presente, que seguramente se deba a la alta variación diaria en la irradiación incidente (Schuenhoff *et al.* 2006; Shpigel y Neori, 2007; Buschmann *et al.*, 2008b); lo que concuerda con resultados obtenidos por otros autores (Chow *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2007; Shpigel y Neori, 2007; Wang *et al.*, 2007; Buschman *et al.*, 2008b; Marinho-Soriano *et al.*, 2009; Cruz-Suárez *et al.*, 2010) con especies afines.

En otro orden de cosas, la producción de ulva se colapso durante la tercera semana de cultivo, coincidiendo con la luna llena (04/09/09) que indujo la fase reproductiva, lo que coincide con lo reportado por otros autores (Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Copertino *et al.*, 2009) que observaron este mismo comportamiento en especies del género. Aún con el contratiempo presentado, los resultados, durante las tres primeras semanas de cultivo, indican una producción estable; entorno a  $39.1 \pm 18.0 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $3.4 \pm 1.5\% \text{ d}^{-1}$ ) y  $38.5 \pm 9.7 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $3.4 \pm 0.8\% \text{ d}^{-1}$ ), dentro y fuera respectivamente; que son estimas próximas a las obtenidas por Msuya y Neori, (2002) con  $1,2 \pm 2,7\% \text{ d}^{-1}$ , Bartoli *et al.*, (2005) con  $3,4\% \text{ d}^{-1}$ , Wang *et al.*, (2007) con  $3,3\% \text{ d}^{-1}$  pero alejadas de Pereira *et al.* (2006) y Copertino *et al.* (2009), que obtuvieron un  $20\% \text{ d}^{-1}$  de SGR medio, aunque ellos



trabajaron con *Phorphyra* en cámaras de cultivo. El alga roja (*H. cornea*) no presentó ningún contratiempo de tipo reproductivo, puesto que es un clon estéril, por lo tanto, la producción fue máxima con  $58.4 \pm 19.8 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $6.00 \pm 2.1 \% \text{ d}^{-1}$ ), durante el periodo con adición de nutrientes, similar a lo reportado por otros autores (Chow *et al.*, 2001.; Msuya y Neori, 2002.; Hernandez *et al.*, 2006; Buschman *et al.*, 2008b; Marinho-Soriano *et al.*, 2009.) que han trabajado en especies cercanas.

Al someter a *H. cornea* y *Ulva rigida* a un periodo sin nutrientes lo que supone una situación de estrés, y siguiendo las indicaciones de Figueroa *et al.* (2006) que sugiere este parámetro como fiable y fácil de medir, se recopilaron datos del rendimiento cuántico óptimo del PSII (Fv/Fm) para registrar si hubo variaciones en el estado fisiológico. Los datos recabados (figura 6) indican que el estrés sufrido, por la carencia de nutrientes durante dos semanas, es inapreciable, solo en la semana sexta en los tanques control se observó un empeoramiento mientras que las replicas se mantienen en el óptimo, este hecho coincide con Mata *et al.* (2006) que observó la incidencia positiva de la densidad en el mantenimiento y recuperación del óptimo tras un episodio de estrés agudo, como puede ser la desecación o cambio brusco de irradiación (Figueroa *et al.*, 2006, Mata *et al.*, 2006, Aguilera *et al.*, 2008). Por el contrario, en *U. rigida* a partir de la cuarta semana se vio el descenso en la relación Fv/Fm para los controles, mientras que las replicas estuvieron en máximos, lo cual indica su sensibilidad a la falta de nutrientes. En ambos cultivos, Fv/Fm siempre fue ligeramente superior dentro del invernadero en comparación con el exterior; muy posiblemente esto se deba a la diferente radiación incidente, en el exterior incide la radiación UV, fuente de estrés adicional, que es casi totalmente reflejada por la cubierta del invernadero (Aguilera *et al.*, 2008).

Como la irradiación es un factor importante en la producción (Braud, 2006; Schuenhoff *et al.*, 2006), y durante nuestro cultivo hubo un rango amplio (de 14469 a  $12250 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), enfrentamos los datos (figura 3) obteniendo confirmación positiva de la mayor producción conforme aumenta la cantidad de irradiación, además se observa la diferencia, a una irradiación dada, entre la presencia/ausencia de nutrientes (Hernández *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006).

En cuanto a la biofiltración obtenida durante el experimento (Tabla 5) donde no hubieron diferencias significativas entre los cultivos, ni siquiera entre exterior e

interior, es superior o similar a las indicadas por otros autores (Chow *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Schuenhoff *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006; Buschman *et al.*, 2008b; Robertson-Andersson *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2009; Marinho-Soriano *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010b); donde sus resultados de eficiencia de asimilación de nitrógeno (NUE) están comprendidos entre el 20 y el 80%. Como nuestro experimento fue diseñado para obtener la máxima filtración es normal obtener resultados por encima del 50%. Por otro lado, fisiológicamente *U. rigida* y *H. cornea* han sido citadas como especies adaptadas a alta irradiación (Schuenhoff *et al.*, 2006; Shpigel y Neori, 2007, Buschman *et al.*, 2008b), lo que implica que los mejores resultados tanto en producción como en biofiltración ocurren en los periodos de verano-otoño. La biofiltración de *Ulva* no se vio afectada por el hecho de entrar en fase reproductiva (Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Copertino *et al.*, 2009), puesto que siguió activa fisiológicamente produciendo esporas, aunque no biomasa. Aunque el NUE es fácilmente comparable no da mucha información, mientras que la tasa de asimilación (NUR) nos permite saber la relevancia y capacidad para suprimir del medio, en este caso, el nitrógeno por unidad temporal y superficial (Jiménez del Río *et al.*, 1994). Los datos muestran una tasa de asimilación (NUR) que llega a duplicar la de otros autores (Chow *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Bartoli *et al.*, 2005; Schuenhoff *et al.*, 2006; Shpigel y Neori, 2007; Buschmann *et al.*, 2008b; Copertino *et al.* 2009). No obstante, aun no hallando diferencias significativas entre las dos especies, para los dos parámetros, se observó una mayor eficiencia en *U. rigida* que no se traduce en una mejor tasa de asimilación que es obtenida por *H. cornea*.

Buschman *et al.* (2008b) afirma que “altas concentraciones de nitrógeno (amonio) incrementan el contenido de los pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles y el nitrógeno interno, además de compuestos fotoprotectores o intermediarios de la fotosíntesis”. Esta respuesta fisiológica de las macroalgas es un hecho patente en nuestro estudio, como podemos observar en la figura 4, la cantidad de pigmentos se duplica, como mínimo en una semana, manteniéndose a partir de ahí constante. La Ficoeritrina es el pigmento característico de las Rodófitas (algas rojas) y por eso su cantidad es tan alta en comparación a la clorofila y la ficocianina. La aparente diferencia, en la media entre los tratamientos fuera y dentro de invernadero, se debe a la presencia/ausencia, respectivamente, de la radiación UV que provoca fenómenos de degradación como indican otros

autores (Aguilera *et al.*, 2008; Buschmann *et al.*, 2008b). Otros autores (Msuya y Neori, 2002; Neori *et al.*, 2003; Msuya y Neori, 2008) reseñan como parámetros de calidad, el alto contenido en proteínas y bajo en cenizas, puesto que la biomasa va destinada como alimento, como nuestro fin es obtener compuestos destinados a la industria, hemos hecho hincapié en los pigmentos además de los lípidos como parámetros a valorar.

El porcentaje de lípidos observados en los diferentes tratamientos no fueron elevados, no superaron en ningún caso el 3% en peso seco, este hecho es comparable a lo descrito por otros autores (Al-Hassan *et al.*, 1991; Gordillo *et al.*, 2001; Rupérez y Saura-Calixto, 2001; Khotimchenko y Yakovleva, 2004; Narayan *et al.*, 2005; Khotimchenko, 2005; Colombo *et al.*, 2006; Khotimchenko, 2006; de Oliveira *et al.*, 2009; Cruz-Suárez *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2010) donde confirman el bajo nivel de lípidos presentes en las macroalgas. Los lípidos totales se incrementan durante las dos semanas que pasan sin nutrientes aunque este incremento sea pequeño, del orden de 1-2 % en peso seco, concuerda con los datos de Gordillo *et al.* (2001) donde muestra las consecuencias de la carencia de nitrógeno en diferentes concentraciones de carbono (CO<sub>2</sub>). La diferencia entre los controles y las réplicas era la esperada puesto que la bibliografía (Gordillo *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002) indica la variación de las proporciones en los componentes (proteínas, cenizas, carbohidratos, lípidos, etc.) cuando se cultivan en aguas con nutrientes. La disminución de los lípidos totales, tras cuatro semanas con nutrientes, se debió posiblemente a un cambio de relación entre los componentes celulares. Dentro de los lípidos neutros de ambas especies, nos interesan los triglicéridos presentes (fig. 9 y 10) cuya dinámica es muy parecida: aumento en su proporción relativa, respecto los lípidos totales, conforme pasan las semanas sin nutrientes y disminución cuando se añaden nutrientes (Yamaberi *et al.*, 1998; Gordillo *et al.*, 2001). Además, este comportamiento coincide con las muestras del proyecto Bifaro aunque las muestras pertenecientes a *U. rigida* mostraron unas proporciones muy superiores a las obtenidas en este experimento, esta discrepancia podría deberse a la época del año (invierno) de su cultivo, como indican otros autores (Al-Hasan *et al.*, 1991; Khotimchenko y Yakovleva, 2004; Kostetsky *et al.*, 2004; Guschina y Harwood, 2006) los cambios ambientales (irradiación, temperatura, minerales...) provocan una adaptación que repercute en los lípidos, o a la edad de los talos (Khotimchenko, 2006).

La comparación con los resultados obtenidos por otros autores (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010a) que trabajan con microalgas, aunque es difícil porque trabajan con biorreactores además de con raceways, nos aportan una perspectiva en la viabilidad de la obtención de los lípidos neutros para su uso en la fabricación de biodiesel (Mata *et al.*, 2010a). Aunque el rendimiento por superficie es más bajo en las microalgas, cuya producción es aproximadamente de 127 t PS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, en raceways (Chisti, 2007), esto se compensa ampliamente por la acumulación de lípidos neutros, hablamos del 20 al 50% en peso seco en determinadas condiciones (Hu *et al.* 2008), cuya presencia en triglicéridos alcanza hasta el 80% (Chisti, 2007), por lo cual obtendríamos con los mejores resultados una producción de triglicéridos de 50,8 t PS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>.

## Conclusiones

- 1.- Las especies de macroalgas *Hydropuntia cornea* y *Ulva rigida* mostraron una alta capacidad de crecimiento en el sistema desarrollado y bajo las condiciones ensayadas alcanzando máximos de producción superiores a  $30 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , en condiciones de radiación natural y aporte continuado de nutrientes en el caso de *H. cornea* y sin aporte de nutrientes, tanto en condiciones interiores como exteriores, en el caso de *U. rigida*. Este último hecho estuvo relacionado con los procesos de esporulación acusados en los tanques con aporte de nutrientes, durante el periodo de luna llena coincidente con el periodo experimental, que produjeron la pérdida parcial de biomasa en los tanques indicados.
  
- 2.- Bajo las condiciones de aporte de nutrientes, la capacidad de biofiltración de N-amonio de ambas especies alcanzó valores medios de NUE superiores al 50% llegando a determinar valores del 100% en algunos de los análisis realizados. Para *Hydropuntia cornea* se obtuvieron valores medios del 84%, y velocidades de asimilación NUR de  $18.1 \text{ mmoles N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , en condiciones de radiación natural, mientras que para *Ulva rigida* los valores medios de NUE alcanzaron el 94%, y una NUR de  $15.4 \text{ mmoles N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , en condiciones interiores. Estos resultados confirman que, en las condiciones ensayadas, ambas especies soportan tasas de biofiltración interesantes para su utilización eficiente en diferentes tipos de sistemas integrados.
  
- 3.- Bajo las condiciones ensayadas, *Hydropuntia cornea* mostró la respuesta esperada en cuanto a la dinámica de los pigmentos fotosintéticos, acumulando clorofilas y ficobiliproteínas en condiciones de aporte de nutrientes y utilizándolos para mantener su actividad en condiciones de limitación.

- 4.- La capacidad fisiológica, determinada por las medidas *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila, se mantuvo estable durante el periodo experimental disminuyendo en los tanques control, sin aporte de nutrientes y en condiciones de radiación natural, a partir de la semana 4 de cultivo, e indicando que ambas especies mantienen su capacidad fotosintética intacta durante largos periodos de limitación de nutrientes y bajo altos niveles de radiación.
- 5.- A pesar de mostrar niveles no superiores al 3% en la concentración de lípidos totales, lo que ya ha sido descrito como una generalidad en macroalgas, se observaron pequeñas variaciones tanto en el contenido en lípidos como en el de triglicéridos en algunas de las condiciones ensayadas. El porcentaje de lípidos disminuyó en los tanques control, tanto dentro como fuera del invernadero mientras el contenido en triglicéridos, respecto a los lípidos totales, fue superior en las muestras control, sin aporte de nutrientes, tanto en los tanques exteriores como interiores, independientemente de la dinámica de nutrientes establecida.
- 6.- Los rendimientos teóricos en la producción de lípidos y triglicéridos del sistema ensayado, considerando esta biomasa como fuente potencial de biodiesel y barajando las condiciones más favorables, fueron superiores para *Hydropuntia cornea* que alcanzó valores de 6.4 t lípidos ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> y 2.4 t TG ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> frente a los 4.3 t lípidos ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> y 2.1 t TG ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, calculados para *Ulva rigida*.

## **Bibliografía**

Al-Hassan, R.H., Hantash, F.M., Radwan S.S., 1991. Enriching marine macroalgae with eicosatetraenoic (arachidonic) and eicosapentaenoic acids by chilling. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 530-535.

Aguilera, J., Figueroa F.L., Häder, D-P., Jiménez C., 2008. Photoinhibition and photosynthetic pigment reorganisation dynamics in light/darkness cycles as photoprotective mechanisms of *Porphyra umbilicalis* against damaging effects of UV radiation. Scientia Marina, Vol. 72, N° 1

Aresta, M., Dibenetto, A., Carone, M., Colonna, T., Fragale, C., 2005. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and thermochemical liquefaction. Environ Chem Lett 3: 136-139

Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture 252: 79-84.

Bartoli, M., Nizzoli, D., Naldi, M., Vezzulli, L., Porrello, S., Lenzi, M., Viaroli, P., 2005. Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus *Ulva* uptake. Marine Pollution Bulletin 50: 1386-1397.

Beer, S. y Eshel, A., 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 36: 785–792.

Bidwell R.G., McLachlan J, Lloyd N.D., 1985. Tank cultivation of Irish Moss, *Chondrus crispus* Stackh. Bot. Mar. 28: 87–97.

Braud, J.P., 2006. Continuous seaweed tank culture in France: From *CHONDRUS CRISPUS* to Co-Culture of Macroalgae and the Diatom *ODONTELLA AURITA*. INNOVALG, Centre d'Algoculture, Polder du Dain, F 85230 BOUIN.

Bunting, S.W. y Shpigel, M., 2009: Evaluating the economic potential of horizontally integrated land-based marine aquaculture. *Aquaculture* 294: 43-51.

Buschmann, A., Troell, M., Kautsky, N., 2001. Integrated algal farming: a review. *Cah. Biol. Mar.* 42: 83– 90.

Buschmann, A., Hernández-González, M.C., Aranda, C., Chopin, T., Neori, A., Halling, C., Troell, M., 2008a. Mariculture waste management. In: S.E. Jørgensen and B.D. Fath (Eds.), *Encyclopaedia of Ecology*. Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2463-2475.

Buschmann, A.H., Varela, D.A., Hernández-González, M.C., Huovinen P., 2008b. Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of *Macrocystis* and *Gracilaria* as biofilters. *J. Appl. Phycol.* 20: 571–577.

Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol (Part C)* 146: 60-78.

Carmona, R., Kraemer, G.P., and Yarish, C., 2006. Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish–algal aquaculture system. *Aquaculture* 252: 54-65.

Chávez-Crooker, P. y Obreque-Contreras, J., 2010. Bioremediation of aquaculture wastes. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 313-317.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25: 294–306.



Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yaris, C., Neefus, C., 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Minireview. J. Phicol.* 37: 975-986.

Chopin, T., Robinson, S.M.C., Troell, M., Neori, A., Buschmann, A., Fang, J., 2008. Multitrophic Integration for Sustainable Marine Aquaculture. In: S.E. Jørgensen and B.D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2463-2475.

Chow, F., Macchiavello, J., Cruz, S.S., Fonck, E., Olivares, J., 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. *Journal of the World Aquaculture Society* 32: 215-220.

Colombo, M.L., Risé, P., Giavarini, F., de Angelis, L., Galli, C., Bolis, C.L., 2006. Marine Macroalgae as Sources of Polyunsaturated Fatty Acids. *Plant Foods for Human Nutrition* 61: 67–72.

Copertino, M.S., Tormena, T., Seeliger, U., 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *J. Appl. Phycol.* 21: 31–45.

Cruz-Suárez, L.E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll B., Ricque-Marie, D., 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301: 64-68.

DeBoer, J. y Ryther, J.H., 1977. Potential yields from a waste-recycling algal mariculture system. In: Krauss, R.W. (Ed.), *The Marine Plant Biomass of the Pacific Northwest Coast*. Oregon State University Press, 231-248.

D'Elia, C.F. y DeBoer, J., 1978. Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. *J. Phycol.* 14: 266-272.

Demetropoulos, C.L. y Langdon C.J., 2004a. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for co-culture with abalone in a land-based system: effects of seawater exchange, pH, and inorganic carbon concentration. *Aquaculture* 235: 457-470.

Demetropoulos, C.L. y Langdon, C.J., 2004b. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for co-culture with abalone in a land-based system: effects of stocking density, light, salinity, and temperature. *Aquaculture* 235:471-488.

Dhargalkar, V.K. y Pereira, N., 2005. Seaweed: promising plant of the millennium. *Science and Culture* 71: 60-66.

de Oliveira, M.N., Ponte-Freitas, A.L., Urano-Carvalho, A.F., Tavares-Sampaio, T.M., Farias, D.F., Alves-Teixeira, D.I., Thomaz-Gouveia, S., Gomes-Pereira, J., Marrir de Castro-Catanho de Sena, M., 2009. Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. *Food Chemistry* 115: 254–259.

Duarte, C.M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marbá, N., Guiu, J., Black, K., Karakassis, I., 2009. Will the Oceans help to feed humanity?. *Bioscience* 59: 967-976.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. FAO fisheries technical paper. N° 5: 1-196, Roma.

Figuerola F.L., Santos, R., Conde-Alvarez, R., Mata, L., Gómez Pinchetti, J.L., Matos, J., Huovinen, P., Schuenhoff, A., Silva, J., 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot. Mar.* 49: 275-282.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.

Friedlander, M. y Levy, I., 1995. Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *J. Appl. Phycol.* 7: 315-324.

Goh, C.S. y Lee, K.T., 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabat, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 14: 842-848.

Gómez Pinchetti, J.L., del Campo Fernández, E., Moreno Diaz, P., García Reina, G., 1998. Nitrogen-guided down and up dynamic of the biochemical composition and photosynthesis of tank cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 10: 383-389.

Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Goutx, M., Niell, X., 2001. Effects of CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on the biochemical composition of *Ulva rigida* with especial emphasis on lipid class analysis. *J. Plant. Physiol.* 158: 367–373.

Guschina, I.A. y Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45: 160–186.

Harwood, J.L. y Guschina, I.A., 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91: 679-684.

Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereira, R.T.L., Braga, E.S., Oliveira, E.C., 2008. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture* 277: 185-191.

He, P., Xu, S., Zhang, H., Wen, S., Dai, Y., Lin, S., Yarish, C., 2008. Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water. Res.* 42: 1281-1289.

Hernández I., Martínez-Aragón J.F., Tovar A, Pérez-Lloréns J.L., Vergara J.J., 2002. Biofiltering efficiencies for dissolved ammonium in three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters. *J. Appl. Phycol.* 14: 375–384.

- Hernández, I., Pérez-Pastor, A., Vergara, J.J., Martínez-Aragón J.F., Fernández-Engo, M.A., Pérez-Llorén J.L., 2006. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: From microscale to macroscale. *Aquaculture* 252: 43–53.
- Hirata, H., Yamauchi, T., Matsuda, M., Yamasaki, S., 2007. A Simple experiment in polyculture: Red Sea Bream (*Pagrus major*) And Ulvaes (*Ulva pertusa*). Theresa M. bert (ed). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, Vol 6: 425–431.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal* Vol 54, issue 4: 621-639.
- Jiang, Z.J., Fang, J.G., Mao, Y.Z., Wang, W., 2010. Eutrophication assessment and bioremediation strategy in a marine fish cage culture area in Nansha Bay, China *J. appl Phycol* 22: 421-426.
- Jimenez del Rio, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G., 1994. Optimization of yield and biofiltering efficiencies of *Ulva rigida* C. Ag. Cultivated with *Sparus aurata* L. waste waters. *Sci. Mar.* 58: 329–335.
- Jones, A.B., Dennison, W.C., Preston, N.P., 2001. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture* 193: 155–178.
- Jones, A.B., Preston, N.P., Dennison, W.C., 2002. The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research* 33: 1-19.
- Kang, Y.H., Shin, J.A., Kim, M.S., Chung, I.K., 2008. A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *J Appl Phycol* 20: 183-190.

Khotimchenko, S. V. 2005. Lipids from the marina alga *Gracilaria verrucosa* Chemistry of Natural Compounds, Vol. 41 No. 3: 285-288.

Khotimchenko, S.V., 2006. Variations in lipid composition among different developmental stages of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Bot. Mar. 49: 34–38.

Khotimchenko, S.V. y Yakovleva, I.M., 2004. Effect of solar irradiance on lipids of the green alga *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht. Bot. Mar. 47: 395–401.

Kostetsky, E.Y., Goncharova, S.N., Sanina N.M., Shnyrov, V.L., 2004. Season influence on lipid composition of marine Macrophytes. Bot. Mar. 47: 134–139.

Krom, M.D., Ellner, S., van Rijn, J., Neori, A., 1995. Nitrogen and phosphorus cycling and transformations in a prototype 'non-polluting' integrated mariculture system, Eilat, Israel. Marine Ecology Progress Series 118: 25-36.

Lombardi, J.V., de Almeida-Marques, H.L., Lima-Pereira, R.T., Saleé-Barreto, O.J. de Paula, E.J., 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. Aquaculture 258: 412-415.

Losordo, T.M. y Westers, H., 1994. System carrying capacity and flow estimation. In: Timmons, M.B., Losordo, T.M. (Eds.), Aquaculture water reuse systems: engineering design and management. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol. 27, Elsevier Science B.V., The Netherlands, 9-60.

Luning K. y Pang S., 2003. Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. J. appl. Phycol. 15: 115–119.

Lupatsch, I. y Kissil, G.W., 1998. Predicting aquaculture waste from gilthead seabream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. Aquat. Living Resour. 11 (4): 265– 268.

Mao, Y.; Yang, H.; Zhou, Y.; Ye, N. & Fang, J., 2009. Potential of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* for integrated multi-trophic aquaculture with scallop *Chlamys farreri* in North China. *J. Appl. Phycol.* 21: 649–656.

Marinho-Soriano, E., Nunes, S.O., Carneiro, M.A.A., Pereira, D.C., 2009. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass and bioenergy* 33: 327–331.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010a. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 14, issue 1: 217-232.

Mata, L., Schuenhoff, A., Santos, R., 2010b. A direct comparison of the performance of the seaweed biofilters, *Asparagopsis armata* and *Ulva rigida*. *J Appl Phycol* 22: 639-644.

Mata, L., Silva, J., Schuenhoff, A., Santos, R., 2006. The effects of light and temperature on the photosynthesis of the *Asparagopsis armata* tetrasporophyte (*Falkenbergia rufolanosa*), cultivated in tanks. *Aquaculture* 252: 12–19.

Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., Sousa-Pinto, I., 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. Original Research Article. *Aquaculture* 252, (Issue 1): 31-42.

McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries technical paper. N° 441 Roma, 105p.

Msuya, F.E. y Neori, A., 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae That Can Biofilter Effluent from Tidal Fishponds in Tanzania. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* Vol. 1, No. 2, pp117–126.

Msuya F.E. y Neori, A., 2008. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *J. Appl. Phycol.* 20: 1021–1031.

Nagler, P.L., Glenn, E.P., Nelson, S.G., Napolean, S., 2003. Effects of fertilization treatment and stocking density on the growth and production of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in cage culture at Molokai, Hawaii. *Aquaculture* 219: 379-391.

Narayan, B., Miyashita, K., Hosokawa, A., 2005. Comparative Evaluation of Fatty Acid Composition of Different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) Species Harvested from Temperate and Tropical Waters', *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13: 4: 53—70.

Neori, A., 2008. Essential role of seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture farms for global expansion of mariculture: an analysis. *J. Appl. Phycol.* 20: 567–570.

Neori, A., Cohen, I., Gordin, H., 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. II. Growth rate, yield and C:N ratio. *Bot Mar* 34: 483–489.

Neori, A., Ragg, N.L.C., Shpigel, M., 1998. The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within and abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquaculture Engineering* 17: 215-239.

Neori, A., Shpigel, M., Ben-Ezra, D., 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186: 279-291.

Neori, A., Msuya, F.E., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F., Shpigel, M., 2003. A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated Mariculture. *J. Appl. Phycol.* 15: 543–553.

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C., 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231: 361-391.

- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 173p.
- Pereira, R., Yarish, C., Sousa-Pinto, I., 2006. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture* 252: 66–78.
- Porrello, S., Lenzi, M., Persia, E., Tomassetti, P., Finoia, M.G., 2003a. Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system I. Dissolved and particulate nitrogen and phosphorus. *Aquaculture* 219: 515-529.
- Porrello, S., Lenzi, M., Persia, E., Tomassetti, P., Finoia, M.G., Mercatali, I., 2003b. Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system II. Nitrogen and phosphorus content in macroalgae and sediment. *Aquaculture* 219: 531-544.
- Porter, C.B., Krom, M.D., Robbins, M.G., Brickell, L., Davidson, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture* 66: 287–297.
- Robertson-Andersson, D., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J., Troell, M., Anderson, R., Halling, C., Probyn, T., 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 20: 579-595.
- Rodrigueza, M.R.C. y Montaña, M.N.E., 2007. Bioremediation potential of three carrageenophytes cultivated in tanks with seawater from fish farms. *J. Appl. Phycol.* 19: 755-762.
- Roque d 'Orbcastel, E. y Blancheton, J.P., 2006. The wastes from marine fish production systems: characterization, minimization, treatment and valorisation. *World Aquaculture* 37: 28–35.
- Ross A.B., Jones J.M., Kibacki M.L., Bridgeman, T., 2008. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. *Bioresour. technol.* 99(14): 6494-6504.



Rupérez, P. y Saura-Calixto, F., 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 349–354.

Saito, H., Xue, C., Yamashiro, R., Moromizato, S., Itabashi, Y., 2010. High polyunsaturated fatty acid levels in two subtropical macroalgae, *Cladosiphon okamuranus* and *Caulerpa lentillifera*. *J. Phycol.* 46: 665-673.

Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F.E., Neori, A., 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture* 221: 167-181.

Schuenhoff, A., Mata L., Santos, R., 2006. The tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* as a novel seaweed biofilter. *Aquaculture* 252: 3–11.

Shimoda, T., Suryati, E., Ahmad, T., 2006. Evaluation in a Shrimp Aquaculture System Using Mangroves, Oysters, and Seaweed as Biofilters Based on the Concentrations of Nutrients and Chlorophyll a. *JARQ* 40: 189-193.

Shpigel, M. y Neori, A., 2007. Microalgae, Macroalgae and Bivalves as biofilters in land based mariculture in Israel. Theresa m. Bert (ed). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, Vol 6: 433–446.

Shpigel, M., Neori, A., Popper, D.M., Gordin, H., 1993. A proposed model for "environmentally clean" land-based culture of fish, bivalves and seaweeds. *Aquaculture* 117: 115-128.

Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245–262.

Troell, M., Halling, C., Nilsson, A., Buschmann, A.H., Kautsky, N., Kautsky, L., 1997. Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output. *Aquaculture* 156: 45-61.

Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N., Yarish, C., 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226:69-90.

Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A.H., Fang, J.-G., 2009. Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* 297: 1-9.

Wang, J.K., 2003. Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering* 28: 37-46.

Wang, H., Liu, C.F., Qin, C.X., Cao, S.Q., and Ding, J., 2007. Review: Using a macroalgae *Ulva pertusa* biofilter in a recirculating system for production of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquacultural engineering* 36 (3): 217-224.

Wellburn, A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307–313.

Yamaberi, K.; Takagi, M., Yoshida, T., 1998. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 44–48.

Zemke-White, W. L. y Ohno, M., 1999. World seaweed utilisation: And end of century summary. *J. Appl. Phycol.* 11: 369-376.



**Anexo 1.-** Imágenes del sistema de cultivo de macroalgas utilizado en este estudio. A: Tanques cpt de 90 l situados en el interior del invernadero; B: Tanques en el exterior; C y D: Detalles de *Hydropuntia cornea* en los tanques de cultivo.