



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

PHYCOSEM MARINE AGRONOMY

Prácticas externas en empresa

Elisa Roca García



Elisa Roca García
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**MÁSTER INTERUNIVERSITARIO
GALLEGO EN ACUICULTURA**

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1. DATOS DE LA EMPRESA | 3 |
| 2. INSTALACIONES..... | 4 |
| 2.1. CALIDAD DEL AGUA | 4 |
| 2.1.1. Tratamiento de aguas en el IGaFA..... | 4 |
| 2.1.2. Tratamiento del agua en el CICA..... | 6 |
| 2.2. LABORATORIO | 8 |
| 3. RESUMEN DE ACTIVIDADES | 10 |
| 3.1. GESTIÓN DE CULTIVOS | 11 |
| 3.1.1. Determinación de la concentración de nitrato..... | 12 |
| 3.1.2. Determinación de la concentración de fosfato | 13 |
| 3.1.3. Determinación de la concentración de hierro..... | 14 |
| 3.2. CULTIVO DE <i>Saccharina latissima</i> | 15 |
| 3.2.1. Recolección: | 17 |
| 3.2.2. Extracción de esporas:..... | 17 |
| 3.2.3. Germinación de las esporas:..... | 18 |
| 3.2.4. Producción de gametófitos: | 18 |
| 3.2.5. Cultivo de plántulas en colectores..... | 19 |
| 3.3. MANTENIMIENTO DEL GERMOPLASMA DE <i>Saccharina latissima</i> | 20 |
| 3.4. CULTIVO DE <i>Gracilaria bursa-pastoris</i> | 20 |
| 3.5. CULTIVO DE <i>Ulva ohnoi</i> | 22 |
| 3.6. CULTIVO DE <i>Crassiphycus corneus</i> | 24 |
| 3.7. TAREAS BÁSICAS DE LABORATORIO | 25 |
| 4. SALIDA AL CAMPO | 25 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 26 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 27 |

1. INTRODUCCIÓN

El presente informe se centra en describir el conjunto de tareas, actividades y procesos que he desarrollado en la empresa Phycosem Marine Agronomy, S.L., durante mis cuatro meses de trabajo.

El objetivo de la realización de prácticas en esta empresa es adquirir las competencias profesionales necesarias para trabajar en un laboratorio, conocer el funcionamiento de una instalación dedicada al cultivo de macroalgas marinas, desarrollar habilidades prácticas en la acuicultura marina y aplicar los conocimientos adquiridos en el máster en Acuicultura.

1.1. DATOS DE LA EMPRESA

Phycosem Marine Agronomy, S.L., es una empresa creada en julio de 2018, como una empresa *spin-off* adscrita a la Universidade da Coruña. Sus actividades principales son la creación, mantenimiento, producción y comercialización de germoplasma, implantes, plántulas e inóculos de macroalgas; así como, la investigación en el ámbito de la acuicultura marina.

Cultivan principalmente *Saccharina latissima* y *Gracilaria bursa-pastoris* para su posterior venta y mantienen stocks de *Ulva ohnoi*, *Crassiphycus corneus* y *Porphyra dioica*.

La empresa tiene su sede oficial en el Concello de Oleiros, pero actualmente realiza su principal actividad en el edificio CICA (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas) en el Campus de Elviña de la UDC (Universidade da Coruña). El laboratorio en el que se trabaja pertenece al grupo de investigación BioCost, que desarrolla varias de sus líneas de investigación en acuicultura marina: Evaluación de recursos ficológicos de interés industrial en costas gallegas, Desarrollo de técnicas de cultivo industrial de macroalgas marinas, Flora y vegetación bentónica marina de las costas de la Península Ibérica e Islas Baleares y Biomonitorización de la calidad del medio con macroalgas marinas (BioCost, 2005).

Por otra parte, el grupo BioCost participa en un proyecto del GALP (Grupo de Acción Local do sector Pesqueiro), en colaboración con las cofradías de Rianxo y Vilanova de Arousa. El objetivo de este proyecto es entender el impacto de proliferación

de algas, “mareas verdes”, en la actividad económica de las cofradías, buscar una forma de mitigar los problemas que puedan causar y, a ser posible, encontrar una forma de explotar las grandes cantidades de biomasa que generan.

En el año 2018, la Agencia Gallega de Innovación (Gain) de la Consellería de Economía, Empleo e Industria y el Clúster Tecnológico Empresarial de las Ciencias de la Vida (Bioga) otorgaron el Premio Bioga a la mejor idea empresarial a Phycosem Marine Agronomy. En esta categoría se premian proyectos innovadores o empresas de reciente creación que apuesten por revolucionarios productos o servicios. Phycosem Marine Agronomy fue seleccionada por su alto potencial de comercialización, sus escasos competidores, la valorización de los recursos naturales gallegos y su oferta de tecnología lista para ser comercializada (IPAC, 2018).

Este año, la empresa planea trasladar la mayoría de sus actividades a una nueva ubicación en el Puerto de Sada; en unas instalaciones no dependientes de la UDC.

2. INSTALACIONES

2.1. CALIDAD DEL AGUA

La calidad del agua es uno de los parámetros más importantes del cultivo de macroalgas, ya que, las algas viven del intercambio de nutrientes presentes en el agua. La procedencia, el almacenamiento y los tratamientos a los que se somete el agua pueden influir en su calidad. A continuación, se detalla el tratamiento que sufre el agua desde las instalaciones del Instituto Galego de Formación en Acuicultura (IGaFA) en la Illa de Arousa hasta los tanques de cultivo del CICA.

2.1.1. Tratamiento del agua en el IGaFA

Antes de que el agua llegue al cultivo, sufre una serie de tratamientos físicos, para eliminar partículas en suspensión, materia orgánica, patógenos potenciales, etc. que puedan interferir negativamente con la supervivencia de los organismos a cultivar.

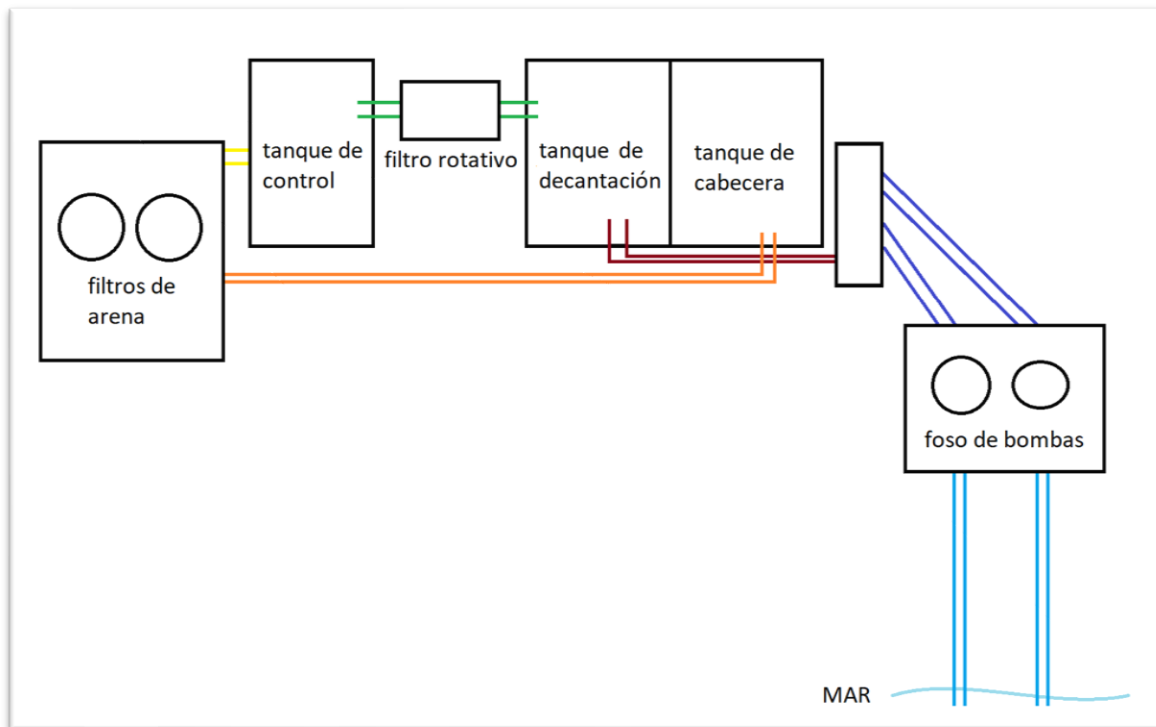


Ilustración 1; Esquema de la captación de agua en el IGAFa

La captación de agua se lleva a cabo mediante dos emisarios sumergidos que se acoplan a bombas de succión en tierra (ilustración 1).

El agua captada por las bombas se dirige al tanque de decantación, los sólidos en suspensión sufren un proceso de decantación debido al gran volumen del tanque y al flujo lento de agua.

El agua procedente del tanque de decantación atraviesa el filtro rotativo de forma pasiva, por una diferencia de presión. El filtro presenta una malla de $100\ \mu\text{m}$. El tambor está girando, entrando el agua por el interior del tubo y saliendo por las paredes de este a través de la malla filtradora.

El agua filtrada a $100\ \mu\text{m}$ pasa al tercer depósito, el tanque de control. Este depósito almacena el agua y permite una segunda decantación.

El agua procedente del tanque de control pasa por dos filtros de arena con dos gramajes diferentes (ilustración 1). Las partículas en suspensión que pudieran quedar en el agua se adhieren a la arena.

El agua procedente de los filtros de arena se acumula en el tanque de cabecera. El agua que se almacena en este tanque está limpia, tras su filtración, y lista para utilizarse en los cultivos.

2.1.2. Tratamiento del agua en el CICA

Dos veces al año, un camión cisterna carga agua desde el tanque de cabecera del IGaFA y la trasporta hasta las instalaciones del CICA. El agua de mar se almacena en el CICA en un depósito de 10.000 l situado en el sótano del edificio.

Filtración

Una bomba impulsa el agua desde el depósito, a través de dos filtros de cartucho, hasta un tanque de cabecera de 3.000 l. El tanque de cabecera cuenta con una sonda de nivel mínimo; cuando el nivel de agua baja, se activa la bomba de impulsión que bombea agua desde el depósito hasta el tanque de cabecera.

El agua de mar que llega al laboratorio es bombeada desde el tanque de cabecera. Antes de ser utilizada para el cultivo, se filtra a través de dos filtros de cartucho de 20 y 5 μm , respectivamente.

Esterilización

El cultivo de las fases microscópicas de las algas se realiza en botellones; estas fases son las más delicadas del ciclo y se debe hacer un control exhaustivo de la calidad de agua. Para minimizar la aparición de organismos ajenos al cultivo, se esteriliza el agua que se empleará en los botellones.

Con el agua de mar filtrada se llena un botellón. A continuación, se hierve el agua en un hornillo y el agua caliente se deja enfriar 24 horas en la poyata del laboratorio. Posteriormente, se vuelve a hervir y a dejar enfriar otras 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se mete el botellón en la cámara para que alcance la misma temperatura que el resto de los cultivos. Se deja reposar en la cámara 24 horas más antes de emplearla en los cultivos en botellón.

El proceso completo requiere tres días, desde que se llena el botellón hasta que se puede utilizar el agua; por lo que, se requiere una planificación previa de cuando se necesitará el agua para empezar a prepararla.

Calentamiento

Para calentar el agua, se emplean termocalentadores eléctricos o resistencias que se colocan en el interior de los tanques. Se programa la temperatura deseada y se conectan a la red eléctrica.

Enfriamiento

El proceso de enfriamiento se produce mediante la introducción de un intercambiador de titanio en el interior de los tanques. A través de este intercambiador circula agua fría (5° C). Se programa la temperatura de agua deseada en el sistema de enfriamiento y un sistema de sondas de temperatura y electroválvulas regulan el flujo del agua a través del intercambiador. El circuito de frío es común y centralizado para todo el CICA.

Agua dulce

El agua dulce de la traída se emplea en los cultivos para corregir la concentración de salinidad o para reponer el agua perdida por evaporación. Esta agua ya viene filtrada y clorada desde las depuradoras, por lo que, no es necesario tratarla.

Cuando se emplea en el llenado de botellones, para corregir la salinidad, sufre el mismo proceso de esterilización que el agua salada.

2.2. LABORATORIO

El laboratorio que el grupo BioCost tienen en el CICA cuenta con una zona donde se ubican los tanques (ilustración 2, n. 1), una zona donde se desarrollan los cultivos de pequeños volúmenes en cámaras (ilustración 2, n. 2) y la zona de las poyatas (ilustración 2, n. 3). La zona húmeda está delimitada con un reborde metálico en el suelo para evitar que el agua empleada en el cultivo llegue al resto del laboratorio.

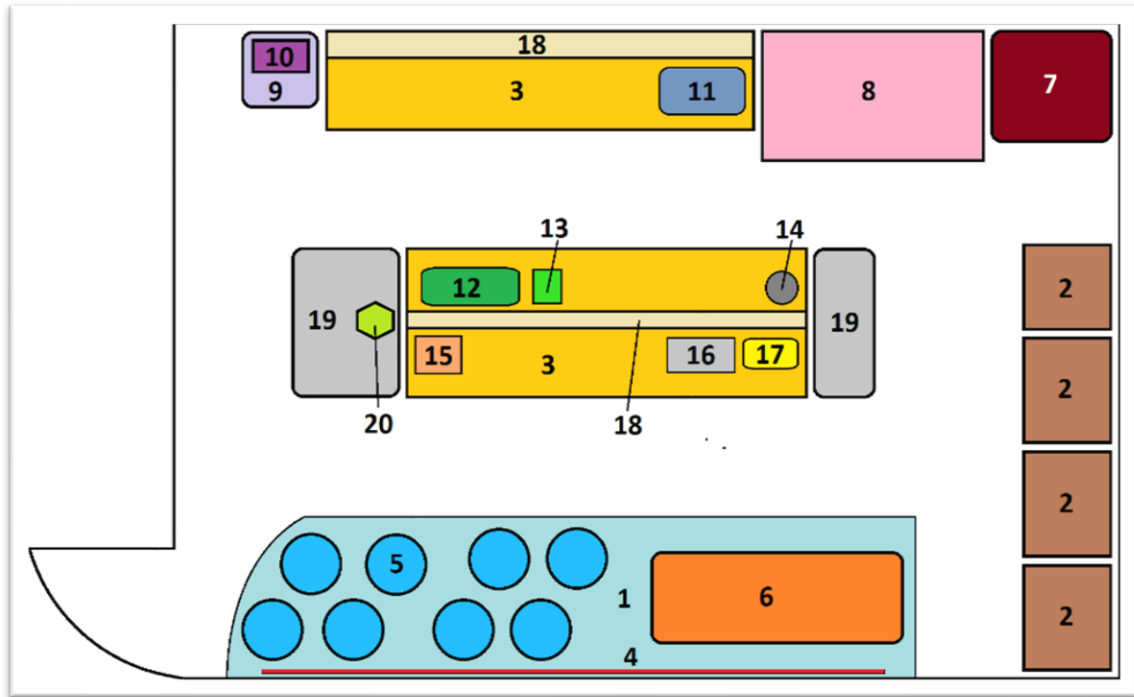


Ilustración 2; Esquema del laboratorio del grupo BioCost en el CICA

El laboratorio cuenta con un sistema de canalización para el agua de mar filtrada, el agua dulce, el aire y el circuito de frío (ilustración 2, n. 4). Estas canalizaciones tienen grifería cerca de los tanques, para poder disponer de estos recursos si son necesarios en el cultivo. El aire es bombeado a los cultivos mediante una bomba soplante, colocada encima del techo del laboratorio. Además, la empresa tiene dos filtros móviles que se pueden ubicar en los distintos tanques, en función de las necesidades de producción.

En la zona de tanques hay ocho tanques tronco-cónicos de 160 l (ilustración 2, n. 5) que presentan una llave en la zona inferior. A través de la abertura inferior, se vacía el agua de los tanques y se suministra aire para la agitación de los cultivos. Encima de cada tanque se sitúa un foco de luz de altura regulable para modificar la cantidad de luz que incide sobre los cultivos.

En la zona húmeda se sitúa un acuario de planta rectangular, con un volumen de 1.000 l (ilustración 2, n. 6) y presenta una llave en la zona lateral inferior. A través de esta abertura, se vacía el agua del tanque y se suministra aire para la agitación de los cultivos. Encima del acuario se sitúan un máximo de cuatro focos de luz de altura regulable, para modificar la cantidad de luz que incide sobre los cultivos. En los laterales del acuario se colocan un máximo de veinte lámparas para aumentar la intensidad de luz que llega a las algas.



Ilustración 3; Zona de tanques del laboratorio del grupo BioCost (Foto: E. Roca)

Las cuatro cámaras de cultivo para cultivar pequeños volúmenes, hasta un máximo de 6 l, permiten controlar el fotoperiodo, la intensidad de luz, la agitación y la temperatura de los cultivos (ilustración 4).

Además de las cámaras, el laboratorio cuenta con otro equipamiento técnico como:

- Un frigorífico (ilustración 2, n. 7).
- Una cámara de flujo laminar (ilustración 2, n. 8).
- Una estufa de tiro forzado (ilustración 2, n. 9).
- Un microondas (ilustración 2, n. 10).
- Material de microscopía (ilustración 2, n. 11); un microscopio, una lupa, y un monitor.
- Un espectrofotómetro uv-visible conectado a un ordenador (ilustración 2, n. 12).

- Una báscula de precisión (ilustración 2, n. 13).
- Un baño de ultrasonidos (ilustración 2, n. 14).
- Una centrífuga (ilustración 2, n. 15).
- Un hornillo (ilustración 2, n. 16).
- Una báscula (ilustración 2, n. 17).
- Estanterías y espacio de almacenaje (ilustración 2, n. 18).
- Dos fregaderos (ilustración 2, n. 19).
- Una campana para la extracción de gases (ilustración 2, n. 20).

El grupo BioCost cuenta con un espacio en el sótano del CICA, donde se ubican las instalaciones de almacenamiento y suministro de agua marina y una zona en la que se guardan herramientas, ropa de aguas, tanques vacíos, piezas de fontanería, etc.



Ilustración 4; Cámaras de simulación ambiental para el cultivo en pequeños volúmenes (Foto: E. Roca)

3. RESUMEN DE ACTIVIDADES

Durante mi estancia en Phycosem Marine Agronomy, S.L., la organización de las prácticas se fundamentó en la participación en el mayor número posible de tareas que se realizan sobre los cultivos. Este modelo de aprendizaje permite desarrollar mejores competencias analíticas y experimentales en todos los campos de trabajo relacionados con el cultivo de macroalgas marinas.

Dentro de las actividades realizadas, destacan: la gestión de cultivos, el cultivo y mantenimiento del banco de germoplasma de *Saccharina latissima*, el cultivo de *Gracilaria bursa-pastoris*, el mantenimiento de los stocks de cultivo de *Ulva ohnoi*, el mantenimiento de los stocks de cultivo de *Crassiphycus corneus* y otras tareas básicas de laboratorio.

3.1. GESTIÓN DE CULTIVOS

Para el correcto desarrollo de los cultivos de macroalgas se llevan a cabo varias acciones que conforman la gestión de los cultivos:

1. Determinación de la temperatura, mediante termómetro, y salinidad, mediante densímetro. Anotación de los datos en la bitácora. Corrección de la salinidad añadiendo sal marina (Instant Ocean[®], para salinidades inferiores al 34 ‰) o agua dulce (para salinidades superiores al 36 ‰).
2. Análisis de las concentraciones de nutrientes presentes en el medio de cultivo. Comprobación de que los niveles de los distintos nutrientes están dentro de los márgenes establecidos para el crecimiento de las distintas especies y, en el caso de que no sea así, proceder a añadirlos en las cantidades necesarias. Anotación en la bitácora de los contenidos de:
 - a. Nitratos (N). Métodos analíticos espectrofotómetro UV-VIS.
 - b. Fosfatos (P). Métodos analíticos espectrofotómetro UV-VIS.
 - c. Hierro (Fe). Métodos analíticos espectrofotómetro UV-VI.
3. Aporte de los nutrientes necesarios para mantener unas condiciones de cultivo idóneas.
4. Renovación total del medio de cultivo. Se desecha el medio viejo, se llena el tanque con agua de mar bruta y se enriquece con nutrientes (N, P y oligoelementos) en función de la especie.
5. Mantenimiento de los cultivos sin turbidez mediante filtración (filtro Eheim) y UV (control blooms bacterianos). Limpieza de las paredes del tanque con un estropajo de aluminio, para la eliminación del *fouling*.
6. Desmontaje y limpieza del filtro de partículas (Eheim) y del ultravioleta.

7. Determinación el peso húmedo del alga, previa centrifugación (eliminación de la mayor cantidad de agua), para calcular las tasas de crecimiento y productividad. Anotación de los datos en la bitácora

La bitácora es una agenda que contiene el registro de todas las actividades que se realizan en los cultivos. Posteriormente, los datos se digitalizan para facilitar la trazabilidad del cultivo y futuras investigaciones.

En función de la especie a cultivar, la periodicidad con la que se realiza cada tarea de la gestión de cultivos puede variar (ver apartados 3.2. a 3.6.).

3.1.1. Determinación de la concentración de nitrato

La metodología utilizada se basa en la medida de la absorción al UV del ion nitrato a 220 nm. Esta técnica es adecuada como método de *screening* en muestras de aguas naturales no contaminadas. La concentración de nitrato se determina mediante una curva de calibración; la absorción de materia orgánica disuelta se corrige con la medida a 275 nm (APHA, 1992).

Material utilizado

- Espectrofotómetro con lámpara UV y ordenador (ilustración 5).
- Cubeta de cristal de cuarzo de 1 ml.
- Matraces aforados.
- Pipetas automáticas.
- Tubos de ensayo.



Ilustración 5; Espectrofotómetro uv-visible y ordenador (Foto: E. Roca)

Reactivos empleados

- -Ácido clorhídrico 1M.
- -Agua destilada.

Para proceder al análisis, se fijan las longitudes de onda de lectura en el espectrofotómetro (220 y 275 nm) y se selecciona la curva patrón. Se realiza una medición por triplicado de cada muestra de agua. La preparación del blanco y de las muestras es:

Blanco → 1 ml HCl 1 M + 50 ml agua destilada.

Muestras → 0,5 ml muestra + 4,5 ml agua destilada + 100 µl HCl 1 M.

Para determinar los gramos de NO₃ que se necesita aportar al cultivo, se emplea la fórmula: g NO₃ = ppm a aportar x vol (l) del tanque x 0,006 (factor para NaNO₃).

3.1.2. Determinación de la concentración de fosfato

La metodología empleada determina los iones fosfato disueltos en agua de mar. Es un método colorimétrico que se basa en la reacción de reducción del heteropoliácido de fosfato y molibdeno en azul de molibdeno (de color azul) (Grasshoff et al., 1999).

Material utilizado

- Espectrofotómetro con lámpara de luz visible y ordenador (ilustración 5).
- Cubeta de cristal de cuarzo de 1 ml.
- Matraces aforados.
- Pipetas automáticas.
- Tubos de ensayo.

Reactivos empleados

- Solución reductora: disolver 5g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) en 25 ml de agua destilada y añadir 25 ml de ácido sulfúrico 4,5 M.
- Solución de cromógeno:

- Solución 1; disolver 12,5 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado en 125 ml de agua destilada.
- Solución 2; Disolver 0,5 g de tartrato de antimonio y potasio en 20 ml de agua destilada.

Añadir la solución 1 y después la solución 2 a 350 ml de ácido sulfúrico 4,5 M, la solución de cromógeno debe agitarse durante el proceso de mezclado.

Para proceder al análisis, se fija la longitud de onda de lectura en el espectrofotómetro (800 nm) y se selecciona la curva patrón. Se realiza una medición por triplicado de cada muestra de agua. La preparación del blanco y de las muestras es:

Blanco → 50 ml agua destilada + 1 ml solución reductora + 1ml solución de cromógeno (es importante añadir los reactivos en orden).

Muestras → 5ml muestra + 100 µl solución reductora + 100 µl solución cromógeno.

Para determinar los gramos de PO_4 que se necesita aportar al cultivo, se emplea la fórmula: $g PO_4 = ppm \text{ a aportar} \times vol (l) \text{ del tanque} \times 0,005$ (factor para $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$).

3.1.3. Determinación de la concentración de hierro

La metodología usada determina la cantidad de hierro (Fe) disuelto en el agua. Es un método colorímetro basado en que, en una solución de pH 3,5 - 5,8; el hierro (II) forma un complejo violeta con 2,4,6 - tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Grasshoff et al., 1999).

Material utilizado

- Espectrofotómetro con lámpara de luz visible y ordenador (ilustración 5).
- Cubeta de cristal de cuarzo de 5ml.
- Matraces aforados.
- Pipetas automáticas.
- Tubos de ensayo.

Reactivos empleados

- Solución de ácido ascórbico: disolver 7 gr de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) en 100 ml de agua destilada. Se guarda en la nevera y puede usarse mientras permanezca incolora.
- Solución de acetato de amonio: disolver 5 gr de acetato de amonio (CH_3COONH_4) en 100 ml de agua destilada.
- Solución TPTZ: añadir 0,08 gr de TPTZ [2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina] a 0,5 ml de HCL y diluir en 100 ml de agua destilada.

Para proceder al análisis, se fija la longitud de onda de lectura en el espectrofotómetro (595 nm) y se selecciona la curva patrón. Se realiza una medición por triplicado de cada muestra de agua. La analítica debe realizarse tan pronto como sea posible; el color del complejo azul-violeta es estable durante unas horas, pero es recomendable medir en la primera hora. La preparación del blanco y de las muestras es:

Blanco → 50 ml agua destilada + 1 ml ácido ascórbico y esperar 30 segundos + 1 ml acetato de amonio + 1 ml TPTZ y esperar 10 minutos.

Muestras → 5 ml muestra + 100 μ l ácido ascórbico y esperar 30 segundos + 100 μ l acetato de amonio + 100 μ l TPTZ y esperar 10 minutos.

3.2. CULTIVO DE *Saccharina latissima*

La producción de semilla (plántulas) de *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders (“kombu de azúcar”) es uno de los principales objetivos de la empresa Phycosem Marine Agronomy, S.L. Esta especie presenta un gran interés económico y comercial, debido a su similitud con *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders; especie muy cultivada en países del sudeste asiático y una de las de mayor producción a nivel mundial.

El ciclo de vida de *Saccharina latissima* (ilustración 6), propio de todas las laminariales, es digenético haplo-diplofásico, con alternancia marcadamente heteromórfica de generaciones. La generación productiva es el esporófito, mientras que la gametofítica es únicamente una fase generativa.

Las grandes láminas del esporófito producen soros de esporocistes en su superficie. Los esporocistes liberan meiosporas (n) que, tras una breve vida planctónica, se fijan a un sustrato, pierden los flagelos y germinan dando lugar a gametófitos haploides pluricelulares microscópicos. Los gametófitos masculinos son más ramificados y de células más pequeñas; los femeninos son más sencillos y de células más voluminosas. Estos gametófitos se desarrollan vegetativamente en invierno y, cuando notan el aumento de la luz y temperatura de la primavera, entran en gametogénesis produciendo espermatozoides flagelados y ovocélulas inmóviles, respectivamente. Tras la oogamia darán lugar a cigotos ($2n$) que, por mitosis, originarán nuevos esporófitos (plántulas) que se desarrollan sobre el gametófito femenino (Ribamar Da Cruz Freitas, 2015).

Las poblaciones naturales de esta especie se extienden desde el norte de Europa (Noruega) hasta Portugal y en las costas noreste y noroeste de América. En España, se encuentra en la costa asturiana y gallega; las poblaciones gallegas son las más abundantes (Izquierdo *et al.*, 1993).

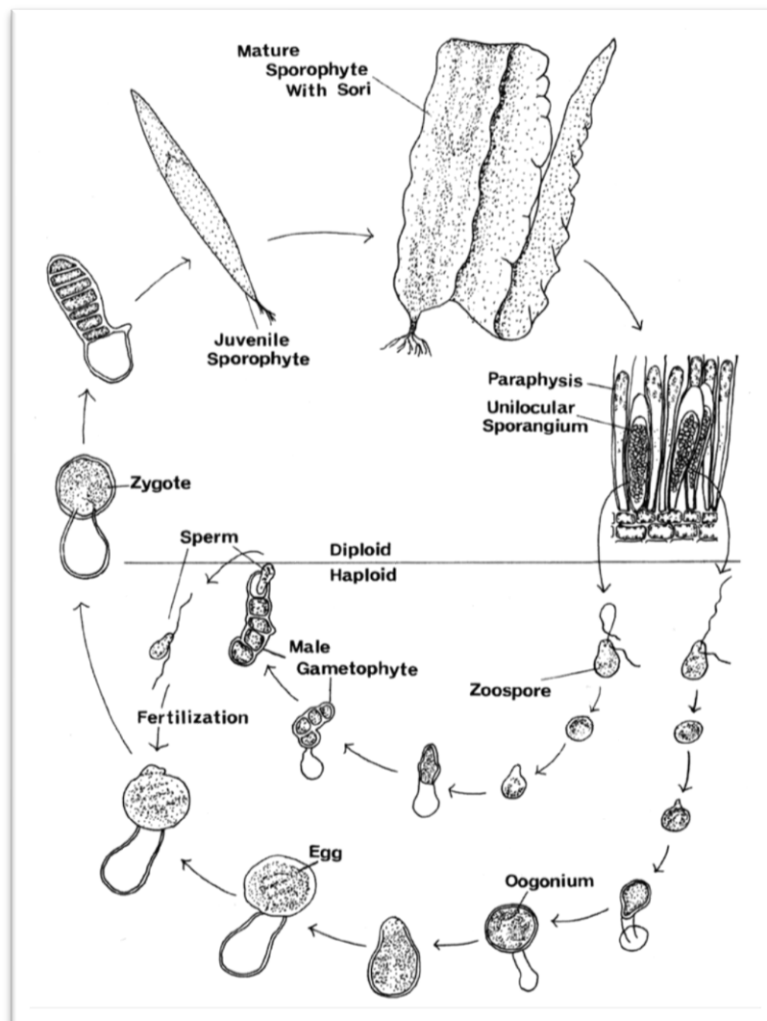


Ilustración 6; Ciclo de vida de *Saccharina japonica* (Tomado de Cheng, 1969)

3.2.1. Recolección:

El cultivo comienza con la recolección de ejemplares maduros del medio natural; los esporófitos diploides deben presentar soros (donde se produce la meiosis) en la superficie de la lámina. El periodo de recogida se centra en los meses de octubre, noviembre y diciembre; coincidiendo con el momento del ciclo en que se produce la liberación de esporas, en el medio natural (ilustración 6).

La cosecha se realizó en el Poto de Dexo (Oleiros; A Coruña), durante la bajamar. Los esporófitos se cosechan en zonas sumergidas y cuando aún están unidos al sustrato, lo que garantiza la recolección de individuos sanos y en buen estado.

3.2.2. Extracción de esporas:

En el laboratorio, los ejemplares se manipulan para aislar las partes de la lámina donde hay soros. Los fragmentos de alga se someten a un tratamiento con hipoclorito para eliminar materia orgánica, microorganismos u otros competidores que puedan contaminar los cultivos. A continuación, se introducen los soros en cámaras frigoríficas durante 24 horas y en oscuridad, para facilitar la posterior liberación de las esporas. Posteriormente, los trozos de la lámina se meten en frascos de cristal con agua de mar fría y estéril y se agitan regularmente durante unos minutos, los botes se sumergen en un baño de agua helada; todo ello para maximizar la liberación de las esporas.



Ilustración 7; Cultivos en cámara. Incubación de esporas en placas (izquierda). Gametófitos en suspensión "free-living" (derecha) (Fotos: E. Roca)

Se recoge el agua con esporas en suspensión y se filtra a través de un tamiz de 50 μm de luz de maya, para retirar sólidos de gran tamaño. Las esporas se trasvasan a placas de cultivo celular (100 ml de agua con esporas por cada placa) y se llevan a la cámara para su incubación (ilustración 7, izquierda).

El grado de turbidez del agua indica la cantidad de esporas obtenidas en la extracción. Se añade germanio al agua para evitar la proliferación de diatomeas durante la incubación de las esporas. Se realiza una visualización del extracto de esporas en el microscopio para ver su densidad, viabilidad y movilidad.

3.2.3. Germinación de las esporas:

La incubación dura 4 semanas y se realiza en la cámara, a una temperatura inicial de 14 °C y 30 μmol de luz. Se busca que las esporas móviles flageladas se fijen al fondo de las placas de cultivo celular y desarrollen polaridad, necesaria para su posterior germinación y desarrollo en forma de gametofitos. En este primer momento, no se añaden nutrientes al cultivo, ya que, el proceso de fijación y germinación requiere pocos nutrientes y se busca evitar la proliferación de organismos oportunistas.

En los primeros días, las esporas tienen mucha luz; pero cada semana se reduce la temperatura 1°C y la luz. Se imita el fotoperiodo natural del invierno, momento del año en el que tiene lugar la fijación de esporas en el medio natural (ilustración 6).

Tras 15 días de incubación, se retira el medio de cultivo (las esporas ya están fijadas en las placas y han comenzado la germinación) y se añaden 100 ml de medio nuevo con nutrientes.

3.2.4. Producción de gametófitos:

Una vez finalizada la incubación, se desprenden los gametófitos jóvenes de las placas de cultivo mediante ultrasonidos y se transfieren a botellones. Una vez que se obtienen gametófitos en suspensión (ilustración 7, derecha), éstos crecen y se fragmentan de manera natural incrementando paulatinamente su densidad. A base de ir desdoblado los botellones se puede llegar a obtener la cantidad de germoplasma que sea precisa para la producción de la “semilla” (jóvenes esporófitos sobre el hilo de siembra).

3.2.5. Cultivo de plántulas en colectores

Los colectores encordados y secos se sumergen en el cultivo de gametófitos en suspensión; mediante adsorción, el hilo del colector queda embebido de gametófitos. Acto seguido, se cuelgan los colectores de un soporte encima del tanque de cultivo y quedan sumergidos en el tanque de cultivo durante unas cinco semanas. Durante ese tiempo, los gametófitos masculinos y femeninos entran en gametogénesis, se produce la fecundación y los cigotos producidos germinan dando lugar a nuevos esporófitos que se fijarán al hilo de semilla. Estas jóvenes plántulas crecen hasta alcanzar un tamaño medio de unos 5 mm (ilustración 8, derecha); momento en el cual, se retiran los colectores del tanque, se corta el hilo en fragmentos de 4 cm y se empaquetan los fragmentos para su siembra en el mar donde se producirá el crecimiento de los esporófitos durante varios meses, desde el invierno hasta mediados de primavera.



*Ilustración 8; Tanques de cultivo de plántulas en colectores (izquierda). Colector con plántulas fijadas (derecha)
(Fotos: E. Roca)*

Las condiciones de cultivo para el desarrollo de plántulas en los colectores son: una salinidad de entre 30 -35 g/l; una aireación suave; una temperatura de unos 13-15°C y una circulación constante de agua. Se conectan cuatro tanques y se recircula el agua entre ellos mediante la acción de una bomba impulsora (ilustración 8, izquierda). El cultivo se realiza en circuito cerrado, donde solo se renueva el agua que se pierde por evaporación. El fotoperiodo es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La cantidad de luz incidente aumenta a lo largo del cultivo. Se colocan focos con bombillas de luz negra sobre los tanques para favorecer la gametogénesis y lámparas en el interior del tanque para garantizar una incidencia de luz constante y uniforme en todas las plántulas. Para

mantener la temperatura del agua, una sonda registra la temperatura del agua de los tanques y activa o cierra el circuito de frío para mantener constante la temperatura deseada.

Para la siembra de colectores se emplea una parte del volumen total de gametófitos en suspensión, el resto del cultivo se mantiene en la cámara a baja temperatura (8°C) para contar con un stock de gametófitos en suspensión denominado “banco de germoplasma”. Modificando las condiciones de luz y temperatura puede iniciarse la gametogénesis y obtener un cultivo de plántulas en suspensión.

3.3. MANTENIMIENTO DEL GERMOPLASMA DE *Saccharina latissima*

Durante las prácticas, se realizó, en varias ocasiones, el mantenimiento del cultivo en *free-living* de los gametófitos de *Saccharina latissima* (ilustración 7, derecha). Para el mantenimiento del banco de germoplasma de la empresa, se lleva a cabo un control diario de las condiciones de cultivo. Periódicamente, se realiza la gestión de éste, que incluye cambios de medio o desdobles, analíticas de control de la calidad del agua (niveles de N, P y Fe), medida de temperatura y salinidad, toma de muestras del cultivo y observación al microscopio. Todas las acciones de manipulación de los cultivos se producen en la cámara de flujo laminar para reducir el riesgo de contaminación.

3.4. CULTIVO DE *Gracilaria bursa-pastoris*

El cultivo de *Gracilaria bursa-pastoris* (S.G. Gmelin) P.C. Silva comienza con la recolección de ejemplares adultos de medio natural y su traslado a las instalaciones de la empresa. Una vez en el laboratorio, se produce una identificación exhaustiva de los ejemplares recogidos y se escogen los de mayor calidad. Las algas seleccionadas se someten a un tratamiento con hipoclorito para eliminar restos de materia orgánica, microorganismos y algas epífitas que puedan portar.

Esta especie se estabula en el acuario de planta rectangular, con un volumen de 1.000 l. Su cultivo se basa en favorecer el crecimiento vegetativo de los ejemplares para maximizar la obtención de biomasa. El cultivo se realiza en circuito cerrado, donde solo se renueva el agua que se pierde por evaporación. Las condiciones de cultivo en el laboratorio son: una salinidad de entre 30-35 g/l, una temperatura de unos 15 °C, una

intensidad de luz superior a $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (en la superficie del agua), una aireación fuerte y una filtración constante de agua para eliminar sólidos en suspensión. La aireación favorece la agitación del cultivo, permitiendo que todos los ejemplares tengan acceso a la luz. El fotoperiodo es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para mantener la temperatura del agua, una sonda introducida en ella la registra y activa o desactiva la circulación del agua fría por el intercambiador de titanio.

Cada día; se revisa la temperatura y el volumen de agua en el tanque, el estado de las luces, la aparición de especies epífitas en el cultivo y el correcto funcionamiento del filtro. La gestión de cultivos se realiza una vez a la semana, para controlar la concentración de nitratos, fosfatos y hierro. En función de los niveles detectados, se añaden nutrientes al tanque para que las algas puedan continuar creciendo. La concentración deseada de nitratos se sitúa en 10 ppm y la de fosfato en 0,5 ppm. También se añade una disolución de oligoelementos a razón de 50 ml por cada 100 l de agua. El tanque se vacía y desinfecta una vez al mes y se llena con agua nueva.

Cuando se alcanza la biomasa algal requerida, se procede a su cosecha. Los ejemplares se empaquetan, con papel de filtro húmedo para evitar la desecación, y preparan para su posterior traslado al mar. Dichos individuos se utilizarán de inóculo para cultivos en volúmenes mayores.



Ilustración 9; Cultivo de *Gracilaria bursa-pastoris* (Foto: E. Roca)

Durante el desarrollo del cultivo de *Gracilaria*, para conseguir la biomasa deseada, el alga sufrió una contaminación con un alga roja epífita filamentosa y con cianofíceas. Las cianofíceas colonizan la superficie de los talos de *Gracilaria bursa-pastoris*, dándoles

un tono pardo negruzco. El alga filamentosa aparece en suspensión y en los talos de *Gracilaria*, otorgándoles un aspecto plumoso.

Fruto de esta contaminación, se ralentizó el crecimiento de los ejemplares de *Gracilaria*, se incrementó el consumo de nutrientes en el tanque y aumentó la turbidez del agua. Para tratar de erradicar las especies epífitas, se llevaron a cabo diferentes estrategias:

- Tratamientos con hipoclorito; los baños consisten en sumergir el alga en agua con hipoclorito y posteriormente en agua dulce. El hipoclorito daña las puntas de crecimiento de *Gracilaria*, pero el resto de la superficie no se ve afectada y puede desarrollar nuevas zonas de crecimiento. El alga roja filamentosa sufre daños mayores, llegando a presentar un aspecto blanquecino. Los tratamientos se aplican una vez a la semana para reducir la cantidad de epífitas.
- Fragmentar los talos; se busca reducir el tamaño de los ejemplares para favorecer la penetración del tratamiento con hipoclorito en la superficie de los ejemplares.
- Aumentar la cantidad de luz que incide en el cultivo; el choque de luz aumenta el crecimiento de la *Gracilaria bursa-pastoris* e inhibe el crecimiento de las epífitas.
- Reducir el aporte de nutrientes al tanque; para frenar el crecimiento de las epífitas. *Gracilaria bursa-pastoris* al ser una especie de morfología compleja, puede acumular sustancias de reserva.
- Aumentar la frecuencia de limpieza del filtro; las algas epífitas en suspensión quedan retenidas en el filtro y se retiran del cultivo.
- Aumentar la frecuencia de renovación del agua del tanque; se eliminan las algas epífitas en suspensión.

3.5. CULTIVO DE *Ulva ohnoi*

El cultivo de *Ulva ohnoi* M. Hiraoka & S. Shimada (“lechuga de mar”) consiste en el mantenimiento de una cantidad de biomasa concreta. El objetivo es mantener los ejemplares en un estado óptimo de crecimiento para su uso en investigación.

Esta especie se estabula en un tanque tronco-cónico, con un volumen de 160 l. Su cultivo se basa en favorecer el crecimiento vegetativo de los ejemplares y se realiza en

circuito cerrado; donde solo se renueva el agua que se pierde por evaporación. Las condiciones de cultivo en el laboratorio son: una salinidad de 30 g/l; una temperatura de unos 20-22 °C; una intensidad de luz de unos 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (en la superficie del agua); una aireación suave, para favorecer la agitación del cultivo; una filtración constante de agua, para eliminar sólidos en suspensión y el tratamiento del agua con luz ultravioleta, para eliminar bacterias del cultivo. El fotoperiodo es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para mantener la temperatura del agua, se emplean termocalentadores eléctricos dentro del tanque.

Cada día; se revisa la temperatura y el volumen de agua en el tanque, el estado de las luces, la aparición de bacterias en el cultivo y el correcto funcionamiento del filtro. La gestión de cultivos se realiza una vez a la semana. Dicha gestión implica medir la concentración de nitratos, fosfatos y hierro en el tanque; vaciar y desinfectar el tanque y llenarlo con agua nueva; pesar a biomasa del alga y retirar el exceso dejando 200 g como densidad inicial de cultivo.



*Ilustración 10; Cultivo de Ulva ohnoi
(Foto: E. Roca)*

En función de los niveles de nitratos, fosfatos y hierro detectados, si no se renueva en su totalidad del medio de cultivo, se añaden nutrientes al tanque para que las algas puedan continuar creciendo. La concentración deseada de nitratos se sitúa en 20 ppm y la de fosfato en 1 ppm. También se añade una disolución de oligoelementos a razón de 50 ml por cada 100 l de agua.

3.6. CULTIVO DE *Crassiphycus corneus*

El cultivo de *Crassiphycus corneus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris & Fredericq consiste en el mantenimiento de ejemplares de la especie en un estado óptimo para su uso en investigación.

Esta especie se estabula en un tanque tronco-cónico, con un volumen de 160 l. Su cultivo se basa en favorecer el crecimiento vegetativo de los ejemplares y se realiza en circuito cerrado; donde solo se renueva el agua que se pierde por evaporación. Las condiciones de cultivo en el laboratorio son: una salinidad de 35 g/l; una temperatura de unos 22-23 °C; una intensidad de luz de entre 300 - 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (en la superficie del agua); una aireación media, para favorecer la agitación del cultivo; una filtración constante de agua, para eliminar sólidos en suspensión y el tratamiento del agua con luz ultravioleta, para eliminar bacterias del cultivo. El fotoperiodo es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para mantener la temperatura del agua, se emplean termocalentadores eléctricos dentro del tanque.

Cada día; se revisa la temperatura y el volumen de agua en el tanque, el estado de las luces, la aparición de especies epífitas en el cultivo y el correcto funcionamiento del filtro. La gestión de cultivos se realiza una vez a la semana. Dicha gestión implica medir la concentración de nitratos, hierro y fosfatos en el tanque; vaciar y desinfectar el tanque y llenarlo con agua nueva y pesar a biomasa del alga; en este caso no se retira biomasa del tanque.

En función de los niveles de nitratos, fosfatos y hierro detectados, si no se renueva en su totalidad del medio de cultivo, se añaden nutrientes al tanque para que las algas puedan continuar creciendo. La concentración deseada de nitratos se sitúa en 10 ppm y la de fosfato en 0,5 ppm. También se añade una disolución de oligoelementos a razón de 50 ml por cada 100 l de agua.

Durante el desarrollo del cultivo de *Crassiphycus corneus*, el alga sufrió una contaminación con un alga roja epífita filamentosa y con cianofíceas, al igual que en el cultivo de *Gracilaria bursa-pastoris*. Las acciones emprendidas para reducir la presencia de algas epífitas fueron las mismas que en el cultivo de *Gracilaria*.

3.7. TAREAS BÁSICAS DE LABORATORIO

- ✓ Recogida de todo el material a secar en los fregaderos y poyatas, asegurándose previamente de que está limpio y totalmente seco.
- ✓ Ordenamiento de todo el material de laboratorio. El material que no tengan una sección en el laboratorio se almacenará en el sótano en el espacio habilitado para tal fin.
- ✓ Limpieza de zonas de trabajo y almacenaje.
- ✓ Deposición de los residuos de ácidos inorgánicos, halogenados, no halogenados, cristal y plásticos contaminados en los contenedores correspondientes.

4. SALIDA AL CAMPO

Se realizó una salida al campo en el municipio de Cambados a 15 de diciembre de 2020. El objetivo del viaje fue la recogida de ejemplares de *Ulva rigida* C. Agardh, *Ulva australis* Areschoug, *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh, *Gracilariopsis longissima* (S.G. Gmelin) Steentoft, L.M. Irvine & Farnham y *Gracilaria bursa-pastoris*.

Las algas recogidas se trasladaron al laboratorio y se procedió a su identificación. Se iniciaron dos cultivos con individuos de *Ulva rigida* y *Gracilaria bursa-pastoris*.



Ilustración 11; Recogida de ejemplares en el medio natural
(Foto: E. Roca)

5. CONCLUSIONES

Las instalaciones de la empresa son adecuadas y favorecen la adaptación y el aprendizaje de los alumnos. Durante el desarrollo de mis prácticas, he adquirido nuevos conocimientos en el campo del cultivo de las macroalgas y como técnico de laboratorio.

Durante el transcurso de las practicas he podido observar de cerca este sistema de cultivo y formarme sobre cada una de las especies y fases del ciclo biológico que se cultivan en el laboratorio. La comparativa del trabajo realizado con lo estudiado en el máster me ha permitido afianzar mis conocimientos y aprender a aplicar las metodologías teóricas al ámbito profesional y práctico.

Valoro muy positivamente el tiempo que he pasado en esta empresa. Evaluando el conjunto de tareas, actividades, experiencias y procesos desarrollados durante los meses de formación; creo que, he fomentado el trabajo en equipo, crecido como persona, aportado mi punto de vista y colaborado en el desempeño de los trabajos realizados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- APHA, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition, *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF)*, Washington DC., pp.1–4.
- BIOCOST (Biología Costera). Grupo de investigación. 2005. [Internet]. Consultado el 8 de enero de 2021.
 - Disponible en: <https://investigacion.udc.es/es/Research/Details/G000255>
- CHENG, T.-H., (1969). Production of kelp - a major aspect of China's exploitation of the sea. *Economic Botany*, 20:215-236.
- GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K.; ANDERSON, L. 1999. *Methods of Seawater analysis*. Weinheim. pp: 170 -184.
- IPAC. 2018. La empresa Phycosem Marine Agronomy, galardonada con los VI premios Bioga. [Internet]. Consultado el 16 de diciembre de 2020.
 - Disponible en: http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/66080/la_empresa_phycosem_marine_agronomy_galardonada_con_los_vi_premios_bioga.html
- IZQUIERDO, J.L.; NAVARRO, M.J.; GALLARDO, T. 1993. Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica. IV. *Laminaria ochroleuca* Pylaie, *L. hyperborea* (Gunner.) Foslie y *L. saccharina* (L.) Lamour. *Botanica complutensis*, 18. pp: 299-301.
- RIBAMAR DA CRUZ FREITAS JR., J. 2015. *Saccharina latissima* en sistemas de AMTI [Tesis doctoral] A Coruña. pp: 21-24.