



EFECTO DE LA ADICIÓN DE IODO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS CON APLICACIÓN EN ACUICULTURA

LUCÍA ALBALÁ RODRÍGUEZ

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE
DEFENDIDA PARA LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE
MÁSTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria
Julio 2020



EFECTO DE LA ADICIÓN DE IODO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS CON APLICACIÓN EN ACUICULTURA

LUCÍA ALBALÁ RODRÍGUEZ

Trabajo realizado en el Laboratorio Banco Español de Algas (BEA) Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) de Gran Canaria (España), bajo la dirección de los Dres. Juan Luis Gómez Pinchetti y Dr. Javier Roo Filgueira.

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

Director

Codirector

Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti

Dr. Francisco Javier Roo Filgueira

Autora

LUCIA ALBALÁ RODRIGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis directores de Tesis, Juan Luis Gómez Pinchetti y Francisco Javier Roo Filgueira, y a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria el hecho de que ésta haya podido realizarse, y sobre todo agradecer, la oportunidad de trabajar en el laboratorio del Banco Español de Algas, donde se ha desarrollado gran parte de este trabajo. Este año he conocido a personas de las que he podido aprender mucho y además, disfrutar de un buen ambiente de trabajo. Con esto me refiero a todos los trabajadores y estudiantes, tanto del BEA como del SABE: Noelia, Agueda, Eduvigis, Virginia, Moneiba, Loli, Juan, Emilio, Carmen, Guacimara, Manuel y más. Por supuesto, quiero destacar la ayuda de tres personas, sin las cuales todo este proceso no habría sido posible: en primer lugar, a Mireia Sánchez quiero agradecerle su ayuda durante todo este proceso de inicio a fin, a Agustín Portillo por su vocación de compartir conocimientos de todo tipo y a Fernando Guzmán, por la buena actitud, esfuerzo y pasión que pone en su trabajo día a día. Agradecer también a los Dres. Argimiro Rivero y Aridane González su ayuda en el campo de la química.

Asimismo, mi gratitud hacía la Dra. Carmen María Hernández por su papel como profesora y directora del Máster en Cultivos Marinos en estos dos últimos años. A la mayoría de mis compañeros, tengo que agradecerles su apoyo y ayuda durante este periodo, conociendo personas de regiones muy diferentes y haciendo de ésta una experiencia muy enriquecedora.

De una forma más personal, me gustaría agradecer el apoyo incondicional de mi madre, Emilia Rodríguez Pérez y mi padre, Fernando Albalá Ponce, sin los cuales no podría haber realizado esta experiencia ni muchas otras. Me siento una persona afortunada por toda la ayuda, educación y experiencia que recibo de ellos. Otro apoyo incondicional es mi pareja y amigo, Álvaro Nahón, al que le agradezco toda su ayuda y apoyo tanto en la realización de este trabajo como en la vida en general. Además, al resto de mis familiares y amigos, agradecerles el apoyo en todo lo que me propongo, convirtiéndose en pilares fundamentales de mi vida. A mi hermano José María, a mis segundos padres Juan Luis y Manoli, a mis tías Estrella y Paqui y tíos, Pedro, Juan y José Manuel. A mis primos Juanito, José Manuel, Pedrito y por supuesto a Adriana que me ha enseñado una valiosa lección sobre la vida. No menos importante a todos mis amigos, por crear buenos momentos en mi vida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Importancia de la nutrición en la acuicultura	18
1.1.1. Proteínas.....	19
1.1.2. Lípidos	19
1.1.3. Antioxidantes	20
1.1.4. Pigmentos.....	21
1.1.5. Micronutrientes	22
1.2. Iodo	23
1.2.1. La química del iodo	23
1.2.2. Importancia del iodo para organismos vivos	24
1.2.3. Asimilación y transformación del iodo por los vegetales marinos	25
1.2.4. Formas químicas que aseguren buena disponibilidad del elemento	26
1.3. La importancia del iodo en la acuicultura	26
1.3.1. Antecedentes de la inclusión de iodo en dietas enfocadas a la acuicultura .	26
1.3.2. Requerimientos de iodo en animales y humanos.....	28
1.3.3. Importancia del iodo en la nutrición del cultivo larvario de peces marinos	30
1.4. Dificultad en el enriquecimiento en iodo en presas vivas enfocadas a acuicultura	31
1.5. Necesidades actuales	33
1.6. Hipótesis y objetivos del trabajo	34
2. MATERIAL Y MÉTODOS	36
2.1. Selección de cepas para el experimento	36
2.2. Descripción de las especies presentes en el estudio	37
2.2.1. <i>Isochrysis galbana</i> (REC 0002B)	37
2.2.2. <i>Microchloropsis gaditana</i> (BEA 1202B).....	38
2.2.3. <i>Parachlorella sp.</i> (BEA 0046).....	39

2.2.4.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (REC 0096)	40
2.2.5.	<i>Euglena cantabrica</i> (BEA 0937B).....	41
2.2.6.	<i>Rhodorus marinus</i> (BEA 1286B)	42
2.3.	Cultivo de las microalgas	43
2.4.	Parámetros fisicoquímicos en la cámara de aclimatación	44
2.5.	Medidas de crecimiento y producción	45
2.5.1.	Curvas de crecimiento.....	45
2.5.2.	Medidas de producción	46
2.5.3.	Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación.....	46
2.5.4.	Determinación de la fluorescencia de la Clorofila a	47
2.6.	Primer experimento de enriquecimiento de microalgas a una concentración de <i>KIO3</i> a escala laboratorio	48
2.7.	Segundo experimento de enriquecimiento de microalgas a distintas concentraciones de <i>KIO3</i> a escala laboratorio	49
2.8.	Tercer experimento a escala piloto de enriquecimiento de microalgas a distintas concentraciones de <i>KIO3</i>	50
2.9.	Cosechado de las muestras en los tres experimentos.....	51
2.10.	Análisis de iodo en las muestras	52
2.11.	Análisis estadístico.....	53
3.	RESULTADOS	54
3.1.	Curvas de crecimiento en cultivos de microalgas en cámara de aclimatación	54
3.2.	Datos del primer experimento de enriquecimiento en microalgas a una misma concentración de <i>KIO3</i>	55
3.3.	Datos del segundo experimento de enriquecimiento a distintas concentraciones de <i>KIO3</i> en las especies <i>P. tricornutum</i> y <i>E. cantabrica</i>	59
3.4.	Datos del tercer experimento a escala piloto en <i>PBR</i>'s para la especie <i>Rhodorus marinus</i>	62
4.	DISCUSIÓN	66

4.1.	Primer experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a la misma concentración de iodo en microalgas.....	68
4.2.	Segundo experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a distintas concentraciones de iodo en <i>P. tricornutum</i> y <i>E. cantabrica</i>	70
4.3.	Tercer experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a distintas concentraciones de iodo en cultivo de <i>R. marinus</i> a escala piloto	72
4.4.	Análisis de la asimilación de iodo por parte de las microalgas	74
5.	CONCLUSIONES	75
	REFERENCIAS.....	77

Listado de abreviaturas

ANOVA: Análisis de la varianza
ARA: Ácido araquidónico
BBM: Bold's Basal Medium
BEA: Banco Español de Algas
BKD: Enfermedad bacteriana del riñón
Br: Bromo
Chl a: Clorofila a
CO₂: Dióxido de carbono
COT: Carbono Orgánico Total
Cu: Cobre
d: Días
DHA: Ácido docosaexaenoico
DO: Densidad óptica
EPA: Ácido eicosapentaenoico
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
GABA: Ácido Gamma Aminobutírico
GABA-alanina: Ácido Gamma Aminobutírico-alanina
Hipófisis: Glándula pituitaria
HOI: Ácido hipoiódoso
I: Iodo
I₂: Iodo molecular
I⁻: Ioduro
IO₃⁻: Iodato
Kg: Kilogramos
KI: Ioduro de potasio
KIO₃: Iodato de potasio
L: Litros
L:D: Light:Dark; Luz:Oscuridad; Fotoperiodo
m²: Metros cuadrados
mg: Miligramos
ml: Mililitros
Mn: Manganeseo
N: Nitrógeno
NaIO₃: Iodato de sodio
NB: Nutribloom
NH₄HCO₂: Formato de amonio
NIFES: National Institute of Nutrition and Seafood Research
nm: Nanómetros
NO₃⁻: Nitratos
NR: Nitrato reductasa
OI⁻: Ion hipoiódito

outdoor: Condiciones fisicoquímicas externas
P: Fósforo
PBR's: Fotobiorreactores
PF: Peso fresco
PI: Peso inorgánico
 PO_4^{3-} : Fosfatos
PS: Peso seco
PSSC: Peso seco sin ceniza
PUFA's: Ácidos grasos poliinsaturados
 R^2 : Coeficiente de regresión
Raceway: “piscina de cultivo exterior”
sd: Desviación típica
SEEN: Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición
SGR: Tasa específica de crecimiento
T: Toneladas
T3: 3,3',5-L-triyodo-L-tironina / Triiodotironina
T4: 3,3',5,5-tetrayodo-L-tironina / Tiroxina
 t_d : Tiempo de duplicación
THs: Hormonas tiroideas
TI: Ioduro de timol
ULPGC: Universidad de Las Palmas de Gran Canarias
WSB: “*Wax Spray Beds*”
 $[CH_3Hg^+]$: Metilmercurio
 λ : Longitud de onda
 μg : Microgramos
 μm : Micrometros; micras
 μmol : Micromol/es; micromolar
 μs : Microsegundos

Listado de Figuras

Introducción

- Figura 1:** Evolución de la acuicultura general en los últimos años. Fuente: FAO, 2020..18
- Figura 2:** Gráfico explicativo donde se presenta el propósito general de este trabajo. En primer lugar, el enriquecimiento de microalgas para posteriormente, ser alimento para el zooplancton y que éstos tengan un mayor contenido en el elemento de enriquecimiento. Finalmente, este zooplancton será alimento de larvas de peces las cuales se verán beneficiadas por el enriquecimiento inicial.36

Material y métodos

- Figura 3:** *Isochrysis galbana* al microscopio. Observada con un aumento del 40x y escala de 50 µm.....38
- Figura 4:** *Microchloropsis gaditana* al microscopio. Se observó con un aumento del 100x y escala 20 µm.....39
- Figura 5:** *Parachlorella sp.* al microscopio. Observada con aumento 40x y escala de 50 µm.....40
- Figura 6:** *Phaeodactylum tricorutum* al microscopio. Observada a un aumento de 40x y escala de 50 µm.....41
- Figura 7:** *Euglena cantabrica* vista al microscopio, con un aumento del 40x y escala de 50 µm.....42
- Figura 8:** *Rhodosorus marinus* vista al microscopio, con un aumento del 40x y escala de 50 µm. Se observan medidas del diámetro de las células.43
- Figura 9:** Cultivos de las cuatro cepas de agua salada en la cámara de aclimatación en el BEA donde poseen aporte de carbono mediante los conductos de dióxido de carbono y, luz tanto en la parte superior como inferior, del recipiente de cultivo.....44
- Figura 10 y 11:** Cultivos de *I. galbana* y *Parachlorella sp.* a una misma concentración de KIO_3 en el tiempo inicial (9) y final (10) respectivamente.....49
- Figura 12 y 13:** Cultivos de *P. tricorutum* y *E. cantabrica* a distintas concentraciones de KIO_350
- Figura 14:** Cultivos de *R. marinus*. Control (izq.) y enriquecido (der.) a una concentración de 20 µM de KIO_3 a escala piloto.....51

Resultados

- Figura 15:** Gráfica de las curvas de crecimiento de las especies de microalgas durante el proceso de aclimatación. En el eje Y se encuentran los valores obtenidos de la diferencia entre las longitudes de onda (750-680 nm)55
- Figura 16:** Medias de producción encontradas en la especie *Phaeodactylum tricornutum* desplegados gracias a la exposición en diferentes concentraciones de iodato de potasio.61
- Figura 17:** Medias de producción encontradas en la experiencia de enriquecimiento a distintas concentraciones de iodo para la especie de agua dulce *Euglena cantabrica*.....62
- Figura 18:** Medias de producción en las poblaciones control (18.69 mg/L*día) y en la enriquecida en iodo (6.49 mg/L*día). Encontrándose en las barras de error las desviaciones típicas pertinentes de ambas medias.....65
- Figura 19:** Asimilación de nitratos tanto en la población control (1.62 mg/L*día) como en la enriquecida en iodo (1.00 mg/L*día)65
- Figura 20:** Se observan las medias de asimilación de fosfatos tanto en la población control (1.52 mg/L*día) como en la enriquecida en iodo (1.30 mg/L*día). Encontrándose en las barras de error las desviaciones típicas de cada una de ellas.....66

Listado de tablas

Material y métodos

Tabla I: Detalles de la experiencia realizada con diferentes concentraciones de iodato de potasio donde se puede apreciar la cantidad volumétrica que se debe añadir a los cultivos desde la disolución de 0,005M de KIO_3 para conseguir la concentración requerida y donde, además se puede apreciar la concentración del ion iodo con mg/L como unidades.....50

Resultados

Tabla II: Datos de producción, tasa de crecimiento (SGR) y tiempo de duplicación (td) para la especie *Isochrysis galbana* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.56

Tabla III: Datos para la especie *Parachlorella sp.* presentados a través de las medias y desviaciones típicas de las siguientes variables y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.....56

Tabla IV: Datos de productividad, SGR y td para la especie *Phaeodactylum tricornutum* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.....57

Tabla V: Datos de producción, SGR y td para la especie *Microchloropsis gaditana* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.....57

Tabla VI: Productividad, SGR y td para la especie *Euglena cantabrica* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.....58

Tabla VII: Tabla de los valores estadísticos correspondientes a la prueba *t-student* (t (p-valor)) para cada especie, encontrando pruebas según la variable producción (mg/L*día) o tiempo de duplicación (td (horas))58

Tabla VIII: Tabla de valores medios de productividad para la especie *Phaeodactylum tricornutum* en el experimento a distintas concentraciones. Encontrándose también el valor estadístico arrojado por el *ANOVA*.....59

Tabla IX: Tabla de valores medios de productividad para la especie *Euglena cantabrica* en el experimento a distintas concentraciones y sus respectivas desviaciones típicas.

Encontrándose también el valor estadístico arrojado por el <i>ANOVA</i> a las réplicas en cada concentración.....	60
Tabla X: Valores de F y <i>p-valor</i> para los análisis de la varianza (<i>ANOVA</i>) entre las producciones control y las expuestas a distintas concentraciones de iodo, encontradas para ambas especies.....	60
Tabla XI: Tabla de valores arrojados por la especie <i>R. marinus</i> gracias al experimento a escala piloto. Encontramos las medias de producción, tasa de crecimiento (SGR), tiempo de duplicación (td), asimilación de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}), F0, producción de clorofila a (Chla) y ficoeritrina tanto en los controles como en los enriquecidos. Del mismo modo, encontramos los valores de F (p-valor) de todos los <i>ANOVA</i> 's realizados a las distintas variables.....	63
Tabla XII: Valores de t y <i>p-valor</i> para los análisis de las medias (<i>T-student</i>) entre las producciones control y las expuestas al iodo. Datos sobre estos análisis según la producción, tasa de crecimiento (SGR), asimilación de nitratos y fosfatos así como, la tasa de F0, producción en clorofila a y ficoeritrina.	64

Resumen

Es bien sabido que el yodo es parte indispensable del correcto desarrollo tanto del ser humano como de otros organismos, por lo que es interesante ahondar en el estudio del enriquecimiento con yodo en productos para satisfacer la deficiencia de este elemento. Las microalgas han conseguido posicionarse como una alternativa sostenible dentro de la alimentación en acuicultura. En este trabajo se valora el crecimiento y producción de seis cepas de microalgas enriquecidas a distintas concentraciones de yodo a saber, *Isochrysis galbana*, *Parachlorella sp.*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Euglena cantabrica* y *Rhodosorus marinus*. El enriquecimiento de estos experimentos se realizó mediante el elemento yodato de potasio (KIO_3) con un intervalo de concentración de [1.5-20 μ M] dependiendo de la experiencia. Se realizaron tres experimentos en total, dos de ellos a escala laboratorio, cultivando las microalgas en cámara de aclimatación a temperatura, luz, humedad y aporte de carbono controlados. El tercero, se realizó a escala piloto gracias a PBR's de 40 L en invernadero en condiciones "outdoor", donde sólo se aportaba de manera artificial aireación con CO_2 . Los datos arrojados por el primer experimento nos indican un efecto negativo del crecimiento en la especie *I. galbana*, sin embargo, en las especies *Parachlorella sp.* y *Nannochloropsis gaditana*, se pudieron apreciar diferencias significativas en el crecimiento. En cambio, las cepas *E. cantabrica* y *P. tricorutum* generaron las mayores producciones. En el segundo experimento se procedió a seleccionar las especies más productivas, exponiéndolas a diferentes concentraciones de yodo, de este modo se pudo apreciar que la población expuesta a 3 μ M fue la más productiva en ambas especies. El último experimento, realizado a escala piloto, nos confirma que altas dosis (20 μ M) del elemento en cuestión generan un efecto negativo en la especie *Rhodosorus marinus*. En conclusión, queda de manifiesto que una dosis controlada de KIO_3 optimiza la producción de ciertas especies de microalgas, lo que las sugiere como un enriquecedor sostenible para su uso en acuicultura.

Abstract

It is a well known fact that iodine is an essential part in the correct development of the human being, among other living organisms, which is why it is interesting to deepen in the study of product enrichment with iodine in order to satisfy the deficiency of this previous element. The micro-algae have positioned themselves as a sustainable alternative within aquaculture nutrition. In this assignment we have valued the growth and production of six strains of micro-algae, enriched with different concentrations of iodine, such as *Isochrysis galbana*, *Parachlorella sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Euglena cantabrica* y *Rhodorus marinus*. The enrichment of these experiments was conducted by the element of potassium iodate (KIO_3) with a concentration interval of [1.5-20 μM] depending on experience. Three experiments have been carried out, two of them at laboratory scale, cultivating the micro-algae in an acclimatization chamber, with controlled temperature, light, humidity and carbon contribution. The third one, carried out at pilot scale due to PBR's of 40 L at a greenhouse, with outdoor conditions, where only carbon dioxide (CO_2) airing was provided artificially. The generated data of the first experiment indicate a negative effect in the growth of specie I, *galbana*. Nevertheless, in the species *Parachlorella sp.* and *Nannochloropsis gaditana*, significant differences were appreciated in their growth. However, the strains *E. cantabrica* and *P. tricornutum* generated the largest productions. In the second experiment the most productive species were selected, and they were exposed to different iodine concentrations. Thereby, it was esteem that the settlement exposed to 3 μM was the most productive one within both species. The final experiment, carried out at pilot scale, confirms that a high dose (20 μM) of the element at issue generate a negative effect in the *Rhodorus marinus's* specie. To sum up, a controlled dose of KIO_3 optimizes the production of certain species of micro-algae, suggesting them as a sustainable enriching element for its use in aquaculture.



1. INTRODUCCIÓN

En 1890 comenzó el estudio de las microalgas desde el punto de vista biotecnológico, con los estudios del microbiólogo holandés Beijerinck, que realizó el primer cultivo de la especie de agua dulce *Chlorella vulgaris*. Las microalgas forman parte del plancton y, pueden llegar a ser sustitutos sostenibles de productos de uso común de origen animal o vegetal. A lo largo de estos últimos años, se han experimentado las posibilidades de uso de estos organismos en diferentes aplicaciones industriales. Las oportunidades y beneficios del cultivo de microalgas hoy en día son variadas, destacando: la producción de biomasa para alimentación humana o animal, la retirada de CO_2 o la producción de metabolitos de alto valor. Desde un punto de vista medio ambiental también se pueden encontrar referencias de los beneficios propiciados por estos cultivos. Hernández-Pérez y Labbé (2014) realizaron un estudio de la capacidad “*ficorremediadora*” que poseen las microalgas. Estas son consideradas amigables con el medio ambiente por su capacidad de reciclar nutrientes inorgánicos de líquidos y gases integrándolos en su metabolismo para la producción de biomasa, la cual puede ser utilizada desde el punto de vista industrial. En función de la variedad de metabolitos primarios y secundarios entre los que destacan polisacáridos, aminoácidos, enzimas, proteínas y otros elementos complejos que son variables en concentración según la especie, las microalgas son valoradas como candidatas para una futura nutrición tanto humana como animal. La tecnología en cuanto a la producción de la biomasa de microalgas se encuentra aún en desarrollo. Abalde *et al.* (1995) reconocen las limitaciones en el desarrollo industrial de la biotecnología de microalgas debido a los altos costes de producción y la posterior baja rentabilidad de dichos rendimientos, siendo éste un inconveniente de la industria. Estas consideraciones han mejorado en los últimos años, siendo esencial que el cultivo y procesado de las microalgas se puedan realizar de forma económicamente rentable, garantizando una

producción de bajo coste que pueda competir con las producciones de otros organismos de la industria (Barkia *et al.*, 2019).

A continuación, se resumen las especies de microalgas más producidas y sus usos en distintas industrias: en el campo de la nutrición, las cepas más comercializadas son *Chlorella* y *Spirulina*. Más específicamente, *Spirulina* (*Arthrospira*) ha sido descrita por su crecimiento natural en lagos alcalinos. Según Shimamatsu en 2004 ya se producían más de 3000 toneladas (T) de peso seco gracias a distintas empresas mundiales. La mayor parte de esta producción va dirigida a suplementos nutricionales proteicos conocidos como “alimentos saludables”. En menor medida se comercializa como alimento sobre todo para la acuicultura animal y como colorante alimenticio propiciando un color azul debido a la ficocianina (Shimamatsu, 2004). *Dunaliella salina* proporciona actividad antioxidante gracias a los β -carotenos y a ácidos grasos como el oleico, compuestos importantes para campos como la cosmética. *Haematococcus pluvialis* es cultivada para la producción de astaxantina, que genera beneficios antioxidantes, pero además esta cepa contiene otros compuestos que previenen el cáncer y es considerada como inmunomoduladora. Otras cepas como *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana* o *Phaeodactylum tricornutum* son cultivadas para la acuicultura (Borowitzka, 1999; Hors, 2011). En definitiva, las microalgas son generadoras de productos de alto valor añadido que pueden estar enfocados a numerosas industrias (Plaza *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2017).

La acuicultura se especializa en el cultivo de organismos que habitan en el agua, bien sea dulce o salada. Se trata de una técnica relativamente moderna que surgió debido a variadas causas, y más específicamente las derivadas de la limitación de recursos

acuáticos determinados por un mal uso y abuso, en la explotación medioambiental de los mares y océanos. Como objetivo, la acuicultura busca la capacidad de renovar dichos recursos sin acabar con los encontrados en la naturaleza por lo que se encarga de todos los aspectos encaminados hacia las mejoras en la producción de organismos acuáticos desde la reproducción hasta la distribución final del producto. Es importante destacar la constatación de que el crecimiento de la población mundial y la disponibilidad de productos alimenticios terrestres es un problema reconocido a nivel mundial. En el informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2020, se confirma el declive en las capturas mundiales marinas a través de la pesca y se valora el crecimiento de la acuicultura en el aporte de productos marinos a nivel mundial, con un total de 114.5 millones de toneladas (T) de peso vivo en 2018. Particularmente, se registraron en el mismo año 87.000 T de microalgas cultivadas procedentes de 11 países diferentes, siendo China la productora de 86.600 T de este total (**Figura 1**). Además de generar un producto de consumo humano directo, estas microalgas son parte de la alimentación en estados larvarios de peces, crustáceos (Spolaore *et al.*, 2006; Hernández-Pérez *et al.*, 2014) y fuente principal de moluscos filtradores los cuales, representan el 56.2% de la producción acuícola total (FAO, 2020).

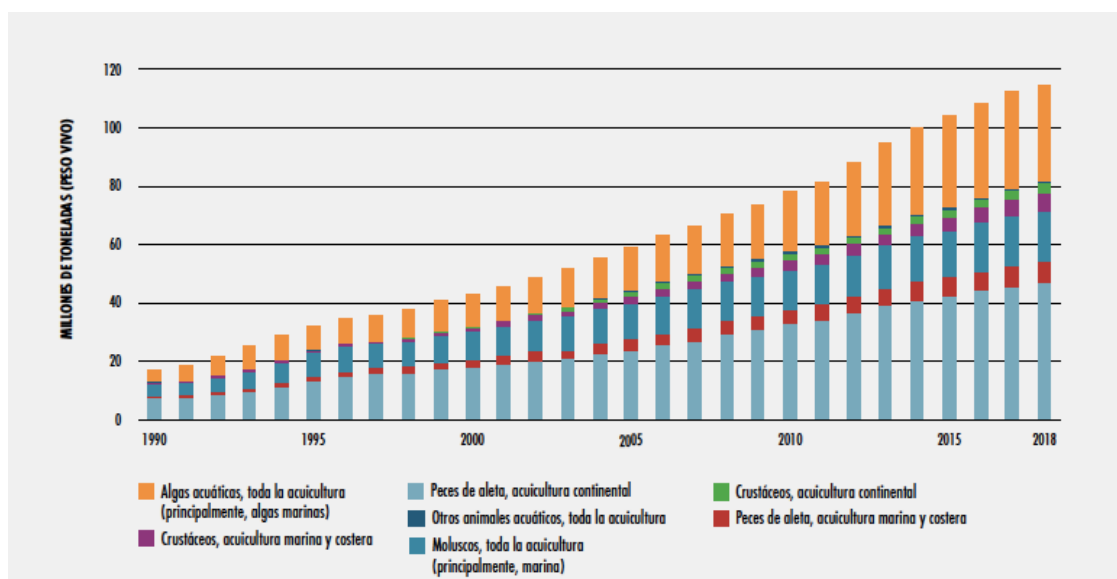


Figura 1: Evolución de la acuicultura general en los últimos años. Fuente: FAO, 2020.

El cultivo larvario incluye el período de tiempo que transcurre desde que los huevos son expulsados al medio hasta que alcanzan el grado y tamaño de alevines. La producción final dependerá de estos individuos por lo que el objetivo principal de esta fase reside en la obtención de larvas sanas y con buena tasa de supervivencia, teniéndose en consideración el desarrollo embrionario y los requerimientos ambientales y nutricionales que posea la especie en producción. El cultivo larvario de las especies más producidas, como la dorada (*Sparus aurata*) o la lubina (*Dicentrarchus labrax*), han sido ya estudiados y verificados presentando resultados satisfactorios, la problemática se manifiesta con otras especies de menor producción que se están estudiando con el objetivo de diversificar los productos de la acuicultura (APROMAR, 2019).

1.1. Importancia de la nutrición en la acuicultura

El término nutrición incluye varias fases consecutivas: el comportamiento alimentario y la ingesta del alimento; la digestión y absorción de los nutrientes; el metabolismo y retención de los nutrientes y la excreción de productos de desecho

(Navarro y Fernández, 2009). Gracias a una buena nutrición, se consiguen individuos que disponen de buen metabolismo y sistema inmune, además se consiguen filetes de pescado con un mayor y mejor contenido nutricional. A modo de resumen, se hará hincapié en algunos macros- y micronutrientes y, su respectiva distinción.

1.1.1. Proteínas

La importancia de estas macromoléculas reside en la esencialidad de éstas para el crecimiento de un organismo, asimismo ayudan a la síntesis y mantenimiento de ciertos tejidos como los musculares. Los costes de alimentación en acuicultura son del 30 al 50% de los costos totales y además, las fuentes proteínicas en su mayoría provienen de harinas de pescado, que en los últimos años han incrementado sus precios (Requeni, 2007). Como consecuencia, se buscan sustitutos de estos recursos de forma alternativa a las harinas de pescado siendo alguna de estas: las harinas de insectos, de vegetales, de sangre, krill o de microalgas (Barroso *et al.*, 2013; Vizcaíno, 2017). Asimismo, es objeto de estudio el comportamiento en la digestión y metabolismo del organismo bajo estas fuentes alternativas (Amirkolaie *et al.*, 2005).

1.1.2. Lípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas relevantes en la nutrición humana y animal, debido a que son una fuente de energía esencial, ayudan al correcto funcionamiento de las membranas celulares y son indispensables para la formación de hormonas y vitaminas. Además, desde el punto de vista organoléptico afectan a la textura, sabor y calidad nutritiva de los alimentos.

Desde el punto de vista de la nutrición en acuicultura, la fuente de lípidos en los piensos proviene del aceite de pescado. Esta fuente deriva de pequeñas especies pelágicas de peces marinos de menor precio, que en países en vías de desarrollo son importantes para la seguridad alimentaria, mientras que en otros son procesados para la producción de harinas y aceites de pescado. La tasa de inclusión de estas fuentes de lípidos ha mostrado una baja tendencia ya que se usan de una forma más selectiva debido a la fluctuación de sus precios en el mercado (FAO, 2020).

En el cultivo larvario los ácidos grasos esenciales poseen funciones vitales en el desarrollo, éstos no pueden ser sintetizados por las larvas, haciéndose imprescindible su aporte mediante dieta específica (Izquierdo, 1996; Izquierdo y Kowen, 2010), siendo los más importantes los ácidos poliinsaturados (PUFAs) como los ácidos docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y araquidónico (ARA).

Como alternativa sostenible se han incluido aceites vegetales con altos contenidos en PUFA's en la dieta de organismos cultivados (Caballero *et al.*, 2002; Narejo, 2006). Las microalgas son una de las fuentes que podemos encontrar en el medio natural de estos ácidos grasos poliinsaturados. Liu *et al.*, (2013) consiguió una producción de 13.6 miligramos por litro y día (mg/L*d) de DHA en la especie *Isochrysis galbana*. Además, estas microalgas productoras de ácidos grasos esenciales también pueden ser empleadas con otros fines, como la producción de peces ornamentales (Basford *et al.*, 2020).

1.1.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El pienso para peces tiene un alto contenido en nutrientes lipídicos (PUFA's) por lo que

son susceptibles a la oxidación. Las marcas comerciales de piensos utilizan antioxidantes sintéticos, estos pueden acumularse en el producto final de consumo humano (Bohne *et al.*, 2008), debido a esta causa, se buscan antioxidantes naturales que resulten óptimos en los piensos de organismos cultivados, como puede ser el extracto de romero (Hernández *et al.*, 2011).

La importancia de los antioxidantes no sólo reside en la acuicultura, sino también en campos como la cosmética o la nutracéutica. Figueroa *et al.* (2011), realizaron ensayos en diez especies de macroalgas con el objetivo de encontrar moléculas antioxidantes y fotoprotectoras. En sus resultados pudieron observar que tres extractos de macroalgas (*Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*) poseían alta actividad antioxidante por el contenido en polifenoles. Podemos encontrar también este tipo de compuestos en microalgas, Gómez *et al.* (2016) encontraron compuestos fenólicos en cuatro especies, llegando a la conclusión de que la concentración más alta de antioxidantes se encontró en cultivos de microalgas verdes, específicamente de las especies *Tetraselmis chuii* y *Dunaliella tertiolecta*.

1.1.4. Pigmentos

Los pigmentos son los responsables del amplio abanico de colores que podemos encontrar en la naturaleza debido a que son moléculas capaces de absorber la radiación luminosa según las diferentes longitudes de onda (λ). Como se describe anteriormente, la cepa *Dunaliella salina* es una gran fuente de pigmentos β -carotenos (Cifuentes *et al.*, 1996) que generan un color anaranjado y poseen una función antioxidante. Otras moléculas como la luteína, los carotenoides, el licopeno y la astaxantina generan el mismo objetivo, proteger los tejidos expuestos al daño por la luz (Stahl y Sies, 2012).

La especie *H. phuvialis* es capaz de acumular astaxantina como respuesta al estrés nutricional o ambiental. En concreto esta acumulación se relaciona con el cambio de etapa de células verdes vegetativas biflageladas a células en reposo no móviles y de mayor tamaño (Boussiba y Vonshak, 1991). Kobayashi *et al.* (1997), llegaron a la conclusión de que esta asimilación es una respuesta adaptativa de esta cepa frente al estrés oxidativo, por lo que se trata de un sistema de defensa frente a condiciones ambientales adversas generado a lo largo de la evolución de esta especie. El hecho de que esta molécula también se considere un buen antioxidante hace que los ámbitos nutricional y farmacéutico puedan comercializarla a gran escala (Shah *et al.*, 2016).

Velasco-Garzón y Gutiérrez-Espinosa (2019) evaluaron la importancia de la nutrición en peces ornamentales. Por ejemplo, desde la perspectiva de los pigmentos, estos no pueden ser sintetizados por dichos organismos, por lo que deben ser facilitados a través de la dieta. Igualmente, en peces ornamentales la coloración es muy extensa e importante siendo a veces un requisito de calidad que a su vez determina el precio de ciertas especies. Igualmente, estas moléculas son de gran importancia para algunas especies de moluscos gasterópodos como *Haliothis rufescens* debido a la coloración de su concha, la cual puede ser comercializada con valor adicional (Canales-Gómez *et al.* 2010).

1.1.5. Micronutrientes

Los micronutrientes, aunque requeridos en menor concentración, son esenciales para la vida de algunos organismos. Los micronutrientes (<100 mg/kg de materia seca) también conocidos como oligoelementos o elementos traza, son esenciales para funciones bioquímicas en el metabolismo de muchos organismos afectando, entre otros, al

crecimiento, la fertilidad, el desarrollo de huesos y músculos y la resistencia a enfermedades (Olivares *et al.*, 2012; Houn-Yung *et al.*, 2014). Por todo esto, el control de estos nutrientes en el cultivo de organismos marinos es de alta consideración para una producción satisfactoria. La disponibilidad y utilización de los minerales en las dietas para peces dependerá de la fuente, forma del elemento, interacción entre estos y otros minerales o nutrientes y por supuesto, de la capacidad para almacenarlos que posea la especie. Algunos de estos microelementos son el hierro, manganeso, zinc, cobre y el yodo (Houn-Yung *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2016).

1.2. Iodo

El yodo (Courtois, 1811) (I) es un elemento no metálico de la familia de los halógenos (Wisniak, 2001). Para Sumar e Ismail (1997), el yodo es uno de los primeros elementos reconocidos como nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de animales y humanos. También es reconocida su importancia en medicina como antiséptico cuya función es la de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos sobre tejidos vivos o en la industria como colorante y reactivo (Arévalo *et al.*, 1998; Diomedi *et al.*, 2017).

1.2.1. La química del yodo

El océano se puede considerar como la principal fuente en el ciclo geoquímico del yodo. La concentración media en los ambientes marinos es alrededor de 0.5 micromolar (μM) en la mayoría de los océanos. La forma química termodinámicamente más estable es el iodato (IO_3^-) pero el yoduro (I^-) puede simbolizar una parte representativa del yodo total en aguas de alta producción primaria (Bergeijk *et al.*, 2013).

Truesdale (1978) comenzó a visualizar la necesidad de estudiar los iones yoduro generados en el procedimiento de reducción del iodato, debido a procesos que ocurren de forma natural en los océanos. Además, se esperaba que el máximo efecto de esta transformación tuviera lugar en zonas costeras y en la superficie de zonas oceánicas, ya que son aguas que tienen alta productividad primaria.

El fitoplancton puede ser un reductor significativo en este proceso de reducción iodato-yoduro (Cuesta y Manley, 2009). Tsunogai y Sase (1969) concluyeron que el mecanismo de la reducción de iodato es consecuencia a la acción de la enzima nitrato reductasa (NR) que está contenida en varios tipos de organismos que viven en el agua de mar. Sin embargo, Hung (2005) no pudo comprobar que el yoduro se forme en los océanos por una reacción biológicamente mediada por parte del fitoplancton como resultado de la actividad de la NR.

Bluhm (2010) formuló que la reducción de iodato a yoduro se observó en su experimento principalmente en fases tardías del crecimiento celular del cultivo. Además, éstas se cultivaron en medios con gran cantidad de nitratos (NO_3^-) llegando a la conclusión de que dicha reducción no está relacionada con la disponibilidad de NO_3^- sino, más bien, con la viabilidad de las células.

1.2.2. Importancia del yodo para organismos vivos

La glándula pituitaria (hipófisis) produce y secreta hormonas que se encargan de diferentes procesos fisiológicos como la reproducción. Además, participa en procesos de crecimiento y desarrollo normal de los individuos a través de las hormonas tiroideas (THs), como la triiodotironina (T3) o la tiroxina (T4). Implicándose todas éstas en un

proceso de retroalimentación negativo en el eje de las glándulas Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides, como describen Farebrother *et al.* (2019).

En el cuerpo humano podemos encontrar moléculas de iodo, como la T4, encargada de regular el metabolismo basal. De acuerdo con Bartet (2002), la deficiencia o exceso de iodo en el cuerpo humano es un problema mundialmente reconocido y estudiado, al igual que sus afecciones como el bocio o hipertiroidismo, y su tratamiento a base de yoduro de potasio (KI) (Vanderpas, 2006).

El estudio de las fuentes de iodo ha variado muchísimo a lo largo de los años, las “calicheras” en Chile fue el primer lugar estudiado, donde se encontró la presencia de dicho elemento en forma de iodato de sodio ($NaIO_3$). Como exponen Weng *et al.* (2014), la principal fuente natural de iodo a lo largo de los años ha sido el pescado, los mariscos y algas en general. Por lo que en zonas no costeras existe un déficit de este elemento, siendo necesaria la suplementación. Una de las soluciones que se presentan en este artículo es el posible uso de fertilizantes enriquecidos en iodo a través de microalgas, para el cultivo de frutas y verduras.

1.2.3. Asimilación y transformación del iodo por los vegetales marinos

Hernández, (2014) estudió la síntesis de THs en microalgas a través del balance del iodo y su influencia sobre el crecimiento. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos y moleculares que permiten a las microalgas acumular el iodo y procesarlo son aún desconocidos.

Hepach *et al.* (2020) estudiaron las características más comunes en la reducción del iodato a yoduro gracias a una amplia gama de fitoplancton marino. Encontrando en sus resultados que el rendimiento del yoduro es significativamente mayor en cultivos en etapas de senescencia tardía, y en consecuencia proponen que los modelos basados en el ciclo inorgánico del yodo pueden estar ligados a modelos ecosistémicos marinos a través de la mortalidad del fitoplancton. En sus conclusiones, declaran que en el futuro los diferentes estudios que se elaboren deberían centrarse en la relación existente entre la amplia variedad de factores ambientales y fisiológicos de la muerte celular que pudieran influir en el rendimiento del yodo.

1.2.4. Formas químicas que aseguren buena disponibilidad del elemento

Las formas químicas de yodo que existen en el agua son, el yoduro (I^-), yodo molecular (I_2), ácido hipoyodoso (HOI), el ion hipoyodito (OI^-) y el iodato (OI_3^-). La forma menos estable termodinámicamente hablando, es el yoduro (Tsunogai y Sase, 1969), y la más estable el iodato (OI_3^-) (Bergeijk *et al.*, 2013).

En la biosfera marina el yodo se encuentra mayoritariamente en los organismos vivos por lo que se le ha descrito como un elemento biofílico. En su relación con la migración hacia aguas naturales y a la atmósfera, se le cataloga como hidrofílico y atmosfílico (Hernandez, 2014) respectivamente.

1.3. La importancia del yodo en la acuicultura

1.3.1. Antecedentes de la inclusión de yodo en dietas enfocadas a la acuicultura

La inclusión de yodo en las dietas se ha estudiado con anterioridad con el fin de controlar algunas enfermedades. Lall *et al.* (1985) usaron las modificaciones en dietas

para controlar la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) en el salmón atlántico (*Salmo salar*). Éstos llegaron a la conclusión de que la suplementación de las dietas en elementos traza puede proveer un mecanismo protector para superar la progresión de la BKD.

Geven *et al.* (2007) realizaron una tiroidología comparativa entre dos especies, la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*). En sus conclusiones examinaron que la característica más distintiva de la fisiología tiroidea de peces teleósteos es la presencia de una glándula tiroidea endocrina completamente funcional en los tejidos renales. Asimismo estudiaron la síntesis de THs, la actividad del tejido tiroideo y la excreción de dichas hormonas. Sin embargo, se observó que esta hormona puede ser alterada por otros elementos. Por ejemplo, el Metilmercurio ($[CH_3Hg^+]$) genera una inhibición de la síntesis, secreción y metabolismo de la hormona tiroidea, a causa de esto, el sistema neurológico se puede ver afectado (Soldin *et al.*, 2008).

En el Instituto Nacional de Investigaciones en Nutrición y Productos del mar (NIFES) en Noruega, Julshamn *et al.* (2006) realizaron un estudio preliminar sobre la concentración de iodo en los filetes de salmón Atlántico (*Salmo salar*) alimentados con dietas suplementadas durante su fase de engorde. Como ya se ha comentado anteriormente, se conoce que la función de la glándula tiroidea y el estado de sus hormonas están relacionados con la nutrición y metabolismo. El iodo contenido en las muestras de este estudio fue relativamente bajo, pero debido a que es posible aumentar el nivel de este elemento gracias a dietas suplementadas, es viable obtener porciones de salmón que posean el requerimiento nutricional adecuado para consumo humano. Indistintamente, Moren *et al.* (2006) encontraron mayor contenido de iodo en los filetes del halibut

atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), utilizando en su caso el enriquecimiento de *Artemia* en iodo durante su etapa larvaria.

Valente *et al.* (2015) atendieron al efecto de la adición de la macroalga roja *Gracilaria vermiculophylla* en la dieta de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) enriqueciéndola en iodo. A consecuencia de esta inclusión, demostraron que la dieta al 5% de *G. vermiculophylla* puede contribuir al enriquecimiento nutricional de los filetes de trucha ya que duplica su contenido en iodo. Asimismo, un mayor nivel de *G. vermiculophylla* en la dieta de la trucha perjudica el crecimiento. Sin embargo, en la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) la inclusión de *Ulva sp.* parece ser que puede sobrepasar este porcentaje hasta llegar a un 10% sin efectos sobre el crecimiento o las propiedades organolépticas del filete mientras que mejora la respuesta inmune de esta especie (Valente *et al.*, 2015a). De igual forma, se estudió en larvas de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) encontrándose una modulación mínima de la actividad enzimática digestivas en dietas con suplementación con *Ulva spp.* (Valente *et al.*, 2006). Se generan igualmente aumentos en el sistema inmune gracias a macroalgas rojas y por consiguiente, la suplementación de algas marinas en alimentos acuícolas puede ser una gran herramienta para aumentar la inmunocompetencia de ciertas especies al generarse un mayor contenido nutritivo, en ciertos elementos como puede ser el iodo y al mismo tiempo incrementando su crecimiento (João *et al.*, 2016).

1.3.2. Requerimientos de iodo en animales y humanos

Según la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), la ingesta de iodo recomendada para los humanos en la etapa adulta es de 150 microgramos (μg) /día. Algunos filetes de pescado, como el Salmón Atlántico, contienen 30 μg de iodo (I)

alimentados con dietas sin enriquecer. Aquellos animales que han sido cultivados con dietas enriquecidas en iodo pueden sobrepasar esta ingesta recomendada, encontrando en filetes de salmón alimentados con dietas enriquecidas (180 µg de I), por lo que se tendrá que ser cuidadoso en la concentración encontrada en dichos filetes para no provocar afecciones (Julshamn *et al.*, 2006).

Hamre *et al.* (2002), estudiaron la importancia de las presas (*Artemias* y copépodos (*copepoda*)) con las que se alimentan las larvas del halibut atlántico para generar diferencias en los estados de metamorfosis con lo que se constata, que la nutrición es un importante factor para el desarrollo normal de las larvas. En sus conclusiones repararon en los decrecimientos en el desarrollo de las larvas alimentadas con *Artemias* debido a la composición de macronutrientes de éstas. Además, en *Artemias* se encuentra un bajo nivel de iodo que puede inhibir la síntesis de tiroxina y consecuentemente afectar a la migración del ojo de las larvas que fueron alimentadas con éstas.

Existen estudios donde se experimenta con los requerimientos de iodo y su toxicidad en larvas de peces como los realizados por Penglase *et al.* (2013) que estudiaron la toxicidad y nutrición de este elemento en larvas de bacalao (*Gadus morhua*). Sugiriendo finalmente que el bacalao precisa de un requerimiento de aproximadamente 3.5 miligramos (mg)/kg de iodo aportado a base de rotíferos (*rotifera*) enriquecidos. Igualmente se observó que a medida que se aumentaba el enriquecimiento en I de los rotíferos, las larvas de bacalao fueron de tamaño más pequeño. Srivastava *et al.* (2012) estudiaron diferentes fuentes de iodo para enriquecer rotíferos encontrando los mejores resultados gracias al ioduro de timol (TI). Penglase *et al.* (2015) realizaron un estudio sobre enriquecimiento de rotíferos con varios minerales como son el Manganeseo (Mn),

Cobre (Cu) e Iodo. En este estudio las larvas fueron alimentadas con las presas dos horas después del enriquecimiento, en conclusión encontraron un alto nivel de dicho elemento en los rotíferos enriquecidos, siendo para el iodo 8 mg/kg de materia seca, muy superior al requerimiento de 3.5 mg I/kg predicho anteriormente en otros estudios (Penglase *et al.*, 2013) para los requerimientos en larvas de bacalao.

1.3.3. Importancia del iodo en la nutrición del cultivo larvario de peces marinos

Según Pascual y Yúfera (1987), la alimentación es uno de los factores más limitantes a la hora de realizar el cultivo larvario de peces marinos. Esta fase de la acuicultura va ligada a la obtención de presas vivas acordes al tamaño y requerimientos nutricionales de cada fase del desarrollo larvario, hasta llegar a una transformación alimenticia donde se introducen nutrientes inertes conocida como, “*Fase de Destete*”. No obstante, se hace necesario generar estudios que determinen el tipo y variedad de alimentos que utiliza la naturaleza para nutrir a las larvas en su medio natural con el fin de obtener unos ejemplares sanos y con la menor tasa de mortalidad posible.

Por consiguiente, es necesaria la alta producción de presas vivas de forma sincronizada al cultivo larvario, denominándose a esta producción “*cultivos auxiliares*”, siendo los más habituales los de microalgas, rotíferos, *Artemia* y copépodos (estos últimos son el alimento natural de dichas larvas). Estas presas se pueden clasificar en dos grandes grupos, fitoplancton y zooplancton, encargados de la producción primaria y secundaria en las cadenas tróficas que se encuentran en el océano.

Por otra parte, existen especies que sufren grandes metamorfosis, como el lenguado (*Solea senegalensis*) del orden de los *Pleuronectiformes*. Durante esta fase crítica en el

periodo larvario, una larva pelágica se transforma en un juvenil bentónico. No solo existen cambios en su morfología sino también en su alimentación y fisiología digestiva (Tanaka *et al.*, 1996). Es conocido que la deficiencia de iodo en la dieta puede crear hipotiroidismo y bocio en peces a consecuencia de unos niveles bajos de T3 y T4. Asimismo, algunos estudios demuestran que el enriquecimiento de presas vivas con iodo es esencial para peces criados en sistemas de recirculación con inyección de ozono al mantener un desarrollo normal de las larvas (Ribeiro *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Del mismo modo, en larvas de halibut atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) se han realizado estudios entre larvas alimentadas con *Artemia* y otras alimentadas con zooplancton capturado en la naturaleza, encontrándose hasta tres veces más concentración de iodo en las larvas alimentadas con zooplancton natural que con la *Artemia*, siendo ambos grupos alimentados hasta la finalización de su metamorfosis (Solbakken *et al.*, 2002). Se relaciona la concentración de iodo que contienen las presas con la migración del ojo en la fase de la metamorfosis (Hamre *et al.*, 2005).

1.4. Dificultad en el enriquecimiento en iodo en presas vivas enfocadas a acuicultura

El enriquecimiento de organismos zooplanctónicos ha sido un método importante para incorporar los nutrientes necesarios en la dieta de larvas de peces (Prieto y Atencio, 2008). Como se mencionó anteriormente, es conocido por diferentes estudios que la *Artemia* tiene una baja concentración de iodo en comparación con el zooplancton capturado de la naturaleza como pudieran ser los copépodos (Hamre *et al.*, 2002; Solbakken *et al.*, 2002; Moren *et al.*, 2006). Por todo esto, existen estudios donde se enriquecen *Artemias* con nutrientes esenciales, como ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) (Han *et al.*, 2000; Delibano, 2005).

Existen diferentes métodos para enriquecer presas con iodo. Moren *et al.*, (2006), Hamre *et al.*, (2008) y Ribeiro *et al.*, (2012) utilizaron KI para el enriquecimiento de *Artemia*, mientras que otros estudios sugieren los aerosoles de cera (“*wax spray beds*” – WSB). Estos aerosoles consisten en un difusor que genera pequeñas gotas, de cera en este caso, donde se encuentran los nutrientes. Su uso puede mejorar el aporte de sustancias solubles a las presas y este método de enriquecimiento podría dar como resultado una reducción significativa en el coste evitando pérdidas de nutrientes para los larvicultores (Hawkyard *et al.*, 2014). Según los resultados de Langdon *et al.* (2008), se encontraron pérdidas de micronutrientes lábiles que pueden afectar al posterior enriquecimiento y por tanto, a la concentración de dichos nutrientes en el organismo final. Aun así, estiman que estos productos (WSB) pueden ser muy útiles para mejorar la composición nutricional de presas vivas con el propósito de alimentar larvas de peces marinos.

Hawkyard *et al.* (2011), probaron el enriquecimiento con ioduro de potasio (KI) de *Artemia* mediante WSB para la alimentación de larvas del pez cebrá (*Danio rerio*), obteniendo mejoras significativas en: la tasa de supervivencia (posible mejora relacionada con las cualidades antibióticas del KI) y mayor nivel de iodo tisular en las larvas. Fue el primer trabajo en demostrar altos niveles significativos de actividad de THs en *Artemia*.

Por otra parte, los copépodos son presas importantes en la dieta natural de larvas en peces marinos. Con la condición de que las larvas tengan los requisitos necesarios para un buen crecimiento y posterior producción, en la acuicultura se han realizado estudios sobre la producción de estas presas para obtener los requerimientos necesarios para dichas larvas (Mujica *et al.*, 1995). Es importante destacar que la producción de copépodos va ligada a la obtención de cultivos de macroalgas (*Ulva*, *Enteromorpha* y *Porphyra*) y

microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis galbana*). En la naturaleza los copépodos utilizan éstas como fuente de alimentación y hábitat o refugio frente a predadores (Mujica *et al.*, 1995). Sin embargo, en diversos estudios se realiza el enriquecimiento de rotíferos, llegando a encontrar niveles similares de iodo al que poseen los copépodos en la naturaleza (Srivastava *et al.*, 2012). En algunos trabajos recientes se estudia el enriquecimiento de rotíferos con diferentes fuentes para su uso posterior en larvas (Cisneros, 2011; Cruz, 2019; Anaya, 2019).

1.5. Necesidades actuales

En términos generales, hasta ahora se hace hincapié en la importancia de una buena nutrición tanto en humanos como en organismos marinos. Analizando todos los aspectos anteriores y reiterando la importancia de los antecedentes y requerimientos estudiados en diferentes especies de larvas marinas y por distintos autores, se podría construir la idea de que en primer lugar es necesario conocer los requerimientos nutricionales para las especies que se quieran cultivar y además permitan diversificar la acuicultura (APROMAR, 2019; FAO, 2020).

En segundo lugar, la importancia reside en el enriquecimiento de presas vivas aptas para la alimentación de larvas marinas y que tengan los requerimientos nutricionales esenciales para las mismas, no sólo en las del elemento en cuestión en este trabajo sino en todos los macro- y micronutrientes necesarios para un buen crecimiento de dichos organismos. Por otra parte, las microalgas pueden ser una gran fuente de todos estos nutrientes esenciales siendo además sustancial la variabilidad que se encuentran de estos organismos en la naturaleza y por tanto, variabilidad de nutrientes según la cepa utilizada.

Concluyendo, se han realizado estudios con relación al yodo y distintas cepas de microalgas, así como su papel en la naturaleza como captadora de este elemento (Gómez-Jacinto *et al.*, 2010; Bergeijk *et al.*, 2013; Hernández, 2014; Thorenz *et al.*, 2014). Éstas pueden ser utilizadas o bien como alimento directo para larvas de organismos marinos o, para enriquecer otras presas vivas utilizadas como alimento para dichas larvas. Por todo ello, este trabajo se centra en el enriquecimiento de cepas de microalgas con el elemento yodo específicamente.

1.6. Hipótesis y objetivos del trabajo

Para establecer los objetivos del presente trabajo se ha considerado: (1) la poca información existente sobre el efecto de la adición de yodo en el crecimiento y el metabolismo de las microalgas bajo condiciones controladas, y (2) el interés para la selección de cepas que cumplan con los requisitos necesarios para su utilización como fuente de yodo en nutrición en acuicultura.

La hipótesis de partida establece que algunas especies de microalgas: (1) son capaces de crecer, bajo condiciones controladas, en presencia de concentraciones de yodo superiores a las encontradas en el medio natural marino; (2) que la concentración de yodo en el medio puede afectar a las características del crecimiento y la población de biomasa en sistemas de cultivo; y (3) que son capaces de acumular yodo biodisponible para niveles tróficos superiores por lo que pueden ser consideradas como una fuente interesante en nutrición en acuicultura.

El objetivo general del trabajo se centra en la selección de cepas originales de microalgas enriquecidas en yodo para su valoración en el posterior enriquecimiento de

presas vivas para el cultivo larvario de peces marinos. Además, los objetivos específicos que se plantean son:

- Evaluar el efecto de la adición de iodo sobre el crecimiento y la producción de biomasa, bajo condiciones de cultivo, de las cepas preseleccionadas en la Colección del Banco Español de Algas (BEA) en función de su posible interés en acuicultura
- Estudiar el efecto de la concentración de iodo sobre el crecimiento y la acumulación en cepas seleccionadas por su capacidad de respuesta a la disponibilidad de iodo a escala laboratorio
- Valorar el efecto del enriquecimiento en iodo sobre el crecimiento y la producción de biomasa de microalgas en fotobiorreactores bajo condiciones de cultivo “*outdoor*” a escala de planta piloto en un rango de concentraciones de iodo
- Evaluar los procesos de asimilación y acumulación de iodo en la biomasa producida y su relación con las condiciones de crecimiento.

Se adjunta un gráfico explicativo (**Figura 2**) del objetivo principal de este Trabajo Final de Máster.

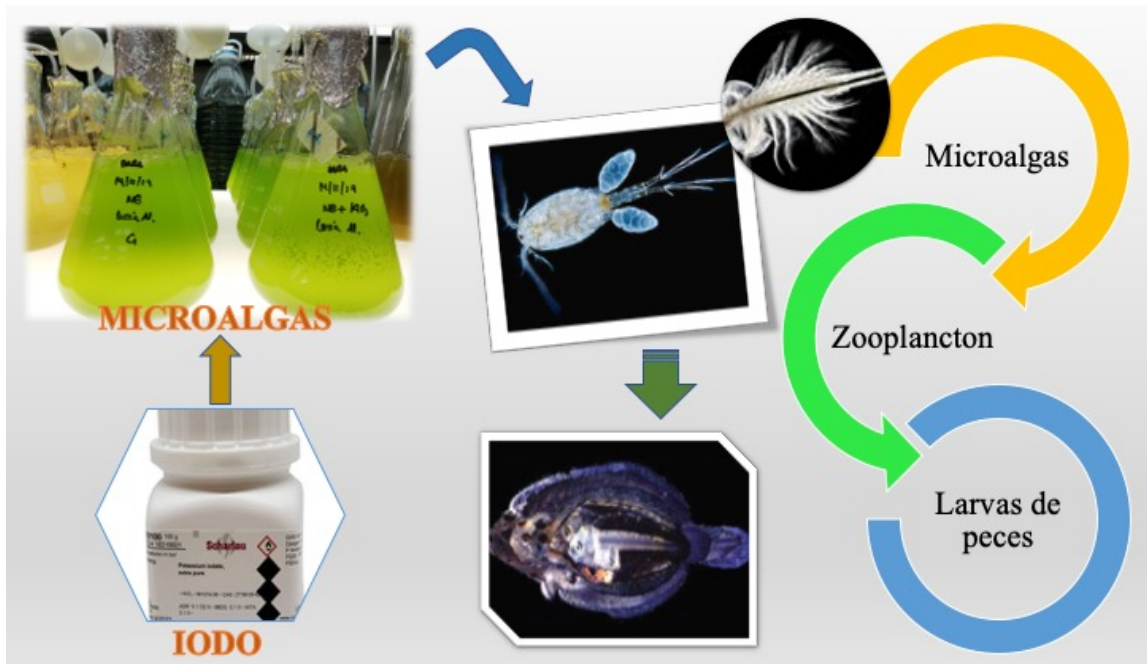


Figura 2: Gráfico explicativo donde se presenta el propósito general de este trabajo. En primer lugar, el enriquecimiento de microalgas para posteriormente, ser alimento para el zooplancton y que éstos tengan un mayor contenido en el elemento de enriquecimiento. Finalmente, este zooplancton será alimento de larvas de peces las cuales se verán beneficiadas por el enriquecimiento inicial.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Selección de cepas para el experimento

La selección de las cepas se ha valorado desde el punto de vista de interés en acuicultura, innovándose con el estudio de una especie de agua dulce. Siguiendo este proceso, se seleccionaron cinco cepas para escala laboratorio denominadas *Isochrysis galbana* (REC 0002B), *Microchloropsis gaditana* (BEA 1202B), *Parachlorella sp.* (BEA 0046), *Phaeodactylum tricorutum* (REC 0096) y *Euglena cantabrica* (BEA 0937B) siendo, las tres primeras, especies marinas que poseen una morfología redondeada y son ampliamente usadas como alimento para larvas de peces y moluscos en acuicultura (Gutiérrez *et al.*, 2017). La diatomea *P. tricorutum* presenta forma fusiforme, mientras que la *E. cantabrica* es una especie de agua dulce que muestra dos morfologías según la fase en el ciclo de vida, *palmela* y *euglenoide*. Para el experimento a escala piloto se optó por una cepa aclimatada a las condiciones “*outdoor*”, siendo *Rhodorus marinus* (BEA

1286B) la seleccionada. Igualmente, se realizó una revisión bibliográfica sobre el enriquecimiento de microalgas con diferentes elementos químicos. Hallándose estos experimentos en especies como *I. galbana*, *Chlorella vulgaris* y otras diatomeas (Burianová *et al.*, 2005; Gómez-Jacinto *et al.*, 2010; Iwamoto y Yoshihiro, 2012; Bergeijk *et al.*, 2013).

2.2. Descripción de las especies presentes en el estudio

En el presente estudio son utilizadas seis cepas de microalgas, ya nominadas en el apartado anterior. Con el principal objetivo de conocer en la mayor medida de lo posible, las cualidades de cada una de ellas, se resumen a continuación su descripción y propiedades. Es de señalar que dichas cepas proceden de la Colección del Banco Español de Algas (BEA), de la Universidad de Las Palmas de Gran Canarias (ULPGC), Gran Canaria, España.

2.2.1. *Isochrysis galbana* (REC 0002B)

I. galbana Parke (1949) pertenece al filo *Haptophyta*, a la familia *Isochrysidaceae* y, género *Isochrysis* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020a). Esta especie marina posee células individuales, con un tamaño entre 5 y 7 micras (μm), que poseen forma ovoide y tienen dos flagelos (Parke, 1949). Existen distintos usos para esta cepa (**Figura 3**), mayoritariamente suele cultivarse como: (1) productora de PUFA's (Shekarabi *et al.*, 2019) y (2) productora de fucoxantina (Gómez-Loredo *et al.*, 2015). La resistencia frente a enfermedades y al estrés (Torrecillas *et al.*, 2017), la ayuda al buen funcionamiento de las células en ciertos tejidos (Liu *et al.*, 2013) o, un mayor crecimiento en larvas (Carvalho *et al.*, 2018), son algunos de los beneficios que puede obtener el consumidor de estas moléculas, ya sea animal o humano.

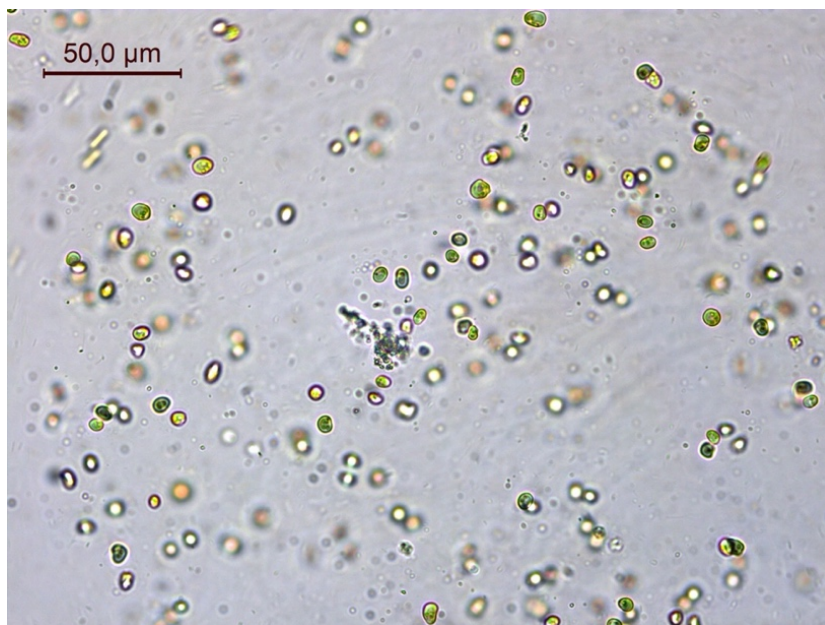


Figura 3: *Isochrysis galbana* al microscopio. Observada con un aumento del 40x y escala de 50 μm .

2.2.2. *Microchloropsis gaditana* (BEA 1202B)

M. gaditana L. M. Lubián (1982) forma parte del filo *Ochrophyta*, familia *Monodopsidaceae* y género *Microchloropsis* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020b). En 2015, se declaró que había suficientes análisis para un nuevo género, *Microchloropsis*, que incluye a *M. salina* y *M. gaditana* (Fawley *et al.*, 2015), siendo conocida comúnmente como *Nannochloropsis gaditana* o *Microchloropsis gaditana*. Cuando esta población algal marina está en fase de crecimiento activo presenta una forma elipsoidal de 3.5-4 x 2.5-3 μm (**Figura 4**). Son inmóviles, desprovistas de flagelos y poseen un cromatóforo sencillo parietal de color verde pálido que ocupa gran parte de la célula. Se observa frecuentemente la presencia de un glóbulo extraplastidial de color rojo, sobre todo en cultivos envejecidos (Lubián, 1982). Esta cepa ha sido utilizada en acuicultura, ya que posee un alto contenido en proteínas y PUFA's (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2013), elementos beneficiosos para el desarrollo normal en larvas de peces. A consecuencia del contenido de estos ácidos grasos, la biomasa de esta especie puede ser utilizada para la producción de biodiesel y biogás (Mendoza *et al.*, 2020).

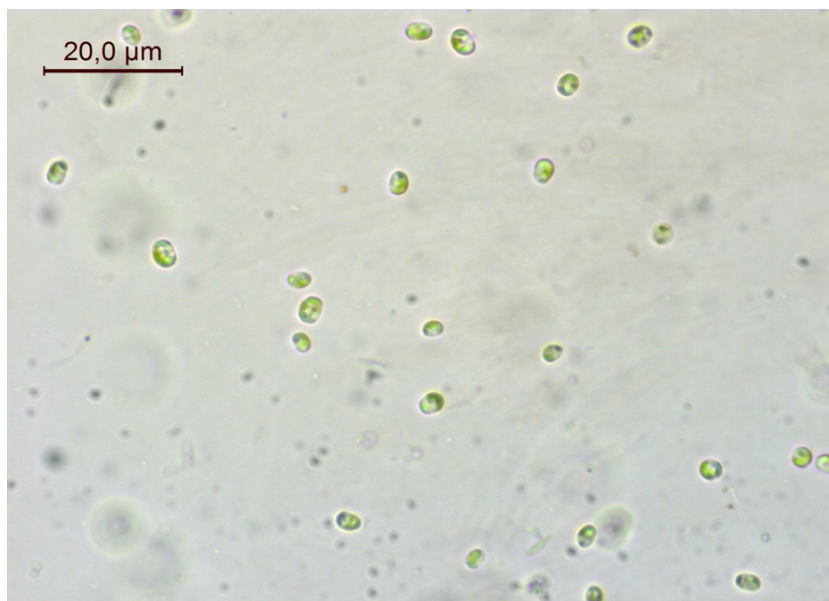


Figura 4: *Microchloropsis gaditana* al microscopio. Se observó con un aumento del 100x y escala 20 μm.

2.2.3. *Parachlorella* sp. (BEA 0046)

Parachlorella sp. es una especie capaz de ser cultivada tanto en agua dulce como salada, pertenece al filo *Chlorophyta*, familia *Chlorellaceae* y género *Parachlorella* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020c). Las células presentan formas esféricas (**Figura 5**) o elipsoidales, con un diámetro de 5 a 8 μm y están equipadas con un cloroplasto en forma de copa que contiene un pirenóide (Krienitz *et al.*, 2004). Recientemente, se ha estudiado la capacidad de esta cepa de producir luteína, este pigmento previene mayoritariamente enfermedades cardiovasculares (Heo *et al.*, 2018). Igualmente se ha observado que *Parachlorella* sp. retira elementos químicos del medio natural en diferentes estudios (Shimura *et al.*, 2012; Dirbaz y Roosta, 2018), y por ello, es útil en el tratamiento de aguas residuales (Kim *et al.*, 2020). Por lo que el uso de esta cepa en acuicultura proporcionaría un beneficio medioambiental adicional debido a su capacidad de eliminar elementos químicos nocivos en el medio.

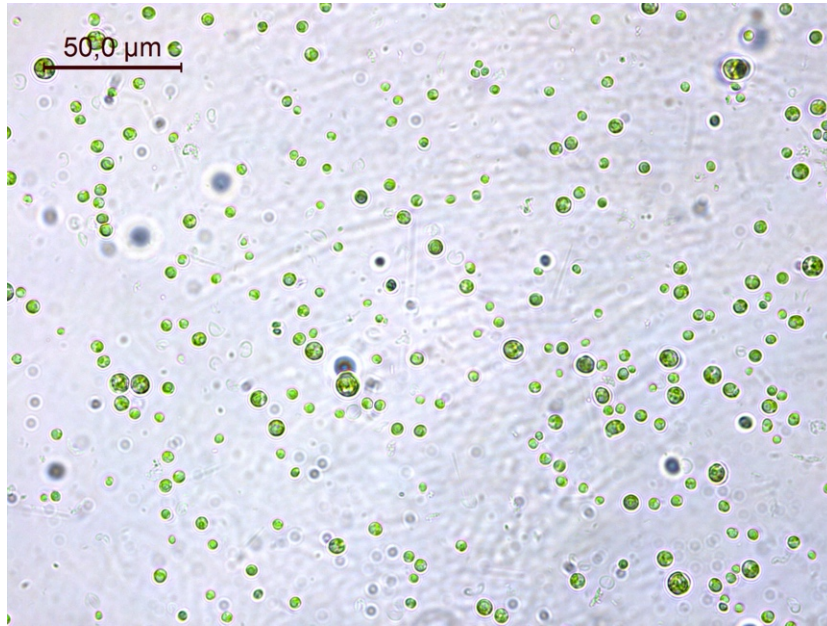


Figura 5: *Parachlorella* sp. al microscopio. Observada con aumento 40x y escala de 50 μm.

2.2.4. *Phaeodactylum tricornutum* (REC 0096)

Phaeodactylum tricornutum Bohlin (1898), pertenece al filo *Bacillariophyta*, familia *Phaeodactylaceae* y género *Phaeodactylum* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020d). Se trata de una diatomea presente en los océanos con forma fusiforme (**Figura 6**) de color marrón oscuro con márgenes lisos que presentan una iridiscencia debido a la alineación paralela de las células. Pudiendo tener un tamaño de hasta 35 μm (Lewin *et al.*, 1958), esta cepa es altamente conocida por la producción de PUFA's, específicamente EPA, que suministran beneficios cardiovasculares, anti-inflamatorios y protección frente a la aterosclerosis en humanos (Barkia *et al.*, 2019). Paulín (2010) utiliza esta especie para ser cultivada con diferentes concentraciones de nutrientes y por ende, cambiar su composición bioquímica con la finalidad de modificar los nutrientes que llegan hasta el zooplancton. Esta cepa además de aportar PUFA's también proporciona fucoxantina, aumentando el valor monetario de especies de acuicultura (Ribeiro *et al.*, 2017). Asimismo, otros autores como Guil-Guerrero *et al.* (2004), compararon la biomasa de *P.*

tricornutum entre otras cepas con la de harina de soja, observando que puede ser un buen sustituto en piensos de acuicultura.



Figura 6: *Phaeodactylum tricornutum* al microscopio. Observada a un aumento de 40x y escala de 50 μm.

2.2.5. *Euglena cantabrica* (BEA 0937B)

Euglena cantabrica E.G. Pringsheim (1956) (**Figura 7**), pertenece al filo *Euglenozoa*, familia *Euglenidae* y género *Euglena* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020), se trata de una cepa de agua dulce con un tamaño de 42-79 μm de ancho y 7-20 μm de largo, teniendo forma de huso en una de las fases de su ciclo de vida (*euglenoide*) y forma redondeada en la otra (*palmela*). Esta provista de un flagelo de longitud igual a un tercio de la totalidad de su cuerpo y presenta una mancha ocular de color rojo, vacuola contráctil y cloroplasto estrellado (Ciuguela y Triemer, 2010). Mahapatra *et al.* (2013), realizaron un estudio con *Euglena sp.* y aguas residuales. Los resultados indicaron que el cultivo de esta cepa retenía el Carbono Orgánico Total (COT), Nitrógeno (N) y Fósforo (P) que se encuentra en las aguas residuales domésticas sin ningún pretratamiento. Asimismo, determinaron gran productividad por parte del alga y un perfil de lípidos similar al

encontrado en los aceites vegetales usados en biocombustible. Por lo que su utilidad es doble. Jerez-Martel *et al.* (2017) encontró propiedades antimicrobianas, anticancerígenas y antivirales en esta especie de agua dulce a causa de su actividad antioxidante.

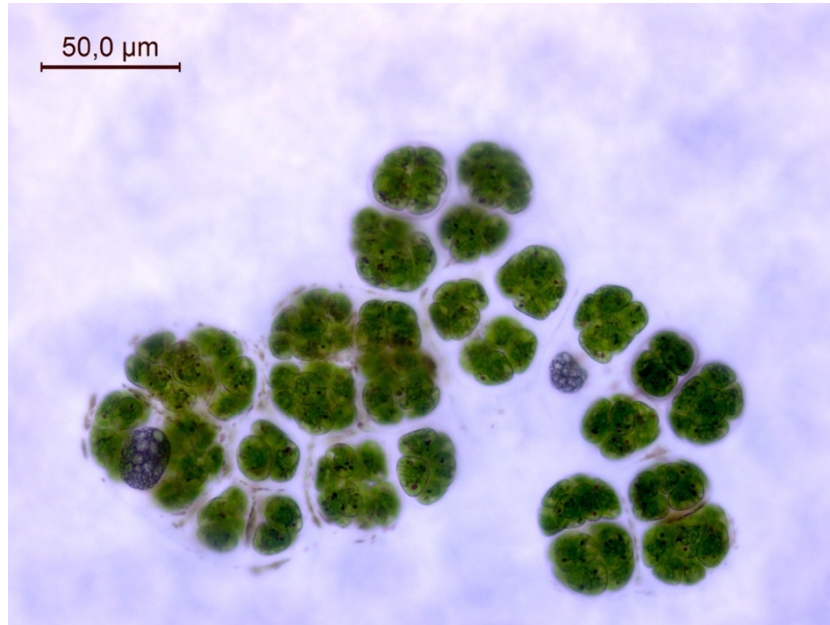


Figura 7: *Euglena cantabrica* vista al microscopio, con un aumento del 40x y escala de 50 μm .

2.2.6. *Rhodorus marinus* (BEA 1286B)

Rhodorus marinus, pertenece al filo *Rhodophyta*, familia *Stylonemataceae* y género *Rhodorus* (Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020e). Se trata de un alga roja unicelular (**Figura 8**) descrita por Geitler (1930) en cultivos realizados con agua de mar procedentes de Las Palmas (Gran Canaria, España). Puede medir entre 3 y 6 μm de diámetro total, contiene un plastidio parietal, generalmente con cuatro apéndices, que generan una forma de copa (Ott, 1967). Posee un gran cloroplasto con tilacoides paralelos individuales rodeados por un tilacoide periférico (Ford, 1984). Gracias a extractos generados a partir de esta microalga se han conseguido analizar moléculas activas (Ácido Gamma Aminobutírico (GABA) y GABA-alanina). Éstas, son útiles para el tratamiento de enfermedades como la psoriasis, la dermatitis atópica y pieles sensibles (Scandolera *et*

al., 2018). Además, es productora de ficobiliproteínas como la β -ficoeritrina, moléculas que actúan como pigmentos accesorios para la fotosíntesis (Básaca-Loya *et al.*, 2009).

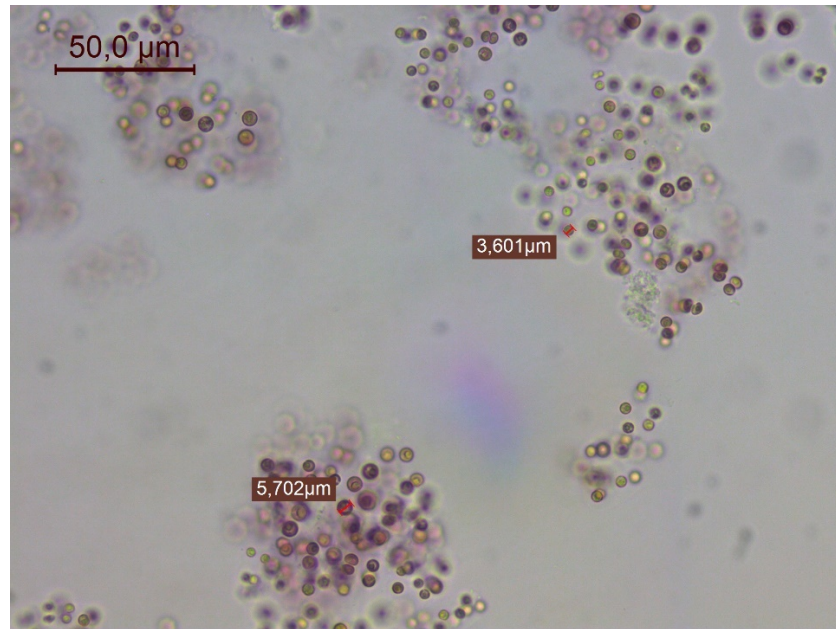


Figura 8: *Rhodorus marinus* vista al microscopio, con un aumento del 40x y escala de 50 μm. Se observan medidas del diámetro de las células.

2.3. Cultivo de las microalgas

Una vez seleccionadas las cepas, se fabrica el medio de cultivo necesario para la vida y crecimiento de las microalgas, siendo el enriquecedor más común en cepas de agua salada el medio *f/2*, sin embargo, se usó “*Nutribloom Plus*” (NB) (Necton S.A, Olhao, Portugal), del que se estima que proporciona mejores resultados que el común *f/2*. En el proceso de actuación con especies de agua dulce, como *Euglena cantabrica*, se planificó el medio de cultivo *Bold's Basal Medium* (BBM) más vitaminas, que utiliza como base agua *MilliQ* (Bold, 1949; Bischoft & Bold, 1963). En último lugar, se realiza la inoculación de los cultivos en cámara de flujo *AH-100*, (Telstar, Terrasa, España) con el fin de obtener un monocultivo en cada Erlenmeyer (Andersen, 2005). Finalmente, los cultivos quedan depositados en la cámara de activación donde se ha dispuesto que posean

una temperatura y humedad adecuadas, así como irradiación y fuente de carbono suficientes para el buen crecimiento de las células (**Figura 9**). Este procedimiento aparte de consistir en la aclimatación de las cepas originales de la colección, también se realizó con el propósito de obtener biomasa para ser enriquecida en nuestros siguientes experimentos y así, realizar la inoculación de éstos a través del peso fresco (PF) y no mediante volumen.



Figura 9: Cultivos de las cuatro cepas de agua salada en la cámara de aclimatación en el BEA donde poseen aporte de carbono mediante los conductos de dióxido de carbono y luz, tanto en la parte superior como inferior del recipiente de cultivo.

2.4. Parámetros fisicoquímicos en la cámara de aclimatación

La temperatura está controlada por la existencia de un sensor en el interior de la cámara de activación que permite establecer un rango sobre la aptitud para el cultivo de las microalgas. Una vez superado este rango, se activa el sistema de refrigeración bajando la temperatura y manteniéndola estable en todo el proceso.

El dióxido de carbono (CO_2) también se encuentra controlado por un sensor que determina la seguridad del lugar activando una alarma en caso de sobrepasar los valores considerados como tóxicos. El CO_2 procede de una bomba desde la que a través de

canalizaciones es transportado hasta la cámara de activación y de ahí se distribuye por tubos y válvulas independientes a los cultivos. Esta red de canalizaciones se encuentra duplicada con la intención de obtener en una de ellas la producción de CO_2 continuo y, en la otra mediante pulsaciones de CO_2 durante un minuto cada hora, para lo que dispone de medidor de tiempo y electroválvula temporizada. En nuestro caso tanto en los experimentos en laboratorio como en invernadero (planta piloto), se aportó el CO_2 a pulsos de un 1.5% durante un minuto cada hora.

Está constatado que la iluminación es indispensable para la función fotosintética del alga y por tanto su mayor o menor intensidad está considerada como un factor limitante, así como el fotoperiodo luz-oscuridad (L:D). Para la obtención de la cantidad de luz se dispone de un sensor de luz LI-1400, (LI-COR, Alcobendas, España) con el que se ha logrado obtener datos sobre la iluminación media por área requerida, siendo sus unidades el micromol (μmol)/ $\text{m}^2 * \text{seg}$. Durante las experiencias en el laboratorio se encontraron fotoperiodos de L:D (*light:dark*) (12:12), siendo aproximadamente el mismo para la experiencia en el invernadero.

2.5. Medidas de crecimiento y producción

2.5.1. Curvas de crecimiento

Como método de observación del crecimiento de los cultivos en aclimatación se utilizó la densidad óptica. El propósito de esta medida fue la observación del crecimiento celular del cultivo en su relación con el transcurso temporal, generando una curva de crecimiento que nos permita determinar las diferentes fases. Es una técnica que nos permite rápidos resultados y la evaluación del incremento de biomasa. Como contrapartida, no cuantifica con exactitud el número de células, por lo que se trata de una

medida indirecta del crecimiento. Gracias al espectrofotómetro *UV-1900*, (Shimadzu, Kyoto, Japón), que permite transmitir distintas longitudes de onda, se obtendrán los valores de absorbancia en nuestros cultivos (Salgado y Hernández, 2014), los cuales permitirán una visualización del crecimiento celular en los cultivos de microalgas.

2.5.2. Medidas de producción

La tasa de producción responde a la siguiente ecuación:

$$PR = \frac{(PS_{inicial} - PS_{final})}{Volumen * tiempo}$$

Para los cultivos en aclimatación, el peso seco (PS) se recogió gracias a muestras de cinco mililitros (ml) filtradas y limpiadas con veinte ml de formato de amonio (NH_4HCO_2) al 3% (0.5M), con el objetivo de eliminar las sales procedentes del medio de cultivo en el caso de las especies marinas. Posteriormente, las muestras se introducen en la estufa durante 24 horas a 60°, consiguiendo así el PS. Para la consecución del Peso Seco Sin Cenizas (PSSC) o Peso Inorgánico (PI), la técnica consiste en introducir el filtro usado para el PS en el horno mufla a una temperatura de 450° durante 4 horas (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007). En cuanto a los cultivos expuestos al enriquecimiento, el PS se obtuvo gracias al liofilizado de la biomasa final y a diferentes alícuotas realizadas con la biomasa de inoculación en los cultivos. Igualmente, se calculó la producción de ficoeritrina y clorofila gracias al fluorímetro *Trilogy*, (Turner designs, San José, California, EE. UU). La asimilación de nitratos y fosfatos fue observada así como la retirada de estos elementos en la especie *Rhodorus marinus*.

2.5.3. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación

Gracias a los datos desprendidos tanto de las medidas de crecimiento, como las de producción se consiguieron valores de tasas específicas de crecimiento (SGR) de cada

especie y sus tiempos de duplicación (t_d). Se ha de recalcar que estas tasas están calculadas con datos exclusivos de la fase exponencial en los cultivos (Guillard, 1973).

La fórmula de la SGR y del t_d es la siguiente:

$$SGR = \frac{\ln C_f - \ln C_i}{t - t_{lag}}$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{SGR}$$

Siendo C_f y C_i la concentración final e inicial de biomasa, respectivamente. t_{lag} es el tiempo donde el cultivo pasa a fase estacionaria o de latencia, es decir, el tiempo final de la fase exponencial de los cultivos. Se ha de destacar que esta tasa puede ser calculada también mediante el PS final e inicial de los cultivos (datos de producción).

2.5.4. Determinación de la fluorescencia de la Clorofila *a*

Para la medición de la fluorescencia de la clorofila se utilizó el equipo técnico *AquaPen-C AP-C 100*, (Photon Systems Instruments, Drasov, República Checa). En nuestro caso, el aparato funcionó a una longitud de onda de 450 nm para microalgas eucariotas. Siendo relevante la necesidad de oscuridad veinte minutos antes y durante la toma de datos con el instrumento. El equipo posee un software llamado “*FluorPen*” que permite la descarga de datos en un ordenador y su posterior análisis mediante el mismo programa. Algunos de los datos que se valoraron fueron F_0 , y tasas como F_v/F_m .

- Los datos de F_0 representan la fluorescencia a una intensidad conocida en el estado de adaptación a la oscuridad.
- La tasa F_v/F_m representa un coeficiente que va del 0 al 1, cuánto más cercano al 1 menor nivel de estrés posee el cultivo.

2.6. Primer experimento de enriquecimiento de microalgas a una concentración de KIO_3 a escala laboratorio

Para el primer experimento de enriquecimiento en iodo, los cultivos fueron inoculados mediante PF en función de la biomasa total adquirida de los cultivos aclimatados. Para asegurar la recogida de datos en fase exponencial la duración de los experimentos fue de siete días. El diseño consistió en cinco *Erlenmeyers* de 500 ml para las poblaciones control (réplicas control) y otros cinco para las poblaciones expuestas al iodo (réplicas enriquecidas) para cada cepa (**Figuras 10 y 11**). Las especies *I. galbana*, *Parachlorella sp.*, *M. gaditana*, *P. tricornutum* y *E. cantabrica* fueron las enriquecidas a una concentración de 1.5 μM de iodato de potasio (KIO_3). Seleccionando este elemento químico por ser el más estable en la naturaleza desde un punto de vista termodinámico (Gómez-Jacinto *et al.*, 2010; Bergeijk *et al.*, 2013). Esta molaridad se obtuvo gracias a la aplicación de la ecuación de dilución, y a la disolución inicial de concentración y volumen conocido.

$$C_{inicial} * V_{inicial} = C_{final} * V_{final}$$

La inoculación y el enriquecimiento se realizó en cámara de flujo para mantener las condiciones de esterilidad en los replicados. Además, se relacionó el PF y PS de cada especie gracias a alícuotas de la biomasa del inóculo posteriormente liofilizadas. Por último, se realiza la adición de todos los componentes esenciales para el experimento: Inóculo, NB o BBM más vitaminas y KIO_3 (población enriquecida). Posteriormente, los cultivos se reservaron en la cámara de aclimatación donde diariamente se mantenían las constantes adecuadas de temperatura, humedad y aporte de CO_2 .



Figura 10 y 11: Cultivos de *I. galbana* y *Parachlorella sp.* a una misma concentración de KIO_3 en el tiempo inicial (izq.) y final (der.) respectivamente.

2.7. Segundo experimento de enriquecimiento de microalgas a distintas concentraciones de KIO_3 a escala laboratorio

La inoculación de los cultivos enriquecidos se llevó a cabo de la misma forma técnica ya descrita con anterioridad (PF). El tiempo de enriquecimiento de la experiencia fue de siete días, garantizando así la observación del crecimiento de las cepas durante su fase exponencial. Las cepas seleccionadas fueron las más productivas en el experimento anterior: *P. tricornutum*, *E. cantabrica* y *Parachlorella sp.* Sin embargo, el enriquecimiento de la especie *Parachlorella sp.*, no se pudo realizar a causa de la falta de tiempo, ante la alarma sanitaria mundial sufrida por la pandemia del virus COVID-19. El enriquecimiento se ejecutó a través de KIO_3 , diferenciándose con el primer experimento en que se ha probado cuatro concentraciones diferentes: 1.5, 3, 5 y 10 μM . En la **Tabla I** se disponen, para una mejor visualización, las diferentes concentraciones y el volumen añadido de disolución inicial. En este caso, las réplicas totales para cada cepa son quince, tres para cada concentración de iodato, más tres para las poblaciones control (**Figuras 12 y 13**), encontrando en cada una de ellas, el inóculo, el medio de cultivo pertinente y la concentración de KIO_3 (excepto en las control).

Tabla I: Volúmenes y concentraciones usadas en el segundo experimento de enriquecimiento para las especies seleccionadas. Las unidades utilizadas para el volumen de la disolución inicial son los microlitros (μL) mientras que en la concentración de ioduro, se usan los miligramos de éste por litros (mg/L).

	Control	1,5 μM	3 μM	5 μM	10 μM
Volumen añadido de disolución inicial (μL)	0	150	300	500	1000
Concentración de I^- (mg/L)	H_2O	0,38	0,76	1,269	2,538



Figura 12 y 13: Cultivos de *P. tricorutum* y *E. cantabrica* a distintas concentraciones de KIO_3 .

2.8. Tercer experimento a escala piloto de enriquecimiento de microalgas a distintas concentraciones de KIO_3

En este experimento a escala piloto la inoculación se hizo mediante biomasa fresca procedente de otro cultivo exterior. Este inoculo fue gracias a la especie *Rhodorus marinus*, actual cultivo de producción en “raceway” en invernadero (BEA) y por tanto, aclimatada a condiciones externas (*outdoor*). La selección de esta cepa para el experimento a escala piloto residió en la aclimatación *outdoor* y en el corto periodo de tiempo disponible tras el confinamiento por la alerta sanitaria (COVID-19). El tiempo de experimentación fue de cinco días (fase exponencial), el recipiente de cultivo en este caso fueron fotobiorreactores (*PBR*'s) de 50L y se utilizó como medio de cultivo NB y KIO_3 en las poblaciones expuestas al enriquecimiento (**Figura 14**). Sin embargo, en esta

experiencia se quiso probar concentraciones mayores de iodo para observar si se obtenían resultados distintos a los encontrados en los experimentos a escala piloto siendo éstas: 20, 10, 7.5 y 5 μM . Las réplicas necesarias, para un buen análisis estadístico de datos en función de las concentraciones, fueron insuficientes debido a la falta de *PBR*'s. No obstante, si lo fueron las réplicas en las poblaciones control.



Figura 14: Cultivos de *R. marinus*. Control (izq.) y enriquecido (der.) a una concentración de 20 μM de KIO_3 a escala piloto.

2.9. Cosechado de las muestras en los tres experimentos

Para el cosechado de las especies marinas de microalgas utilizadas en el experimento a escala de laboratorio, se usó una centrifugadora *Sorvall Legend XTR*, (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Se realizó el cosechado mediante malla de 50 y 55 μm de las especies de agua dulce *E. cantabrica* y agua salada, *R. marinus* respectivamente. Una vez cosechadas, se congeló tanto la biomasa como una parte del medio de cultivo de todos

los experimentos realizados en este trabajo. Posteriormente, se liofilizaron todas las muestras gracias al instrumento *Freezone6*, (Labconco, Kansas City, EE. UU).

2.10. Análisis de iodo en las muestras

El análisis de las muestras tiene como objetivo la obtención de datos de iodo del que disponen las muestras obtenidas, tanto cualitativa, en cuanto a su presencia o no, como cuantitativa en cuanto a lo asimilado por cada cepa. En un principio, se adoptó la idea de seguir con el protocolo usado anteriormente en el BEA para macroalgas, adaptándolo a las características de las cepas presentes en el experimento, pero tras un estudio más específico y constatado que éste dependía de la volumetría, se identificaron obstáculos imperiosos que desaconsejaron la realización del mismo, fundamentalmente el uso del elemento químico Bromo (Br) por estar considerado altamente tóxico tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Asimismo, este protocolo que, como ya se mencionó, fue usado para macroalgas, imposibilita el análisis de las muestras presentes en esta experimentación debido a la pequeña biomasa encontrada en nuestros cultivos y su baja cantidad de iodo comparativamente con las primeras.

Una vez diagnosticado el problema descrito se contactó con varios profesores de la Facultad de Ciencias Básicas (ULPGC), específicamente del departamento de química, para investigar la posibilidad de analizar estas muestras mediante otras técnicas que se enuncian a continuación:

Como primera opción, se intentó realizar el análisis a través de la cromatografía iónica donde en la naturaleza de su fase estacionaria se experimenta un intercambio iónico entre las muestras y los eluyentes utilizados en la fase móvil (Trujillo *et al.*, 2009). En

cuanto al equipo técnico, se utilizó *792 Basic IC*, (Metrohm, Herisau, Suiza). En primer lugar, se realizó una curva de calibración con patrones propios y por triplicado para su mayor fiabilidad, constatándose el fácil manejo del aparataje técnico. El propósito de este equipo es la generación de “picos” en el software que son organizados en tiempos diferentes dependiendo del tamaño o carga de los distintos átomos presentes en las muestras analizadas. Comprobando la recta de calibración, se pudo observar que el equipo técnico no fue capaz de detectar concentraciones más bajas a $1\text{ mg I}^-/\text{L}$, por lo que era predecible su incapacidad para captar las concentraciones encontradas en las muestras. No obstante, fueron analizadas algunas de éstas, con la expectativa de que el cromatógrafo arrojarase algún resultado, siendo éste, negativo. Debido a estos inconvenientes, se desestimó la opción de la cromatografía iónica intentando encontrar otra opción para el análisis de las muestras.

La siguiente opción valorada fue el uso del espectrofotómetro, siguiendo el protocolo publicado por Nunes *et al.* (2019) donde, como resultado final, se genera una disolución colorimétrica en función del iodo encontrado en las muestras y por tanto un valor generado como consecuencia de una recta de calibración que debiera ser realizada anteriormente. El tiempo perdido durante el confinamiento, debido a la pandemia (COVID-19), imposibilitó la realización de este análisis. Por lo que, en definitiva, el análisis del iodo asimilado por las microalgas no se pudo realizar en este trabajo, quedando constatado que métodos son insatisfactorios para la medición de este elemento.

2.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software gratuito *R-Commander* (*Rcmdr*). En el primer experimento se realizaron análisis de las varianzas (*ANOVA's*) de

las réplicas control y enriquecidas para cada especie. Esta prueba genera la hipótesis nula de que las réplicas son iguales y por tanto, el satisfactorio cumplimiento de su función. Para observar la interacción entre las poblaciones control y enriquecidas se utilizó la prueba *t-student*, indicándonos la existencia de diferencias significativas entre dichos cultivos de microalgas.

Igualmente, en el segundo experimento se realizaron *ANOVA*'s en las réplicas control y enriquecidas con iodo para las dos especies seleccionadas. En este caso, se usaron diferentes pruebas para examinar la interacción entre la población control y las distintas concentraciones de iodo. (1) *ANOVA*'s debido a que se encuentran más de dos niveles del factor (KIO_3). (2) Pruebas *t-student* independientes de la población expuesta a la concentración (3 μ M) que generó la mayor producción respecto a las demás.

Al igual que para las anteriores experiencias se realizó un *ANOVA* para cada población, asegurando con esta prueba que no hay diferencias entre las réplicas del experimento. Para la observación de si existen diferencias entre estas variables según los fotobiorreactores (*PBR*'s) control y los enriquecidos se realizó una prueba *t-student* (Fisher, 1987).

3. RESULTADOS

3.1. Curvas de crecimiento en cultivos de microalgas en cámara de aclimatación

Gracias a los cultivos en cámara de aclimatación se obtuvieron las siguientes curvas de crecimiento a lo largo del tiempo (**Figura 15**). Se observa una fase exponencial más acusada en las especies *N. gaditana*, *P. tricornutum* y *Parachlorella sp.*, mientras que en las cepas restantes esta fase es más gradual.

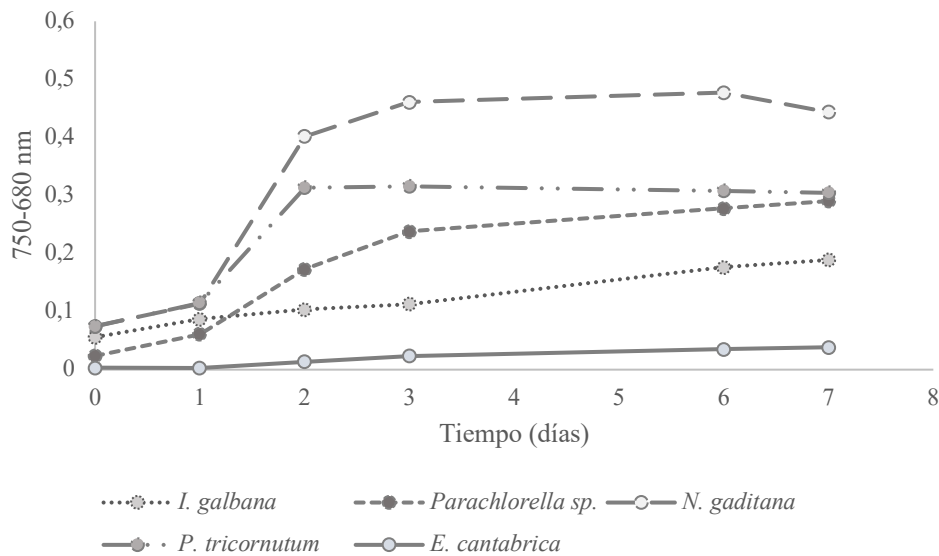


Figura 15: Gráfica de las curvas de crecimiento de las especies de microalgas durante el proceso de aclimatación. En el eje Y se encuentran los valores obtenidos de la diferencia entre las longitudes de onda (750-680 nm).

3.2. Datos del primer experimento de enriquecimiento en microalgas a una misma concentración de KIO_3

En las **tablas II, III, IV, V y VI** se encuentran los valores de producción y crecimiento de cada una de las especies enriquecidas con iodo a una concentración de 1.5 μM , presentándose por tabla los valores de las medias con su desviación típica correspondiente.

La **tabla II** corresponde a la especie *I. galbana*. En ella podemos apreciar como los datos de productividad y crecimiento son negativos, por lo que el tiempo de duplicación no se pudo calcular.

Tabla II: Datos de producción, tasa de crecimiento (SGR) y tiempo de duplicación (td) para la especie *Isochrysis galbana* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (p-valor)
Productividad Control	mg PS /L*día	54.63±10.83	0.26 (0.89)
Productividad 1,5 µM	mg /L*día	-15.75±13.57	1.61 (0.30)
SGR Control	(1%/día)	5.68±0.52	0.26 (0.89)
SGR 1,5 µM	(1%/día)	-31.90±20.56	1.61 (0.30)
td Control	(horas)	3.01±0.52	0.26 (0.89)
td 1,5 µM	(horas)	-	-

Para la especie *Parachlorella sp.* se encontraron productividades y crecimientos similares entre las poblaciones control y enriquecidas (**Tabla III**).

Tabla III: Datos para la especie *Parachlorella sp.* presentados a través de las medias y desviaciones típicas de las siguientes variables y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (p-valor)
Productividad Control	mg /L *día	98.77±11.13	0.12 (0.96)
Productividad 1,5 µM	mg /L *día	81.03±16.57	0.02 (0.99)
SGR Control	(1%/día)	9.56±0.71	0.12 (0.96)
SGR 1,5 µM	(1%/día)	8.14±1.19	0.02 (0.99)
td Control	(horas)	1.75±0.13	0.12 (0.96)
td 1,5 µM	(horas)	2.10±0.36	0.02 (0.99)

Para la especie *Phaeodactylum tricornutum* se observaron diferencias entre las producciones de las poblaciones control y las enriquecidas (**Tabla IV**). De igual modo, se encontraron los mismos resultados para la especie *M. gaditana* (**Tabla V**).

Tabla IV: Datos de productividad, SGR y td para la especie *Phaeodactylum tricornutum* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (p-valor)
Productividad Control	mg /L* ^{día}	107.77±26.31	0.05 (0.99)
Productividad 1,5 μM	mg /L* ^{día}	37.82±12.36	0.09 (0.97)
SGR Control	(1%/ ^{día})	9.92±1.91	0.05 (0.99)
SGR 1,5 μM	(1%/ ^{día})	4.42±1.33	0.09 (0.97)
td Control	(horas)	1.75±0.36	0.05 (0.99)
td 1,5 μM	(horas)	4.33±1.93	0.09 (0.97)

Tabla V: Datos de producción, SGR y td para la especie *Microchloropsis gaditana* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (p-valor)
Productividad Control	mg /L* ^{día}	85.82±24.90	0.10 (0.97)
Productividad 1,5 μM	mg /L* ^{día}	32.15±8.63	0.08 (0.98)
SGR Control	(1%/ ^{día})	5.27±1.29	0.10 (0.97)
SGR 1,5 μM	(1%/ ^{día})	2.23±0.56	0.08 (0.98)
td Control	(horas)	3.39±0.99	0.10 (0.97)
td 1,5 μM	(horas)	8.06±2.43	0.08 (0.98)

E. cantabrica se observó como la especie más productiva en este experimento, siendo destacable que esta especie es de agua dulce. Se encontraron diferencias entre las producciones y crecimientos de las poblaciones control y enriquecidas (**Tabla VI**).

Tabla VI: Productividad, SGR y td para la especie *Euglena cantabrica* presentados a través de las medias y desviaciones típicas y, los valores de F y sus correspondientes p-valores.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (<i>p</i> -valor)
Productividad Control	mg /L*día	152.55±14.82	0.01 (0.99)
Productividad 1,5 µM	mg /L*día	74.82±4.31	0.004 (0.99)
SGR Control	(1%/día)	11.03±0.75	0.01 (0.99)
SGR 1,5 µM	(1%/día)	6.47±0.30	0.004 (0.99)
td Control	(horas)	1.52±0.11	0.01 (0.99)
td 1,5 µM	(horas)	2.58±0.12	0.004 (0.99)

Además, podemos encontrar los valores estadísticos correspondientes a los *ANOVA*'s realizados a las réplicas (F(*p*-valor)). En la **tabla VII** podemos encontrar los análisis estadísticos mediante la prueba *t-student* entre las producciones de controles y enriquecidos. En esta tabla se puede apreciar que *E. cantabrica* presenta las mayores diferencias significativas entre poblaciones.

Tabla VII: Tabla de los valores estadísticos correspondientes a la prueba *t-student* (t (p-valor)) para cada especie, encontrando pruebas según la variable producción (mg/L*día) o tiempo de duplicación (td (horas)).

Especie	Análisis estadístico t-student	t (<i>p</i> -valor)
<i>Isochrysis galbana</i>	Producción C Vs Iodo	7.04 (0.002) **
	td C Vs Iodo	-
	SGR C Vs Iodo	3.53 (0.02) *
<i>Parachlorella sp.</i>	Producción C Vs Iodo	1.40 (0.23)
	td C Vs Iodo	2.27 (0.08)
	SGR C Vs Iodo	3.15 (0.03) *
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Producción C Vs Iodo	4.33 (0.01) *
	td C Vs Iodo	2.48 (0.06)
	SGR C Vs Iodo	4.15 (0.01) *
<i>Microchloropsis gaditana</i>	Producción C Vs Iodo	5.03 (0.007) **
	td C Vs Iodo	5.66 (0.004) **
	SGR C Vs Iodo	5.78 (0.004) **
<i>Euglena cantabrica</i>	Producción C Vs Iodo	14.20 (0.0001) ***
	td C Vs Iodo	39.83(2.3*10 ⁻⁶) ***
	SGR C Vs Iodo	18.53 (4.9*10 ⁻⁵) ***

*Nivel de diferencias entre medias según el p valor arrojado por la prueba estadística *t-student* a un nivel α de 0.05. C = Control; Iodo = 1,5 µM KIO_3 .

3.3. Datos del segundo experimento de enriquecimiento a distintas concentraciones de KIO_3 en las especies *P. tricornutum* y *E. cantabrica*

Se presentan datos sobre las medias ($\pm sd$) de las producciones encontradas tanto en las poblaciones control como en las enriquecidas con diferentes concentraciones (**Tablas VIII y IX**). También se puede observar el valor correspondiente para cada *ANOVA* (F (*p-valor*)) realizado a las réplicas en las distintas poblaciones.

En la tabla **VIII** encontramos datos de la especie *P. tricornutum*, la menor productividad fue registrada por la población control. Observándose la máxima en la expuesta a 3 μM de KIO_3 , considerándose un aumento del 20% respecto a la productividad en la población control.

Tabla VIII: Tabla de valores medios de productividad para la especie *Phaeodactylum tricornutum* en el experimento a distintas concentraciones. Encontrándose también el valor estadístico arrojado por el *ANOVA*.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (<i>p-valor</i>)
Productividad Control	mg /L*día	38.11 \pm 4.83	0.03 (0.97)
Productividad 1.5 μM	mg /L*día	49.44 \pm 5.07	0.007 (0.99)
Productividad 3 μM	mg /L*día	58.41 \pm 9.30	0.03 (0.97)
Productividad 5 μM	mg /L*día	56.07 \pm 11.22	0.03 (0.96)
Productividad 10 μM	mg /L*día	43.87 \pm 17.85	0.03 (0.96)

La máxima productividad registrada en la especie *E. cantabrica* se encuentra también en la población enriquecida a 3 μM de KIO_3 , produciendo 42 mg de biomasa por litro y día (**Tabla IX**). Sin embargo, en la población control la productividad encontrada es mucho menor (7.89 mg/L*día). En este caso, el aumento de la productividad debida al iodo es de un 34%.

Tabla IX: Tabla de valores medios de productividad para la especie *Euglena cantabrica* en el experimento a distintas concentraciones y sus respectivas desviaciones típicas. Encontrándose también el valor estadístico arrojado por el *ANOVA* a las réplicas en cada concentración.

Parámetros	Unidades	$(\bar{X} \pm sd)$	F (p-valor)
Productividad Control	mg /L *día	7.89±3.88	0.61 (0.59)
Productividad 1.5 µM	mg /L *día	15.98±12.78	0.59 (0.60)
Productividad 3 µM	mg /L *día	42.01±8.89	0.06 (0.94)
Productividad 5µM	mg /L *día	38.82±9.06	0.09 (0.91)
Productividad 10 µM	mg /L *día	39.61±9.97	0.37 (0.71)

Se resumen en la tabla X todos los valores de las pruebas estadísticas realizadas en este experimento. Para cada especie podemos encontrar datos de los *ANOVA*'s a las distintas variables. Además, se recogen datos de las pruebas *t-student* realizadas entre las producciones respecto a la máxima productora (3 µM de KIO_3). Las mayores diferencias significativas se contemplaron entre las producciones control y enriquecidas en el enriquecimiento de la especie *E. cantabrica*.

Tabla X: Valores de F y p-valor para los análisis de la varianza (*ANOVA*) entre las producciones control y las expuestas a distintas concentraciones de iodo, encontradas para ambas especies.

Especie	Análisis estadístico	F y t (p-valor)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	ANOVA Producción C Vs [KIO_3]	1.22 (0.36)
	ANOVA SGR C Vs [KIO_3]	0.83 (0.53)
	ANOVA Td C Vs [KIO_3]	1.02 (0.44)
	T-student Producción 3 µM Vs Control	5.3 (0.03) *
<i>Euglena cantabrica</i>	ANOVA Producción C Vs [KIO_3]	5.65 (0.01) *
	ANOVA SGR C Vs [KIO_3]	5.69 (0.01) *
	ANOVA Td C VS [KIO_3]	4.83 (0.02) *
	T-student Producción 3 µM Vs Control	5.58 (0.03) *
	T-student Producción 3 µM Vs 1.5 µM	1.71 (0.22)
	T-student Producción 3 µM Vs 5 µM	2.63 (0.11)
	T-student Producción 3 µM Vs 10 µM	1.35 (0.31)
ANOVA Producción 3, 5 y 10 µM	0.06 (0.93)	

*Nivel de diferencia encontrados ya sean en análisis en la varianza (*ANOVA*) o en las medias (*t-student*) según un nivel de significación de alfa igual a 0,05. C = Control; [KIO_3] = Todas las concentraciones de iodo mencionadas en el experimento (1.5, 3, 5, 10 µM).

A continuación, en las figuras 16 y 17 se recogen las medias de producción (eje Y) en función de la concentración de iodo expuesta (eje X). Del mismo modo, son añadidas las barras de error que representan las desviaciones típicas correspondiente a cada media. Estas gráficas apoyan la visualización de las diferencias entre producciones, como se observa en las poblaciones control y enriquecida a 3 μM de KIO_3 para la especie *E. cantabrica*.

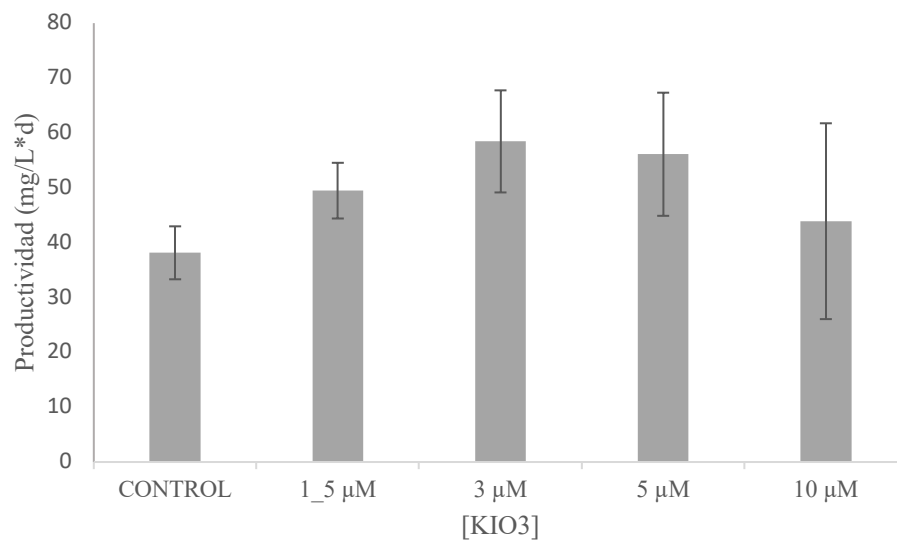


Figura 16: Medias de producción encontradas en la especie *Phaeodactylum tricornerum* desplegadas gracias a la exposición en diferentes concentraciones de iodato de potasio.

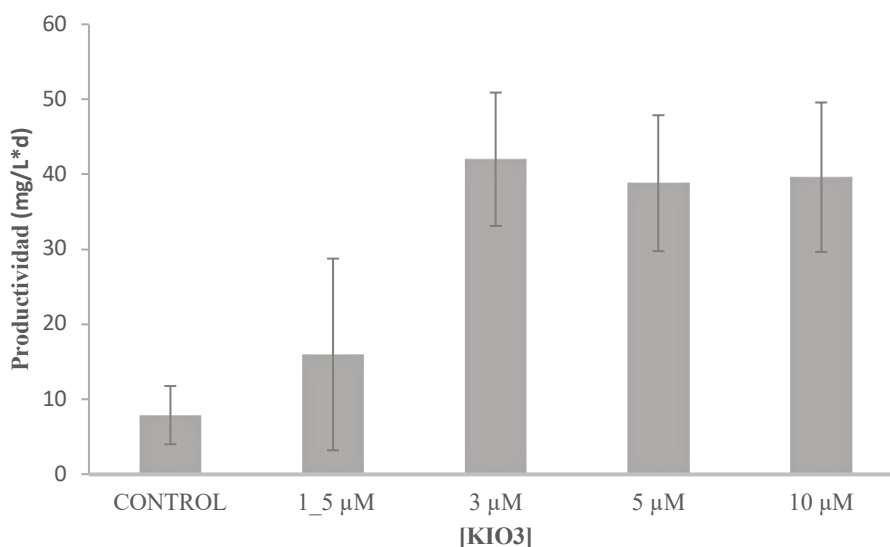


Figura 17: Medias de producción encontradas en la experiencia de enriquecimiento a distintas concentraciones de iodo para la especie de agua dulce *Euglena cantabrica*.

3.4. Datos del tercer experimento a escala piloto en *PBR's* para la especie *Rhodospirillum rubrum*

Gracias al enriquecimiento en invernadero de la especie *Rhodospirillum rubrum* se genera la tabla **XI** donde se encuentran datos de diferentes variables: productividad de biomasa, tasa de crecimiento (*SGR*), tiempo de duplicación (*td*), etc. Encontrándose un mayor crecimiento y producción en la población control respecto a la enriquecida.

Tabla XI: Tabla de valores arrojados por la especie *R. marinus* gracias al experimento a escala piloto. Encontramos las medias de producción, tasa de crecimiento (*SGR*), tiempo de duplicación (*td*), asimilación de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}), F0, producción de clorofila a (*Chla*) y ficoeritrina tanto en los controles como en los enriquecidos. Del mismo modo, encontramos los valores de F (p-valor) de todos los *ANOVA*'s realizados a las distintas variables.

Parámetros	Unidades	($\bar{X} \pm sd$)	F (p-valor)
Productividad <i>PBR</i> 's Control	mg /L*día	18.69±5.47	0.08 (0.96)
Productividad <i>PBR</i> 's Iodo	mg /L*día	6.49±4.89	0.56 (0.66)
<i>SGR</i> <i>PBR</i> 's Control	(1%/día)	13.55±2.94	0.08 (0.96)
<i>SGR</i> <i>PBR</i> 's Iodo	(1%/día)	6.54±3.89	0.56 (0.66)
<i>td</i> <i>PBR</i> 's Control	Horas	1.37±0.41	0.08 (0.96)
<i>td</i> <i>PBR</i> 's Iodo	Horas	5.29±3.35	0.56 (0.66)
NO_3^- <i>PBR</i> 's Control	mg NO_3^- /L	1.62±0.28	0.03 (0.98)
NO_3^- <i>PBR</i> 's Iodo	mg NO_3^- /L	1.00±0.43	0.20 (0.88)
PO_4^{3-} <i>PBR</i> 's Control	mg PO_4^{3-} /L	1.52±0.13	0.01 (0.99)
PO_4^{3-} <i>PBR</i> 's Iodo	mg PO_4^{3-} /L	1.30±0.43	0.12 (0.93)
F0 <i>PBR</i> 's Control	Unidades relativas	64.43±21.18	0.19 (0.90)
F0 <i>PBR</i> 's Iodo	Unidades relativas	54.36±5.96	0.04 (0.98)
<i>Chla</i> <i>PBR</i> 's Control	µg /L*día	0.06±0.04	0.32 (0.81)
<i>Chla</i> <i>PBR</i> 's Iodo	µg /L*día	0.02±0.01	0.59 (0.65)
Ficoeritrina <i>PBR</i> 's Control	µg /ml*día	0.002±0.0004	0.09 (0.96)
Ficoeritrina <i>PBR</i> 's Iodo	µg /ml*día	0.001±0.0001	1.33 (0.38)

En la tabla **XII** se encuentran los datos arrojados por las pruebas *t-student* realizadas sobre las poblaciones de este experimento. Observándose diferencias significativas entre las producciones control y enriquecidas para la especie *Rhodorus marinus*.

Tabla XII: Valores de t y *p*-valor para los análisis de las medias (*T-student*) entre las producciones control y las expuestas al yodo. Datos sobre estos análisis según la producción, tasa de crecimiento (SGR), asimilación de nitratos y fosfatos así como, la tasa de F0, producción en clorofila a y ficoeritrina.

Especie	Análisis estadístico t-student	t (<i>p</i> -valor)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Producción PBR's C VS Iodo	3.42 (0.04) *
	SGR PBR's C VS Iodo	3.01 (0.05)
	Td PBR's C VS Iodo	1.56 (0.21)
	NO_3^- PBR's C VS Iodo	3.88 (0.03) *
	PO_4^{3-} PBR's C VS Iodo	1.26 (0.29)
	F0 PBR's C VS Iodo	0.65 (0.56)
	Chla PBR's C VS Iodo	1.86 (0.16)
	Ficoeritrina PBR's C VS Iodo	0.85 (0.46)

*Nivel de diferencias entre medias según el *p*-valor arrojado por la prueba estadística *t-student* a un nivel alfa de 0.05. C = Control; Iodo = 20, 10, 7.5 y 5 μ M KIO_3 .

En la figura 18 se encuentran las medias de producción (eje Y) en función de las dos poblaciones (eje X) observadas en este experimento, control y enriquecidas. Se observa en la figura 19 la asimilación de nitratos registrada por la especie *R. rubrum* (eje Y). Encontrándose en ambas figuras diferencias entre las poblaciones control y enriquecidas. Sin embargo, en la figura 20 las diferencias no son significativas. Ésta corresponde a la asimilación de fosfatos por parte de la cepa utilizada.

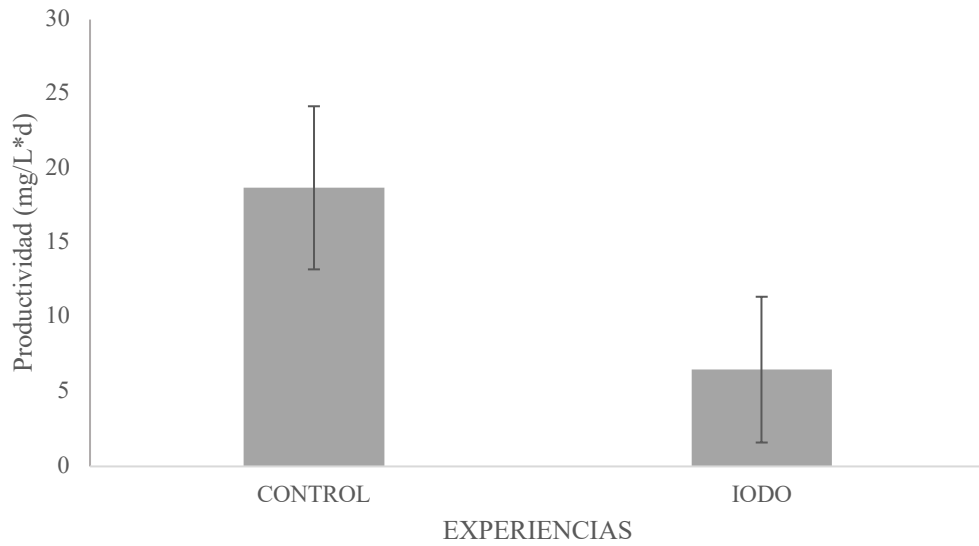


Figura 18: Medias de producción en las poblaciones control (18.69 mg/L*día) y en la enriquecida en iodo (6.49 mg/L*día). Encontrándose en las barras de error las desviaciones típicas pertinentes de ambas medias.

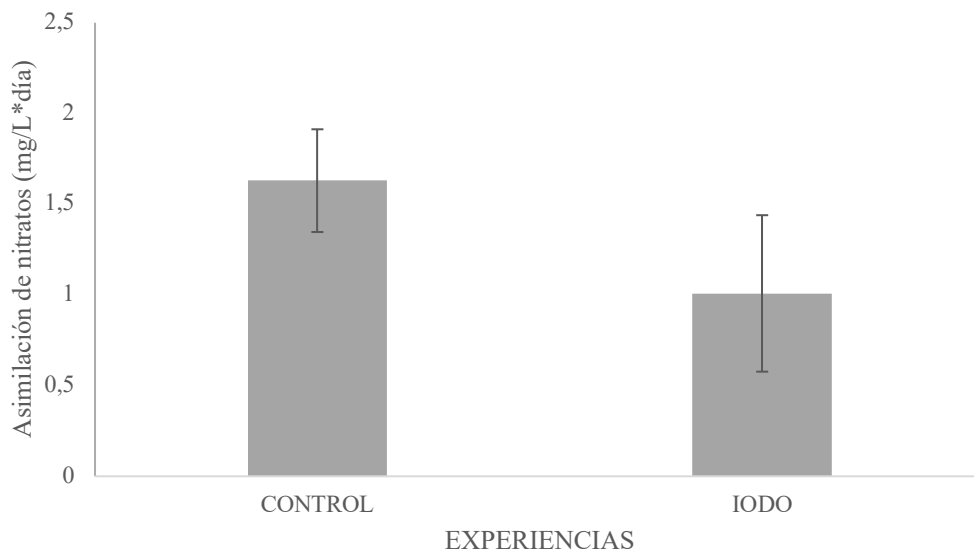


Figura 19: Asimilación de nitratos tanto en la población control (1.62 mg/L*día) como en la enriquecida en iodo (1.00 mg/L*día).

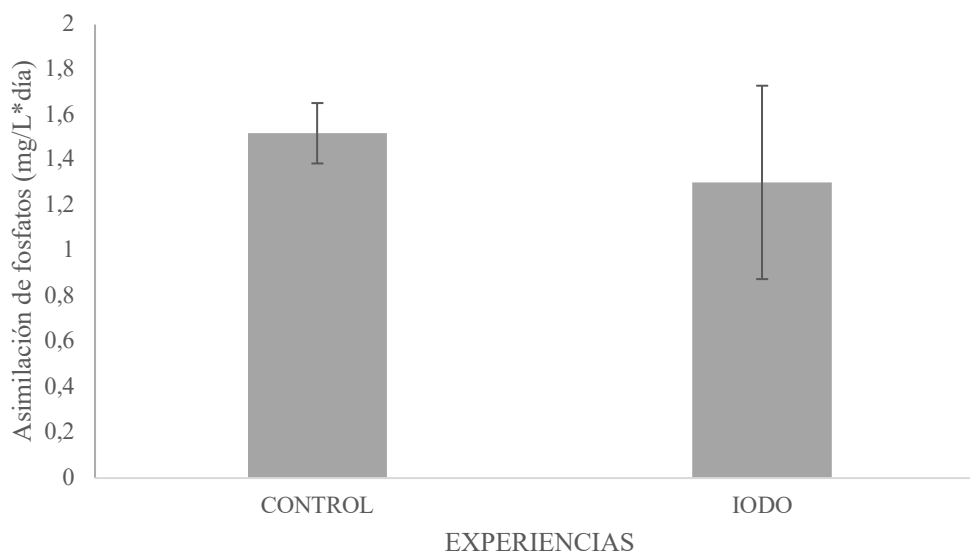


Figura 20: Se observan las medias de asimilación de fosfatos tanto en la población control (1.52 mg/L* día) como en la enriquecida en iodo (1.30 mg/L* día). Encontrándose en las barras de error las desviaciones típicas de cada una de ellas.

4. DISCUSIÓN

Los niveles de iodo son un parámetro reconocido por su incidencia en la falta de balance en el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides que provoca distintas afecciones en la salud humana (Farebrother *et al.*, 2019) y para lo que se ha utilizado con buenos resultados el aporte del yoduro de potasio entre otros. A lo largo de la historia del ser humano, éste ha obtenido aportes de iodo mediante la ingestión de productos procedentes del mar. En las poblaciones interiores, donde el acceso a estos productos es más complejo, se han registrado afecciones derivadas de la falta de este elemento. Weng *et al.* (2014) investigó fertilizantes enriquecidos para la obtención de vegetales con alto contenido en iodo y así corregir estas deficiencias.

Las microalgas son organismos polivalentes que poseen diferentes nutrientes y productos de alto valor añadido en función de la especie y su modo de cultivo (Plaza *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2017). En los últimos años se ha producido un crecimiento en

la acuicultura, en 2018 la producción ascendió a un total de 114.5 millones de toneladas, de las que 87.000 serían de microalgas cultivadas. El 56.2% de éstas son utilizadas como alimento para larvas de peces, crustáceos y moluscos (Spolaore *et al.*, 2006; Hernández-Pérez *et al.*, 2014; FAO, 2020). Se remarca la idea, por su importancia en este estudio, de que la acuicultura hace uso de las microalgas para la obtención de larvas y futuros adultos con una buena nutrición con alto contenido en proteínas, lípidos (DHA y EPA), antioxidantes y pigmentos para el beneficio de la salud de dichos organismos (Cifuentes *et al.*, 1996; Izquierdo, 1996; Izquierdo y Kowen, 2010; Figueroa *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2016; Basfard *et al.*, 2020).

Se hace mención de la existencia de estudios previos en los que se observa la adición de dietas enriquecidas en distintos nutrientes para su utilización en organismos de acuicultura. El enriquecimiento de las presas mediante algas y la adición de iodo en las dietas, son campos ya estudiados por otros autores (Lall *et al.*, 1985; João *et al.*, 2016). El elemento iodo tiene una gran importancia en el cultivo larvario de los organismos marinos con especial incidencia en las especies que sufren metamorfosis durante este periodo (Solbakken *et al.*, 2002; Hamre *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012), es por ello que se ha examinado los requerimientos de iodo en determinadas especies y su toxicidad (Hamre *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2012; Penglase *et al.*, 2013; Penglase *et al.*, 2015) así como el enriquecimiento en iodo de presas vivas para la posterior alimentación de larvas de peces (Moren *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2015a) consiguiéndose una mayor concentración de este elemento en los filetes de pescado (Julshamn *et al.*, 2006). Igualmente se han desarrollado estudios de enriquecimiento mediante otros productos entre los que destaca WSB (Langdon *et al.*, 2008; Hawkyard *et al.*, 2011; Hawkyard *et al.*, 2014). Otros han

realizado experiencias de enriquecimiento de rotíferos llegando a conseguir buenos niveles de iodo en algunos ejemplares (Cisneros, 2011; Srivastava *et al.*, 2012; Cruz, 2019; López Anaya, 2019).

Todo lo anteriormente expuesto avala el posible uso de las microalgas como producto enriquecedor en los elementos esenciales o necesarios para la mejora del crecimiento de los organismos acuáticos en función de ser alimento de las presas vivas y su consiguiente enriquecimiento o, ser alimento directo de larvas de peces o crustáceos habiéndose ejecutado pruebas, estudios y conclusiones donde se interpreta favorablemente el papel de las microalgas en la captación del elemento iodo (Burianova *et al.*, 2005; Gómez-Jacinto *et al.*, 2010; Iwamoto y Yoshihiro, 2012; Bergeijk *et al.*, 2013; Hernández, 2014; Thorenz *et al.*, 2014). Lo que hace indicar una buena asimilación del elemento iodo por parte de las microalgas seleccionadas: *Isochrysis galbana*, *Parachlorella sp.*, *Microchloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Euglena cantabrica* y *Rhodospirillum rubrum*.

4.1. Primer experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a la misma concentración de iodo en microalgas

Como elemento inicial se procede a discutir los datos obtenidos en el experimento donde se cultivaron las cinco cepas de microalgas seleccionadas en un medio enriquecido en iodo y con los datos obtenidos se aprecia y elige la mejor candidata para crecer en un medio con estas condiciones. Particularmente, los datos de *Isochrysis galbana* sugieren que en presencia de este elemento no es capaz de crecer como lo haría en condiciones normales por lo que se detectan datos negativos de producción para esta especie, y en consecuencia, diferencias significativas entre la población control y la enriquecida (*p*-

valor < 0.05). Observándose crecimientos normales para dicha especie en otros autores (Iwamoto y Shiraiwa, 2012; Bergeijk *et al.*, 2013). En el caso de la especie *Parachlorella sp.*, no se encuentran diferencias significativas entre ambas producciones (*p-valor* > 0.05) por lo que nos lleva conclusivamente a la idea de que una mayor concentración de iodo no afecta al crecimiento normal de sus células, concepto avalado por otros autores donde se observa que dicha especie es capaz de captar elementos químicos del medio de forma óptima y sin afectar a su crecimiento o producción (Shimura *et al.*, 2012; Dirbaz y Roosta, 2018). Prosiguiendo con la evaluación de datos de las tres especies restantes (*P. tricornutum*, *M. gaditana* y *E. cantabrica*) se detecta que todas ellas presentan diferencias significativas (*p-valor* < 0.05) entre sus poblaciones control y las enriquecidas determinándose la mayor diferencia estadística en la especie *E. cantabrica*. Estos resultados implican que al igual que ocurre con la especie *Parachlorella sp.*, la presencia de iodo en el medio de cultivo de estas cepas no se manifiesta de forma negativa en su producción. En el caso de la diatomea, el actual resultado es apoyado gracias al estudio realizado por Paulín en 2010 en la diatomea *P. tricornutum*, donde se modifican los nutrientes de cultivo y a su vez, la composición química final de la microalga. Además, gracias a la bibliografía es sabido que estos microorganismos (diatomeas) utilizan el elemento iodo en su medio natural en el proceso de reducción iodato-ioduro (Cuesta y Manley, 2009; Bluhm, 2010) por lo que respalda el óptimo resultado de producción y crecimiento por parte de esta especie en presencia de la alta concentración del elemento químico en cuestión. Respecto a la alta producción atisbada en la especie de agua dulce (*E. cantabrica*), era de esperar que la alta concentración de iodo no afectara negativamente puesto que otros autores (Mahapatra *et al.*, 2013) han estudiado la capacidad de captación por parte de esta especie de elementos químicos encontrados en su medio natural de cultivo.

Los datos de *SGR* observados en la primera experiencia fueron mayores en las poblaciones control que en las enriquecidas para todas las especies, encontrándose diferencias significativas en el análisis estadístico entre todas ellas ($p\text{-valor} < 0.05$). Estos resultados muestran un mayor crecimiento por parte de las poblaciones control que disponen de un medio de cultivo común respecto a las enriquecidas con mayor concentración de iodo. Se observa un menor *td* en las poblaciones control. Las especies que poseen mayores diferencias significativas entre el crecimiento de las poblaciones control y las enriquecidas (*E. cantabrica* y *P. tricornutum*) fueron las máximas productoras en la experiencia por lo que se designó que fueran las más significativas respecto al crecimiento. En cuanto a las especies *Parachlorella sp.* y *P. tricornutum* no presentaron diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0.05$) entre los *td* encontrados en ambas poblaciones. *P. tricornutum* presentó diferencias significativas tanto para el crecimiento como para la producción, en cambio, no aparecieron estas diferencias respecto al tiempo de duplicación, que fue similar en las dos poblaciones, lo cual nos indica la similitud de crecimiento entre ambas poblaciones y la no afección del iodo al crecimiento de esta especie como se comenta anteriormente. En conclusión, se seleccionaron las cepas más productivas y con mayor crecimiento (*E. cantabrica*, *P. tricornutum* y *Parachlorella sp.*) para su valorización en el segundo experimento a distintas concentraciones de iodo.

4.2. Segundo experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a distintas concentraciones de iodo en *P. tricornutum* y *E. cantabrica*

Se cultivaron dos de las especies más productivas a cuatro concentraciones diferentes de iodato de potasio, siendo las elegidas las *P. tricornutum* y *E. cantabrica* señalándose la imposibilidad de realizar el cultivo de *Parachlorella sp.*, debido al confinamiento mencionado anteriormente (COVID-19).

Aunque la diatomea *P. tricornutum* presentaba diferencias en el primer experimento, los datos arrojados por la segunda experiencia no expresan diferencias entre la población control y la enriquecida con las distintas concentraciones ($p\text{-valor} > 0.05$), esto sugiere de nuevo la idea de no afcción en la producción de diatomeas frente a altas concentraciones de elementos químicos como puede ser el iodo, observada en el pasado por otros autores (Cuesta y Manley, 2009; Bluhm, 2010; Paulín, 2010). No obstante, con el detenido estudio de representación gráfica de dichas producciones (Figuras 16 y 17) se valoró la máxima producción encontrada a 3 μM de KIO_3 lo que impulsó la realización de otro análisis estadístico entre la producción control y la producción a 3 μM para la especie *P. tricornutum* encontrando diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) y justificando las observadas en la figura. Al igual que para la diatomea la especie de agua dulce *E. cantabrica*, presenta su máximo de producción a la concentración de 3 μM (42.01 mg/L*día). Se encontraron diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) entre todas las poblaciones y también, particularmente entre la producción máxima y el control. No menos importante, se hace apreciar que estas últimas pruebas entre concentraciones se realizaron mediante *t-student*. Con el propósito de justificar esta diferencia entre las producciones en presencia de iodo y el control, se realizó un *ANOVA* para todas las concentraciones no encontrándose diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0,05$) entre ellas. Estos resultados nos indican un claro efecto positivo del elemento iodo en el cultivo de esta especie (Mahapatra *et al.*, 2013) e incluso podría proyectarse en estudios futuros el uso de este elemento para maximizar la producción de esta cepa.

La especie *P. tricornutum* no presentó diferencias significativas en ninguno de los niveles de enriquecimiento respecto al control. La *SGR* más alta se presentó en la población enriquecida a 3 μM de KIO_3 , encontrándose el menor *td* en ésta misma. Esto

sugiere que el yodo no afecta negativamente pero tampoco positivamente puesto que, no se encontró un mayor crecimiento en las poblaciones enriquecidas respecto al control. Lo que justifica que otros autores hayan observado un crecimiento normal por parte de diatomeas en la naturaleza (Cuesta y Manley, 2009; Helmke Hepach *et al.*, 2020; Hernández, 2014; Thorenz *et al.*, 2014). Al contrario, en la especie *E. cantabrica* se observaron diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) en los crecimientos registrados en las distintas poblaciones. Al igual que para la anterior cepa, la mayor *SGR* y el menor *td* se encuentra en la población expuesta a 3 μM de KIO_3 , lo que además justifica la mayor producción aquí registrada y asimismo, la idea del uso del yodo para aumentar el crecimiento de esta especie expuesta con anterioridad.

4.3. Tercer experimento: Discusión de los datos de enriquecimiento a distintas concentraciones de yodo en cultivo de *R. marinus* a escala piloto

Cabe mencionar, que las especies *P. tricornutum* y *E. cantabrica* hubieran sido las idóneas para el estudio a escala experimental, pero como ya se ha mencionado anteriormente, la especie *R. marinus* fue la escogida por falta de tiempo y por su adaptación a las condiciones *outdoor*. Como seguimiento del proceso se discuten los resultados de producción en las poblaciones control y enriquecidas generadas en el experimento a escala piloto para la especie *Rhodorus marinus* en la que se encuentran diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) entre ambas poblaciones, obteniéndose 18.69 mg/L*día en el control y 6.49 mg/L*día en los enriquecidos (Figura 18). En otros artículos se mostró la incapacidad de adaptación por parte de esta microalga a cambios en la salinidad, debido a que no puede regular los cambios osmóticos necesarios para mantener la integridad de las células (Molina *et al.*, 2007). Específicamente, no se encontró bibliografía referida al enriquecimiento de esta especie con elementos químicos

por lo que se suscita la reflexión de que el elemento iodo representa un efecto negativo en los cultivos de esta especie *Rhodophyta*.

Se reconoce que en este experimento se utilizaron distintas concentraciones de iodo que a escala laboratorio y que además fue inviable la realización de réplicas (mínimo tres) por falta de material (*PBR's*) lo cual imposibilitó la ejecución de la prueba estadística correspondiente para observar si hubo diferencias entre las concentraciones. En lo referente a la producción tanto de clorofila a, como de ficoeritrina, se examinaron las mayores producciones en la población control siendo reseñable que no se detectaron diferencias significativas entre las producciones registradas en la población control y la enriquecida. Básaca-Loya *et al.*, (2009) encontraron cantidades mayores de ficoeritrina en sus resultados (1.292 mg a partir de 4 g de biomasa liofilizada) en comparación con los registrados en los actuales cultivos de la *Rhodophyta*, a diferencia de que sus resultados son de biomasa purificada y los nuestros a través del fluorímetro con muestras líquidas.

No se encontraron diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0.05$) entre las tasas *SGR* del control y de las enriquecidas, así como en el tiempo de duplicación. La mayor tasa de crecimiento y el menor tiempo de duplicación fueron encontrados en la población control, suscitando el hecho de que para esta especie la adición de iodo no provee beneficio en el crecimiento. No menos importante, es la problemática de la imposibilidad de realizar réplicas, por lo que todo esto puede afectar a las conclusiones respecto a si el iodo es un buen enriquecedor y si genera algún beneficio en el crecimiento de esta especie de agua salada.

En lo respecto a nitratos (NO_3^-) se halló mayor tasa de asimilación en la población control, observándose también diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) entre ambas poblaciones, control y enriquecida. Gracias al trabajo realizado por Sada *et al.*, (1989) se observó que la cantidad de nitratos en el medio no afecta al crecimiento de la *Rhodophyta Porphyridium cruentum*, lo cual puede originar la conclusión de que el yodo afecta negativamente al crecimiento de *R. marinus* puesto que en los cultivos enriquecidos se encontró menor cantidad de nitratos retirados del medio. En cuanto a fosfatos (PO_4^{3-}) se encontró la mayor tasa de asimilación en la población control, no obstante, no hubo el menor atisbo en cuanto a diferencias significativas entre la población control y la enriquecida. Los datos, estadísticamente analizados, señalan una mala asimilación de los compuestos de nitratos y fosfatos utilizados por la microalga en presencia de exceso de yodo, insinuando que la asimilación de fosfatos no se ve tan afectada por el enriquecimiento, como sí ocurre con los nitratos (Figuras 19 y 20).

4.4. Análisis de la asimilación de yodo por parte de las microalgas

Tras decidir rechazar algunos de los métodos utilizados en este trabajo para analizar el yodo acumulado por las microalgas se implementó la técnica colorimétrica realizada por Nunes *et al.* (2019), cuyo protocolo se basa en el análisis del yoduro contenido en macroalgas en su mayor parte. Debido a la falta de tiempo por la situación de excepcionalidad social del datado de este estudio, a lo que se añade la indisponibilidad de todos los reactivos, no fue posible concluir el análisis de las muestras del presente trabajo. Además, Hernández (2014) propuso la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas como técnica analítica en su tesis para observar el yodato e yoduro en forma de hormonas tiroideas en microalgas marinas, obteniendo resultados satisfactorios.

Existen trabajos sobre el papel de las diatomeas en la reducción de iodato a ioduro en la naturaleza (Wong *et al.*, 2002; Bluhm *et al.*, 2010; Thorenz *et al.*, 2014). Además, se encontraron alrededor de 0.25 µg de iodo por gramo de peso seco de la especie *P. tricornutum* en Hernández (2014), a un enriquecimiento de 0.5 µM de KIO_3 . Por lo que se sugiere, que la población de dicha especie expuesta en este trabajo a 3 µM de KIO_3 haya asimilado iodo correctamente (Cuesta y Manley, 2009; Iwamoto y Shiraiwa, 2012), igualando o incluso superando, los valores encontrados por Hernández (2014).

5. CONCLUSIONES

1. La especie *Parachlorella sp.* presentó los mejores resultados de producción y crecimiento a la concentración de 1.5 µM de KIO_3 , seguida de *E. cantabrica* > *P. tricornutum* > *M. gaditana* > *I. galbana*. Por tanto, se ha conseguido cultivar microalgas a concentraciones de iodo superiores a las encontradas en el medio natural.
2. En las cepas *E. cantabrica* y *P. tricornutum* se observaron datos de producción y crecimiento mayores en poblaciones enriquecidas a distintas concentraciones de iodo respecto a las control. Siendo la concentración de 3 µM de KIO_3 la que optimizó la producción en ambas cepas. Por lo que, se concluye con la necesidad de adaptación de las especies a estas concentraciones de iodo.
3. A escala experimental se observó un mayor crecimiento y producción en las poblaciones control que en las enriquecidas con iodo. Por tanto, el iodo afecta negativamente a la especie *R. marinus*. Encontrándose la mejor producción dentro de las poblaciones enriquecidas a 5 µM de KIO_3 .
4. Son necesarios estudios futuros con la especie *Parachlorella sp.* y además, realizar la escala experimental en las cepas más productivas a escala laboratorio.

5. Debido a la necesidad existente de enriquecer presas vivas en nutrientes esenciales para el cultivo larvario de especies cultivadas en acuicultura, se considera el uso de estas microalgas enriquecidas en iodo para niveles tróficos superiores y por tanto, es imprescindible el futuro análisis de la asimilación de iodo en estas cepas.
6. La maximización en la producción gracias al enriquecimiento del medio de cultivo de las microalgas con iodo supone una mejora en la producción de ciertas cepas, lo que genera información de interés en estudios de cultivos de microalgas.

REFERENCIAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo P., Torres, E., Herrero, C., 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. En: *Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións* (Eds.), España.
- Amirkolaie, A.K., Leenhouders, J.I., Verreth, J.A.J., Schrama, W.J., 2005. Type of dietary fibre (soluble versus insoluble) influences digestion, faeces characteristics and faecal waste production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research* 36, 1157-1166.
- Anaya, L.Y.P., 2019. Evaluación del enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*. Ph. D. Thesis. *Universidad de Baja California*, México.
- Andersen, R.A., 2005. Algal culturing techniques. En: F. Cynar y J. Hele (Eds.). *Phycological Society of America. Academic Press in Elsevier*.
- APROMAR, 2019. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. *Informe la acuicultura en España*, 23-39.
- Arévalo, J.M., Arribas, J.L., Hernández, M.J., Lizán, M., Herruzo, R., 1998. Guía de utilización de antisépticos. *Grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos* (SEMPSPH), 1-11.
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. En: B.O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno, M. Arce y G. A. Gómez (Eds.). *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, S. C. La Paz B.C.S., México.
- Barkia, I., Saari, N., Manning, S.R., 2019. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine drugs* 17, 304.
- Barroso, F.G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M.J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A., Pérez-Bañón, C., 2013. The potential of various species for use as food for fish. *Aquaculture* 422-423, 193-201.
- Bartet, D., 2002. Yodo. *Educación Química* vol. 1, 69-70.
- Básaca-Loya, G.A., Valdez, M.A., Enríquez-Guevara, E.A., Gutiérrez-Millán, L.E., Burboa, M.G., 2009. Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias marinas* 35(4), 359-368.
- Basford, A.J., Mos, B., Francis, D.S., Turchini, G.M., White, C.A., Dworjanyan, S., 2020. A

- microalga is better than a commercial lipid emulsion at enhancing live feeds for an ornamental marine fish larvae. *Aquaculture* 523, 735203.
- Bergeijk, S.A., Hernández, J.L., Heyland, A., Manchado, M., Cañavate, J.P., 2013. Uptake of iodide in the marine haptophyte *Isochrysis sp.* (T . ISO) driven by iodide oxidation. *J. Phycol* 49, 640-647-647.
- Bischoff, H.W., Bold, H.C., 1963. Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas Publication* N° 6318: [1]-95.
- Bluhm, K., Croot, P., Wuttig, K., Lochte, K., 2010. Transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton driven by cell senescence. *Aquatic Biology* 11, 1-15.
- Bohne, V.J.B., Lundebye, A., Hamre, K., 2008. Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food and Chemical Toxicology* 46, 1834-1843.
- Bold, H.C., 1949. The morphology of *Chlamydomonas*. *Chlamydogama sp.*, nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76 (2), 101-108.
- Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70, 313-321.
- Boussiba, S., Voshak, A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 37(7), 1077-1082.
- Burianová, I., Machát, J., Niedobová, E., Doucha, J., Kanicky, V., 2005. Fractionation of iodine in iodine-enriched algae *Chlorella*. *Food Chemistry & Biotechnology* 99, 49-652.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility , tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253-271.
- Cai, H.R., Yang, Q.H., Tan, B.P., Dong, X.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., Zhang, S., 2016. Effects of dietary manganese source and supplemental levels on growth performance, antioxidant enzymes activities, tissue Mn concentrations and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) mRNA expression level of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture nutrition* 23, 603-610.

- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M.C., González-López, C.V., Fernández-Sevilla, J.M., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E., 2013. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresource Technology* 144, 57-66.
- Canales-Gómez, E., Correa, G., Viana, M.T., 2010. Efecto de la adición de tres pigmentos carotenoides comerciales (astaxantina, cantaxantina y β -caroteno) en la dieta sobre la coloración de la concha o nácar de juveniles de abulón rojo *Haliotis rufescens*. *Vet. Méx.* 41(3), 191-200.
- Carvalho, M., Peres, H., Saleh, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Oliva-Teles, A., Izquierdo, M., 2018. Dietary requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for fast growth of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fingerlings. *Aquaculture* 488, 105-113.
- Cifuentes, A.S., Gonzalez, M., Parra, O., Zuñiga, M., 1996. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. *Revista Chilena de Historia Natural* 69, 105-112.
- Cisneros, R., 2011. Rendimiento poblacional del rotífero nativo *Brachionus sp.* "Cayman", utilizando diferentes enriquecedores. *Ecología aplicada* 10(2), 99-105.
- Ciuguela, I., Triemer, E.R., 2010. A color Atlas of Photosynthetic Euglenoids. En: I., Ciguela y E.R., Triemer (Eds.). *Michigan State University Press*, EE. UU.
- Cruz I., 2019. Evaluación de microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*. Ph. D. Thesis. *Universidad de Baja California*, México.
- Cuesta, J.L. De Manley, S.L., 2009. Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions. *Limnology and oceanography* 54(5), 1653-1664.
- Delibano, E.V., 2015. Optimización del enriquecimiento de nauplios de *Artemia* mediante el uso de emulsiones lipídicas formuladas a partir de aceites sintéticos en DHA. Ph. D. Thesis. *Universidad de Valencia*, España.
- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M.I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J., Cifuentes, M., 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional.

Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología 34, 156-174.

- Dirbaz, M., Roosta, A., 2018. Adsorption, kinetic and thermodynamic studies for the biosorption of cadmium onto microalgae *Parachlorella sp.* *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 2302-2309.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 - *meeting the sustainable development goals*. Rome 210 pp.
- Farebrother, J., Zimmermann, M.B., Andersson, M., 2019. Excess iodine intake: sources, assessment, and effects on thyroid function. *Annals of the new york academy of sciences* 1446, 44-65.
- Fawley, M.W., Jameson, I., Fawley, K.P., 2015. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (*Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae*), with descriptions of *N. australis sp. nov.* and *Microchloropsis gen. nov.* *Phycologia* 54 (5), 545-552.
- Figuerola, F.L., Korbee, N., de la Coba, F., Jerez, C.G., Barufi, J.B., Güenaga, L., Gómez-Pinchetti, J.L., Abreu, M.H., Pereira, R., Sousa-Pinto, I., 2011. Valorización de la biomasa de macroalgas en acuicultura multitrófica integrada (AMTI): aplicaciones en cosmética y nutracéutica (fotoprotectores y antioxidantes). En: *Macroalgas en la Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular*. Vázquez Ferreiro, U., Incera Filgueira, M., Fernández Otero, Maroto Leal, J., (Eds.). *Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR*, 111-137, España.
- Fisher, B.J., 1987. Guinness, Gosset, Fisher, and Small Samples. *Statistical Science* 2(1), 45-52.
- Ford, W.T., 1984. A comparative ultrastructural study of *Cyanidium caldarium* and the unicellular red alga *Rhodorus marinus*. *Annals of Botany* 53, 285-294.
- Geven, E.J.W., Nguyen, N., Boogaart, M., Spanings, F.A.T., Flik, G., Klaren, P.H.M., 2007. Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). *The Journal of Experimental Biology* 210, 4005-4015.
- Gomez, A.L., López, J.A., Rodríguez, A., Fortiz, J., Martínez, L.R., Apolinar, A., Enríquez, L.F., 2016. Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas

- sometidas a diferentes condiciones de iluminación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44, 137-143.
- Gómez-Jacinto, V., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C., Gómez-Ariza, J.L., 2010. Iodine speciation in iodine-enriched microalgae *Chlorella vulgaris*. *Pure and Applied Chemistry* 82, 473-481.
- Gómez-Loredo, A., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2015. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornerutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. *Journal of Applied Phycology* 27(3), 849-860.
- Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., Reboloso-Fuentes M^a.M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgae species. *Journal of Food Engineering* 65, 511-517.
- Guillard, R.R.L., 1973. "Division rates". En: J., R., Stein, (Eds.). *Handbook of Phycological Methods: Cultures methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 289-312.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020. Description of *Euglena cantabrica* by AlgaeBase. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020a. Description of *Isochrysis galbana* microalgae by AlgaeBase. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020b. Description of *Nannochloropsis gaditana* by AlgaeBase. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020c. Description of *Parachlorella sp.* by AlgaeBase. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020d. Description of *Phaeodactylum tricornerutum* by AlgaeBase. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2020e. Description of *Rhodorus marinus* by Algae Base. World-wide electronic publication, *University of Ireland, Galway*.
- Gutiérrez, M.F.P, Romero, G.A.J, Barros, A.D., Ruiz, J.R., 2017. Cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.* para alimentación de larvas de peces marinos. *Mutis* 7, 81-85.
- Hamre, K., Opstad, I., Espe, M., Solbakken, J., Hemre, G.I., Pittman, K., 2002. Nutrient composition

- and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* , L .) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. *Aquaculture nutrition* 8, 139-148.
- Hamre, K., Moren, M., Solbakken, J., Opstad, I., Pittman, K., 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L .). *Aquaculture* 250, 555-565.
- Hamre, K., Mollan, T.A., Sæle, Ø., Erstad, B., 2008. Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture* 284, 190-195.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335-347.
- Hawkyard, M., Sæle, Ø., Nordgreen, A., Langdon, C., Hamre, K., 2011. Effect of iodine enrichment of *Artemia* sp . on their nutritional value for larval zebra fi sh (*Danio rerio*). *Aquaculture* 316, 37-43.
- Hawkyard, M., Laurel, B., Langdon, C., 2014. Rotifers enriched with taurine by microparticulate and dissolved enrichment methods influence the growth and metamorphic development of northern rock sole (*Lepidopsetta polyxystra*) larvae. *Aquaculture* 424-425, 151-157.
- Heo, J., Shin, D., Cho, K., Cho, D., Lee, Y.J., Kim, H., 2018. Indigenous microalga *Parachlorella* sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productiviti via regulation of light intensity and carbon source. *Algal Research* 33, 1-7.
- Hepach, H., Hughes, C., Hogg, K., Collings, S., Chance, R., 2020. Common features of iodate to iodide reduction amongst a diverse range of marine phytoplankton. *Biogeosciences-Discussions* 17, 2453-2471.
- Hernández, A., García-García, B., Jordán, M.J., Martínez-Conesa, C., Hernández, M.D., 2011. Antioxidantes provenientes de plantas aromáticas en pienso para peces marinos, efecto sobre la oxidación lipídica. En: Congreso Nacional de Acuicultura, *Universidad de Murcia*, España.
- Hernández, L.J., 2014. Metabolismo del yodo y síntesis de hormonas tiroideas en microalgas marinas. Ph. D. Tesis. *Universidad de Cádiz*, España.
- Hernández-Pérez, A., Labbé, J.I., 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(2), 157-173.

- Hors, J.P.C., 2011. Funciones de las microalgas en acuicultura. En: CETMAR (Eds.). Las algas como recurso: valorización. Aplicaciones industriales y tendencias, España, 193-205.
- Houng-Yung, C., Yu-Chun, C., Li-Chi, H., Meng-Hsien, C., 2014. Dietary zinc requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 432, 360-364.
- Hung, C., Wong, G.T.F., Dunstan, W.M., 2005. Iodate reduction activity in nitrate reductase extracts from marine phytoplankton. *Bulletin of marine science* 76, 61-72.
- Iwamoto, K., Shiraiwa, Y., 2012. Characterization of intracellular iodine accumulation by iodine-tolerant Microalgae. *Procedia Environmental Sciences* 15, 34-42.
- Izquierdo, M.S., 1996. Review Article. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2, 183-191.
- Izquierdo, M.S., Koven, W., 2010. Lipids. En: Wiley-Blackwell, John Wiley and Sons Publishers (Eds.). *On Larval Fish Nutrition*, 47-80.
- Jerez-Martel, I., García-Poza, S., Rodríguez-Martel, G., Rico, M., Afonso-Olivares, C., Gómez-Pinchetti, J.L., 2017. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and *Cyanobacteria* strains. *Journal of food Quality* 2017, 1-8.
- João, M.P., Salas-Leitón, E., Ferreira, L., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Abreu, H., Alexandre, P., Magalhães, J.F., Octávio de Almeida, R., 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture reports* 3, 189-197.
- Julshamn, K., Maage, A., Waagbø, R., Lundebye, A., 2006. A preliminary study on tailoring of fillet iodine concentrations in adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L .) through dietary supplementation. *Aquaculture Nutrition* 12, 45-51.
- Kim, K., Wook, J., Kim, S., Jung, J., Han, H., 2020. Biological wastewater treatment : Comparison of heterotrophs (BFT) with autotrophs (ABFT) in aquaculture systems. *Bioresource Technology* 296, 122293.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., Tsuji, Y., 1997. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 351-356.

- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T., Wolf, M., 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43 (5), 529-542.
- Lall, S.P., Paterson, W.D., Hines, J.A., Adams, N.J., 1985. Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification. *Journal of Fish Diseases* 8, 113-124.
- Langdon, C., Nordgreen, A., Hawkyard, M., Hamre, K., 2008. Evaluation of wax spray beads for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and antibiotics to *Artemia*. *Aquaculture* 284, 151-158.
- Lewin, J.C., Lewin, R.A., Philpott, D.E., 1958. Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *The Journal of General Microbiology* 18, 418-426.
- Liu, J., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4785-4798.
- Lubián, L.M., 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva *Eustigmatophyceae* marina. *Lazaroa* 4, 287-293.
- Mahapatra, D.M., Chanakya, H.N., Ramachandra, T.V., 2013. *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology* 25, 855-865.
- Mendoza, Á., Morales, V., Sánchez-Bayo, A., Rodríguez-Escudero, R., González-Fernández, C., Fernando, L., Vicente, G., 2020. The effect of the lipid extraction method used in biodiesel production on the integrated recovery of biodiesel and biogas from *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana* and *Arthrospira platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 154, 107428.
- Molina, L., Jonte, L., Mora, R., Ortega, J., Morales, E., 2007. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Rhodorus marinus* (Rhodophyta) en cultivos discontinuos. *Fav. Agron. (LUZ)* 24, 249-253.
- Moren, M., Opstad, I., Meeren, T., Hamre, K., 2006. Iodine enrichment of *Artemia* and enhanced levels of iodine in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed the enriched *Artemia*. *Aquaculture Nutrition* 12, 97-102.

- Mujica, R.A., Carvajal, U.C., Miranda, E.O., 1995. Cultivo experimental de *Tigriopus sp.* (*Copepoda: Harpacticoidea*). *Invest. Mar., Valparaíso* 23, 75-82.
- Narejo, M.A.P., 2006. Efectos de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta del sargo picudo (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777). Master Thesis. *Universidad de las Palmas, España*.
- Navarro, Z.S., Fernández, R.C.V., 2009. La nutrición y alimentación en piscicultura. En: Fundación Observatorio Español de Acuicultura (Eds.), España.
- Nunes, N., Valente, S., Ferraz, S., Barreto, M.C., Pinheiro de Carvalho, M.A.A., 2019. Validation of a spectrophotometric methodology for a rapid iodine analysis in algae and seaweed casts. *Algal Research* 42, 101613.
- Olivares, M., Pizarro, M., Ruz, M., López de Romaña, D., 2012. Acute inhibition of iron bioavailability by zinc: studies in humans. *Biometals* 25, 657-664.
- Ott, D.F., 1967. *Rhodorus marinus* Geitler: a new addition to the marine algal flora of the western hemisphere. *J. Phycol.* 3, 158-159.
- Parke, M., 1949. Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28, 255-286.
- Pascual, E., Yúfera, M., 1987. Alimentación en el cultivo larvario de peces marinos. En: Comisión asesora de investigación científica y técnica (CAICYT) (Eds.). *Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía* (C.S.I.C), 251-293.
- Paulín, R.J.A., 2010. Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-*Artemia* mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal. Ph. D. Thesis. *Universidad de Santiago de Compostela, España*.
- Penglase, S., Harboe, T., Sæle, Ø., Helland, S., Nordgreen, A., Hamre, K., 2013. Iodine nutrition and toxicity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *PerrJ* 19.
- Penglase, S., Hamre, K., Olsvik, P.A., Grotan, E., Nordgreen, A., 2015. Rotifers enriched with iodine, copper and manganese had no effect on larval cod (*Gadus morhua*) growth, mineral status or redox system gene mRNA levels. *Aquaculture Research* 45, 1793-1800.

- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2009. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 7159-7170.
- Prieto, G.M., Atencio, G.V., 2008. Zooplankton en la larvicultura de peces neotropicales. *MVZ Córdoba*, 13(2), 1415-1425.
- Requeni, P.G., 2007. Fuentes alternativas de proteínas en acuicultura. Disfunciones endocrinas, metabólicas e inmuno-histopatológicas. Ph. D. Thesis. Universidad de Valencia.
- Ribeiro, A.R.A., Ribeiro, L., Saele, O., Hamre, K., Dinis, M.T., Moren, M., 2011. Iodine-enriched rotifers and *Artemia* prevent goitre in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Aquaculture Nutrition* 17, 248-257.
- Ribeiro, A.R.A., Ribeiro, L., Saele, O., Dinis, M.T., Moren, M., 2012. Iodine and selenium supplementation increased survival and changed thyroid hormone status in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 725-734.
- Ribeiro, R.A., Gonçalves, A., Barbeiro, M., Bandarra, N., Nunes, L.M., Carvalho, M.L., Silva, J., Navalho, J., Dinis, M.T., Silva, T., Dias, J., 2017. *Phaeodactylum tricornerutum* in finishing diets for gilthead seabream: effects on skin pigmentation, sensory properties and nutritional value. *J Appl Phycol* 29, 1945-1956.
- Sada, E., Katoh, S., Kheirulomoon, A., Yokoi, H., 1989. Effects of light intensity on the growth rate of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67, 135-137.
- Salgado, L.V., Hernández, C.V., 2014. Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. *Scientia et Technica* 19, 49-53.
- Scandolera, A., Hubert, J., Humeau, A., Lambert, C., De Bizemont, A., Winkel, C., Kaouas, A., Renault, J., Nuzillard, J., Reynaud, R., 2018. GABA and GABA-Alanine from the red microalgae *Rhodorus marinus* exhibit a significant Neuro-Soothing activity through inhibition of Neuro-Inflammation mediators and positive regulation of TRPV-1 Related skin sensitization. *Marine drugs* 16, 96.
- Shah, M.R., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M. 2016. Astaxanthin-Producing green microalga

- Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci* 7, 531.
- Shekarabi, S.P.H., Mehrgan, M.S., Razi, N., Sabzi, S., 2019. Biochemical composition and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana* dried with different methods. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9(3), 521-524.
- Shimamatsu, H., 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512, 39-44.
- Shimura, H., Itoh, K., Sugiyama, A., Ichijo, S., Ichijo, M., Furuya, F., Nakamura, Y., Kitahara, K., Kobayashi, K., Yukawa, Y., Kobayashi, T., 2012. Absorption of Radionuclides from the Fukushima Nuclear Accident by a Novel Algal Strain. *Plos One* 7(9).
- Solbakken, J.S., Berntssen, M.H.G., Norberg, B., Pittman, K., Hamre, K., 2002. Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from first exogenous feeding until post metamorphosis. *Journal of Fish Biology* 61, 1345-1362.
- Soldin, O.P., O'Mara, D.M., Aschner, M., 2008. Thyroid Hormones and Methylmercury Toxicity. *Biological Trace Element Research* 126, 1-12.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2), 87-96.
- Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Nordgreen, A., 2012. A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine from different sources. *Aquaculture* 334, 82-88.
- Stahl, W., Sies, H., 2012. Photoprotection by dietary carotenoids: Concept, mechanisms, evidence and future development. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 287-295.
- Sumar, S., Ismail, H., 1997. Iodine in food and health. *Nutrition & Food Science* 5, 175-183.
- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T., Burke, J.S., 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 28, 19-31.
- Thorenz, U.R., Carpenter, J.L., Huan, R., Kundel, M., Bosle, J., Hoffmann, T., 2014. Emission of iodine containing volatiles by selected microalgae species. *Atmos. Chem. Phys. Discuss* 14, 14575-14598.

- Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M.J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., Robaina, L., Zamorano, M.J., Karalazos, V., Kaushik, S., Izquierdo, M., 2017. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on the health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 468, 386-398.
- Truesdale, V.W., 1978. The automatic determination of iodate and total iodine in seawater. *Marine chemistry* 6, 253-273.
- Trujillo, E., Fonseca, G., García, M.A., 2009. Evaluación de la Cromatografía Iónica para Fomentar su Uso en la Investigación y Estudios de Posgrado en Ciencias del Agua. *Formación Universitaria* 2, 7-16.
- Tsunogai, S., Sase, T., 1969. Formation of iodide-iodine in the ocean. *Deep-Sea Research* 16, 489-496.
- Valente, L.M.P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E.F., Pinto, I.S., 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252, 85-91.
- Valente, L.M.P., Araújo, M., Batista, S., Peixoto, M.J., Sousa-pinto, I., Brotas, V., Cunha, L.M., Rema, P., 2015. Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva spp.* *Journal of Applied Phycology* 28, 1-11.
- Valente, L.M.P., Rema, P., Ferraro, V., Pintado, M., Sousa-pinto, I., Cunha, L.M., Oliveira, M.B., Araújo, M., 2015a. Iodine enrichment of rainbow trout flesh by dietary supplementation with the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*. *Aquaculture* 446, 132-139.
- Vanderpas, J., 2006. Nutritional epidemiology and thyroid hormone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 293-322.
- Velasco-Garzón, J.S., Gutiérrez-Espinosa, M.C., 2019. Aspectos nutricionales de peces ornamentales de agua dulce. *Revista politécnica* 15(30), 82-93.
- Vizcaíno, T.A.J., 2017. Evaluación de la harina de algas como ingrediente en piensos de peces marinos. Ph. D. Thesis. *Universidad de Almería*, España.
- Weng H., Liu, H., Li, D., Ye, M., Pan, L., Xia, T., 2014. An innovative approach for iodine

- supplementation using iodine-rich phytogetic food. *Environ Geochem Health* 36(4), 815-828.
- Wisniak, J., 2001. The History of Iodine - From Discovery to Commodity. *Indian Journal of Chemical Technology* 8, 518-526.
- Wong, G.T.F., Piumsomboon, A.U., Dunstan, W.M., 2002. The transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton cultures. *Marine Ecology Progress Series* 327, 27-39.