

**Desarrollo de cultivos de *Ulva* (Ulvaes, Chlorophyta)
como biofiltro en sistemas de AMTI**

**Desenvolvemento de cultivos de *Ulva* (Ulvaes,
Chlorophyta) como biofiltro en sistema de AMTI**

**Development of *Ulva* (Ulvaes, Chlorophyta) cultures
as a biofilter in IMTA systems**

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)
Grupo de investigación en Biología Costera (BioCost)

Tutor: Javier Cremades Ugarte

Eduardo Casais Caamaño
A Coruña, 2016



Índice

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Resumen..... | 4 |
| 2 | Introducción | 5 |
| 3 | Objetivos | 6 |
| 4 | Material y métodos | 7 |
| 4.1 | Descripción de las especies | 7 |
| 4.2 | Medio de cultivo..... | 10 |
| 4.3 | Estudio morfológico | 10 |
| 4.4 | Composición nutricional..... | 10 |
| 4.5 | Sistema de cultivo en tanque | 10 |
| 4.6 | Condiciones de cultivo en cámara: experiencias para determinación del factor luz.. | 11 |
| 4.7 | Determinación del crecimiento, productividad, relación peso húmedo/peso seco y relación peso húmedo/superficie | 11 |
| 4.8 | Diseños experimentales | 12 |
| 4.8.1 | Experiencia crecimiento en tanque..... | 12 |
| 4.8.2 | Experiencia factor luz | 13 |
| 4.9 | Análisis estadístico | 14 |
| 5 | Resultados | 15 |
| 5.1 | Estudio morfológico de las especies en cultivo..... | 15 |
| 5.2 | Valores nutricionales de las especies..... | 17 |
| 5.3 | Tasas de crecimiento y productividad en tanque | 26 |
| 5.4 | Efecto de la luz sobre las tasas de crecimiento..... | 27 |
| 6 | Discusión | 29 |
| 7 | Conclusiones..... | 32 |
| 8 | Referencias bibliográficas | 33 |

1 Resumen

La aplicación de sistemas en recirculación de agua (RAS) con biofiltros de macroalgas del género *Ulva* es una interesante opción de futuro, especialmente en cultivos de peces, debido a los numerosos beneficios que suponen: reducen el impacto ambiental, mejoran la eficiencia de los cultivos, diversifican la producción y mejoran los beneficios económicos. Por ello, este trabajo tiene como objetivo realizar un estudio comparado de los requerimientos de cultivo y calidad de la biomasa obtenida de cuatro especies de *Ulva* para determinar su uso potencial en sistemas de AMTI en recirculación. Las especies estudiadas fueron *Ulva ohnoi*, *U. fasciata*, *U. australis* y *U. rigida*. Los resultados mostraron grandes diferencias a nivel morfológico, composición química, tasa de crecimiento y eficiencia en la utilización de la luz entre las especies. Se concluyó que: las especies de *Ulva* utilizadas presentan tasas de crecimiento comprendidas entre el 10 y 20 % día⁻¹ y un alto contenido proteico y otros nutrientes esenciales, *U. ohnoi* es la especie que presenta un mayor potencial para su aplicación como biofiltro en sistemas de AMTI en recirculación, la distancia filogenética de las especies no está en absoluto correlacionada con su comportamiento en cultivo o composición química y estudios futuros deberán determinar el efecto que puedan tener tanto la fase del ciclo como las condiciones de cultivo o el estado fisiológico sobre la tasas de crecimiento y sus oscilaciones en estas y otras especies del género *Ulva*.

2 Introducción

La acuicultura es uno de los sectores productivos con mayor crecimiento y desarrollo en la actualidad, superando ya a la pesca, y que seguirá creciendo durante las próximas décadas (FAO, 2014). Este aumento de las actividades acuícolas supondrá un gran impacto medioambiental, principalmente debido a la eutrofización de los ecosistemas (Liu *et al.*, 2009; 2013). Por ello es necesario desarrollar sistemas de cultivo más eficientes y respetuosos con el medioambiente.

La acuicultura multitrófica integrada (AMTI) es una interesante opción de futuro ya que permite mejorar la eficiencia de los cultivos, reducir el impacto ambiental, diversificar la producción y mejorar los beneficios económicos (Nobre *et al.*, 2010). El uso de macroalgas como sistemas de extracción inorgánica (biofiltro) en la AMTI permite reducir el impacto ambiental, mejorar la calidad de agua y generar biomasa algal de alto valor nutricional (Bolton *et al.*, 2009; Cruz-Suárez *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2008; Lawton *et al.*, 2013; Neori *et al.*, 2000; Robertson-Andersson *et al.*, 2008). Por otro lado, la posibilidad de emplear un sistema biológico de extracción inorgánica en sistemas de recirculación reduciría los riesgos de enfermedades debido a la aparición de bacterias patógenas (Salvesen *et al.*, 1999). Los biofiltros de macroalgas también se pueden emplear asociados a sistemas de cultivos terrestres, con el objetivo de reducir y eliminar el impacto ambiental ocasionado por los afluentes procedentes de la agricultura y ganadería (Nielsen *et al.*, 2012).

Las macroalgas del género *Ulva* Linnaeus son idóneas para su empleo en sistemas de AMTI debido a las características que reúnen: altas tasas de crecimiento, capacidad de multiplicación vegetativa, potencial para captar y crecer en medios con alto contenido en N (NO_3^- y NH_4^+ principalmente) y P (Luo *et al.*, 2012; Macchiavello *et al.*, 2014), su morfología laminar fina, la diversidad de especies que presenta el grupo y su gran plasticidad morfológica y ecofisiológica (Mshigeni *et al.*, 1979; Wichard *et al.*, 2015). Por otra parte se ha observado que las comunidades bacterianas asociadas a las Ulvales, que tienen importantes implicaciones en el crecimiento y su morfogénesis (Wichard *et al.*, 2015), pueden tener un importante potencial como probiótico, siendo un aliciente más para el uso de estas especies en sistemas de AMTI en recirculación. Este es el caso de las distintas especies de *Roseobacter* (Planas *et al.*, 2006).

Pero no solo es interesante el uso de las especies de *Ulva* en sistemas de AMTI por su capacidad de biofiltración, sino que también lo es por el valor y potencialidad de uso de la biomasa obtenida en i) la alimentación humana, debido a su alto contenido en proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales, compuestos bioactivos (antioxidantes, antibacteriales, antivirales, anticancerígenos, etc.) y bajo en lípidos (Plaza *et al.*, 2008), ii) la alimentación en acuicultura, lo que permite formular piensos menos grasos y con tasas de aceptación más altas (Valente *et al.*, 2006; Vizcaíno *et al.*, 2015), iii) la creación de nuevos materiales como biocauchos (Carrasco, 2008) o iv) la generación de biocombustibles (Montingelli *et al.*, 2015); entre otras aplicaciones.

En España, el cultivo de peces tiene una gran importancia, siendo en las costas de Galicia en su mayoría sistemas de cultivo *indoor* intensivos. Estos sistemas en tierra, en un principio abiertos, están evolucionando a sistemas en recirculación de agua (RAS) tecnológicamente más complejos, pero económica y ambientalmente más sostenibles. La integración de los cultivos de macroalgas como *Ulva* en estos sistemas permitirá mejorar su eficiencia y rentabilidad tanto por su capacidad de regeneración de la calidad del agua y sus efectos probióticos como por el valor añadido de la biomasa obtenida.

3 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio comparado de los requerimientos de cultivo y calidad de la biomasa obtenida de cuatro especies de *Ulva*: *Ulva australis* Areschoug, *U. fasciata* Delile, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada y *U. rigida* C. Agardh para determinar su uso potencial en sistemas de AMTI en recirculación*.

*Este objetivo es una contribución al proyecto: IntegRAS: “Optimización del diseño y manejo de sistemas de cultivo multitróficos en recirculación peces-macroalgas (AGL2013-41868-R)”, financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 (MINECO).

4 Material y métodos

4.1 Descripción de las especies

En este trabajo se han empleado cuatro especies de *Ulva* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta): *Ulva australis* Areschoug, *U. fasciata* Delile, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada y *U. rigida* C. Agardh. Las especies del género *Ulva* se caracterizan por poseer un ciclo digenético haplo-diplofásico isomórfico (Figura 1).

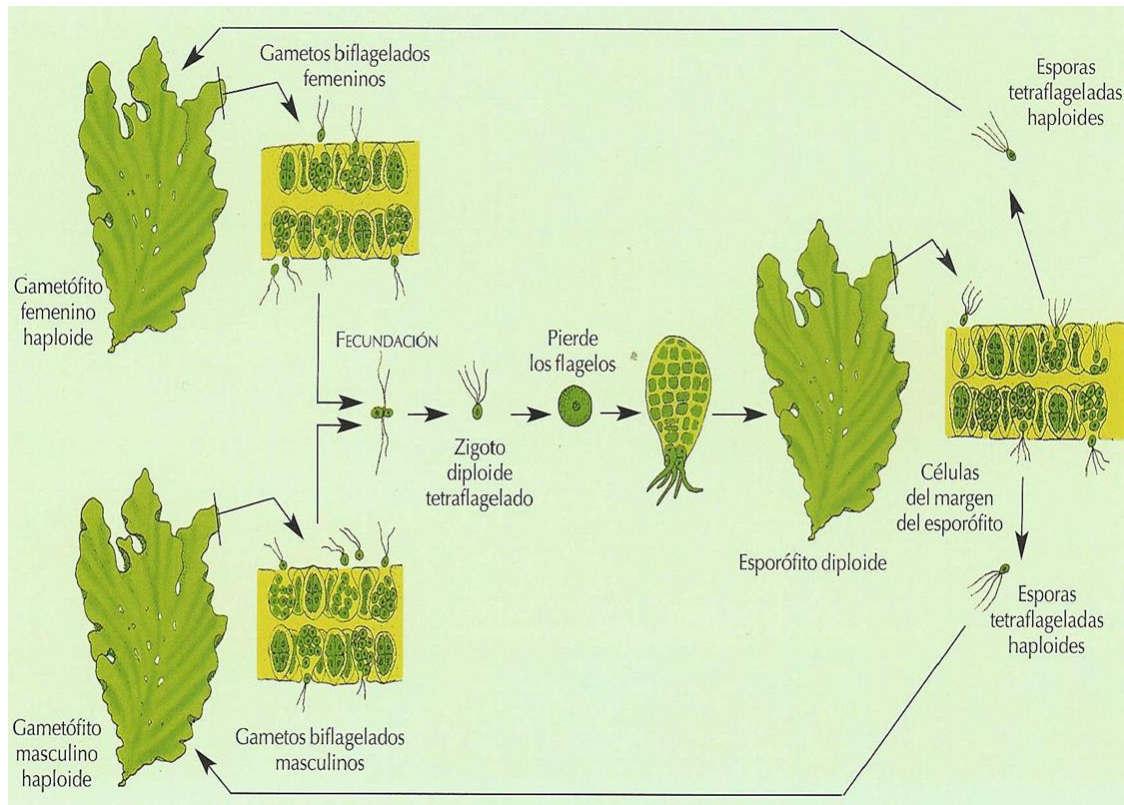


Figura 1: Ciclo biológico de *Ulva* (Cremades *et al.*, 2002).

Las cuatro especies estudiadas presentan distintas características morfológicas:

- *Ulva australis* (= *U. pertusa* Kjellman): lámina de color verde brillante con forma orbicular irregular y lobulada hasta oval, con un grosor de 50-80 μm en la zona apical-media y 145-155 μm en la zona basal, ausencia de dientes marginales y con perforaciones irregulares, células con forma cuadrangular, rectangular o ligeramente poligonales en visión superficial y cuadrangulares u oblongas con ápices redondeados en visión transversal, con (1-) 2 (-3) pirenoides por célula (Baamonde López *et al.*, 2007) (Figura 2).

- *Ulva fasciata*: lámina de color verde hierba más o menos empardecido con forma alargada y lanceolada, con un grosor de 90-115 µm en la zona apical-media y 100-140 µm en la zona basal, de margen festoneado y en ocasiones con presencia de proyecciones espinosas, células alargadas o isodiamétricas en visión superficial y rectangulares a cuadradas en visión transversal, con 2-3 pirenoides por célula (Womersley, 1984).
- *Ulva ohnoi*: lámina de color verde brillante con brillo metálico y de forma orbicular, obovada u ovada, en ocasiones irregular, con un grosor de 30-50 µm en la zona apical-media y 80-90 µm en la zona basal, presencia de dientes microscópicos en el margen, células con forma cuadrangular o poligonal en visión superficial y rectangulares a cuadradas en visión transversal, con 1-3 pirenoides por célula (Hiraoka *et al.*, 2003).
- *Ulva rigida*: lámina de color verde más o menos oscuro de forma orbicular irregularmente lobulada hasta lanceolada, con un grosor desde 40 µm en la zona apical-media hasta 100 µm en la zona basal, presencia de dientes microscópicos y macroscópicos en el margen, células con forma redondeada hasta poligonales con esquinas redondeadas en visión superficial y redondeadas o fusiforme en visión transversal, con 1 o más pirenoides por célula (Hoeksema & van de Hoek, 1983).

Las especies estudiadas presenta diferencias ecofisiológicas, *U. rigida* y *U. australis* son especies preferentemente septentrionales (aguas frías, menor intensidad lumínica) mientras que *U. fasciata* y *U. ohnoi* son especies más meridionales (aguas cálidas, mayor intensidad lumínica). También hay diferencias de origen, siendo *U. australis* y *U. ohnoi* especies alóctonas mientras que *U. rigida* y *U. fasciata* son autóctonas.

En cuanto a su disposición taxonómica se puede ver que *U. rigida*, *U. ohnoi* y *U. fasciata* son especies muy cercanas, siendo *U. australis* la que presenta una posición más lejana en el árbol filogenético (Figura 3).

Las cuatro especies con las que se investigó fueron identificadas en base a sus características morfológicas y moleculares. La identificación molecular de especies se realizó a partir de 30 muestras, mediante la comparación de secuencias de *rbcL* barcode. Este análisis fue realizado por la empresa AllGenetics.

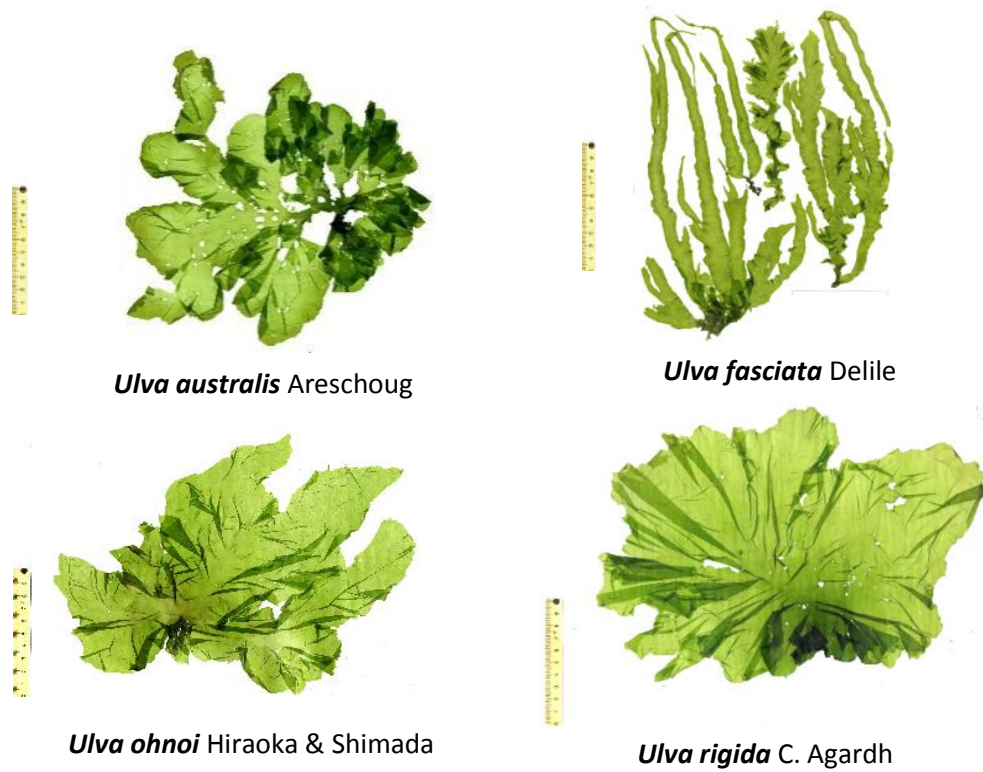


Figura 2: Morfología macroscópica de cuatro especies de *Ulva* recogidas en el medio natural (Imágenes tomadas del herbario del grupo BioCost en la UDC).

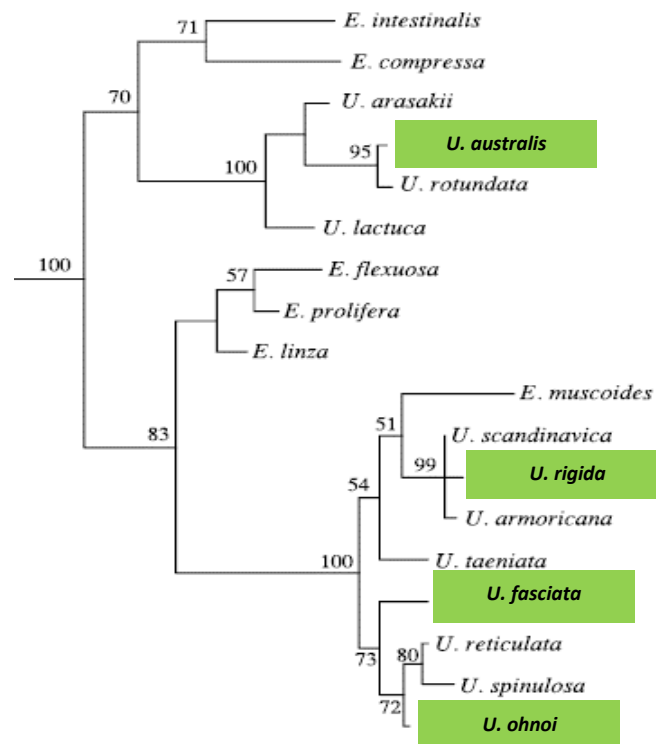


Figura 3: Árbol de máxima verosimilitud construido a partir de un análisis de secuencias ITS del rDNA (incluyendo el gen 5.8S rRNA) para *Ulva* (*U*) y *Enteromorpha* (*E*) (Hiraoka *et al.*, 2003). Las especies marcadas en verdes son las estudiadas en este trabajo.

4.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo estándar empleado consistió en agua marina filtrada a 100 μm , procedente de un tanque de 10.000 L en el cual se almacena. Se enriqueció con 20 ppm de nitrógeno (NO_3Na), 0,5 ppm de fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y oligoelementos, principalmente Fe, en una proporción de 50 ml por 100 L de medio de cultivo.

Los oligoelementos se prepararon según la siguiente fórmula: 14 gr de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14 gr de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,6 gr de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,55 gr de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gr de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,05 gr de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hasta 1 L en agua destilada.

La composición química del medio fue diseñada para simular condiciones de cultivo con altas cargas de nitrógeno y fosfatos, similares a un afluente de una planta de cultivo de peces.

4.3 Estudio morfológico

El estudio morfológico comparativo de las especies en cultivo fue realizado en un microscopio Olympus BX50, a partir de biomasa cultivada en las mismas condiciones en el laboratorio del grupo BioCost en el CICA.

4.4 Composición nutricional

La composición nutricional de las distintas especies fue analizada en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Cataluña y facilitada para este trabajo por alguno de los integrantes del proyecto de investigación “IntegRAS”.

Todos los valores nutricionales se midieron a partir de 100 gr (peso seco) de biomasa algal cultivada en medio estándar en el laboratorio del grupo Biocost en el CICA y de dos kits comerciales (25 gr por kit) de *Ulva* spp. (lechuga de mar) de la empresa Porto Muiños.

4.5 Sistema de cultivo en tanque

El cultivo de las macroalgas se realizó en tanques iguales de 200 L, con aireación constante y ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas. El sistema de aireación empleó aire filtrado mediante filtros de cartucho. Para la luz se empleó bombillas Prilux ecSaver High Luminosity de 85 W y 6.400 °K. La salinidad se mantuvo en 34‰ añadiendo agua dulce para corregir las pérdidas debidas a la evaporización.

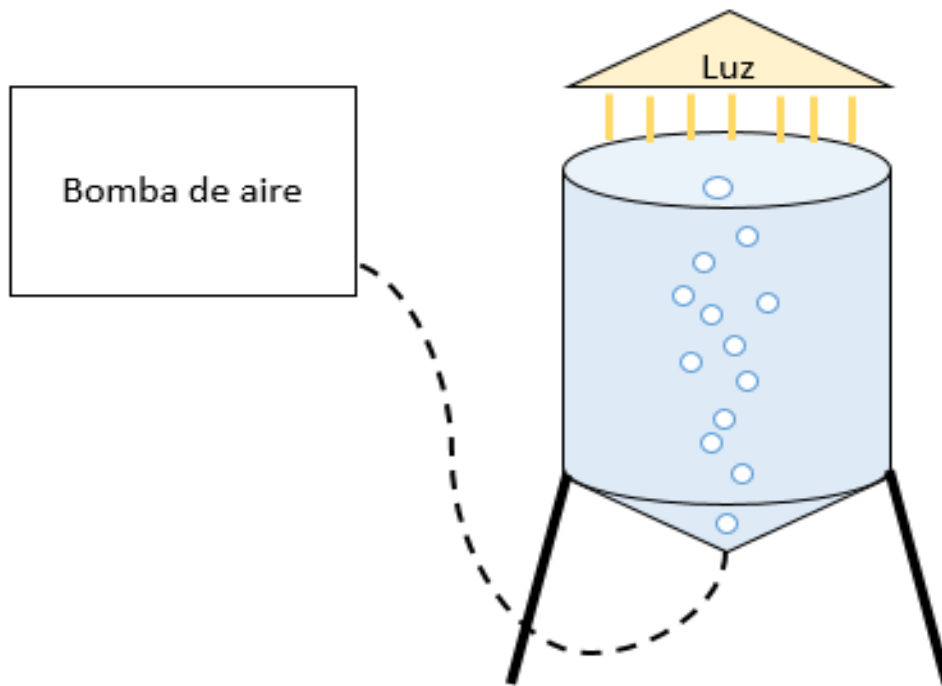


Figura 4: Esquema de uno de los tanques de cultivo empleados.

4.6 Condiciones de cultivo en cámara: experiencias para determinación del factor luz

La experiencia realizada para conocer la influencia de la intensidad lumínica en el crecimiento de las distintas especies se realizó en una cámara de cultivo Liebherr Profiline. Durante toda la experiencia se mantuvo una temperatura de $20 \pm 0,2$ °C, una rotación de 50 r.p.m. mediante un agitador Skyline Shaker Dos-20L y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 horas mediante dos paneles led Samsung VT-1422 Sku4812. Para todas las experiencias se empleó medio de cultivo estándar con una renovación cada 24 horas.

4.7 Determinación del crecimiento, productividad, relación peso húmedo/peso seco y relación peso húmedo/superficie

El peso se determinó mediante una báscula de precisión RadWag Ps600.R2. Para el peso húmedo se secó previamente la biomasa mediante papel de filtro con el objetivo de retirar la película de agua de la superficie del alga. El peso seco se midió empleando la misma biomasa usada para medir el peso húmedo, secándola previamente en una cámara de secado Memmert UF75 hasta peso constante.

La tasa de crecimiento (Ecuación 1) permite estimar el potencial que tienen las especies para su cultivo y la productividad (Ecuación 2) determinar su potencial en un cultivo industrial (cultivos masivos) y conocer la cantidad de biomasa que se genera en un determinado periodo de cultivo:

Ecuación 1: $[100 \times \ln (\text{peso húmedo final}/\text{peso húmedo inicial})] / \text{tiempo}$

Ecuación 2: $[(\text{peso húmedo final} - \text{peso húmedo inicial}) / \text{superficie}] / \text{tiempo}$

La relación peso húmedo/peso seco (Ecuación 3) es una importante referencia para estimar la rentabilidad real del cultivo de las distintas especies, particularmente si su venta es en forma de deshidratado, y también es indicadora de la cantidad de cenizas de las distintas especies:

Ecuación 3: peso húmedo/peso seco

La relación peso húmedo/superficie (Ecuación 4) es un indicador de la capacidad que tiene las especies de generar biomasa por superficie. Este indicador puede servir para valorar el estado fisiológico del cultivo (cultivos que crezcan a tasas de crecimiento altas tendrán relaciones peso húmedo/superficie bajas):

Ecuación 4: peso húmedo/superficie biomasa

4.8 Diseños experimentales

4.8.1 Experiencia crecimiento en tanque

Para evaluar las tasas de crecimiento de las distintas especies candidatas se realizó una experiencia de tres semanas de duración, durante la cual se mantuvieron en cultivo tres especies, *Ulva ohnoi*, *U. fasciata* y *U. australis*, individualizadas en tres tanques distintos.

Como material de partida se utilizaron 100 discos de 2 cm de diámetro por especie. Se usaron 180 L de agua de mar (sin enriquecimiento) durante la primera semana, para la aclimatación de los discos, y las restantes se emplearon 180 L de medio de cultivo estándar. Durante toda la experiencia se mantuvo $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz en superficie.

Cada 168 horas se pesaron 20 discos, siguiendo el protocolo para peso húmedo del apartado 4.7, para determinar las tasas de crecimiento y la productividad semanales a partir del peso medio de los discos en cultivo.



Figura 5: Tanque y discos algales durante la experiencia de crecimiento en tanque.

4.8.2 Experiencia factor luz

El efecto de la luz sobre la tasa de crecimiento de las distintas especies se evaluó mediante experiencias de una semana de duración. Se diseñaron cuatro niveles con distintas dosis lumínicas obtenidas mediante el uso de 0, 1, 2 o 3 capas de malla de sombreado de fibra de vidrio de 1 mm de luz: $300 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, $170 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, $100 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y $50 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$



Figura 6: Distribución de las muestras experimentales después de la renovación y aleatorización.

Se emplearon 32 discos de 2 cm de diámetro como unidades experimentales y se distribuyeron unitariamente en recipientes con 20 ml de medio de cultivo estándar. Cada 24 horas se realizaba una renovación del medio, momento en el cual se aleatorizaba la posición de las muestras. Durante toda la experiencia se mantuvo una temperatura de cultivo de $20 \pm 0,2$ °C, un periodo de luz:oscuridad de 12:12 horas y una agitación de 50 r.p.m.

Las muestras se distribuyeron en una placa con la superficie oscurecida para evitar el exceso de luminosidad y garantizar que la luz procediera únicamente de la parte superior (lámpara led).

Al final del periodo experimental se pesaron los discos, siguiendo el protocolo para peso húmedo del apartado 4.7, para determinar las tasas de crecimiento.

4.9 Análisis estadístico

Para todos los parámetros analizados se calculan las medias y las desviaciones estándar.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa R versión 3.2.5.

En la experiencia de crecimiento en tanque, la hipótesis de que la tasa de crecimiento y la productividad no es diferente entre las distintas especies se analiza mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 %. Cuando la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para analizar que especies tienen distintas tasas de crecimiento y productividad. El test de Tukey se aplica a todos los casos al nivel de significación 0,05 ($p < 0,05$).

En la experiencia del factor luz, la hipótesis de que la tasa de crecimiento no se ve afectada por la distinta cantidad de luz se analiza mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 %. Cuando la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para analizar de qué forma afecta la luz a la tasa de crecimiento. El test de Tukey se aplica a todos los casos al nivel de significación 0,05 ($p < 0,5$).

La hipótesis de que la tasa de crecimiento es distinta entre las distintas especies se analizó mediante un test-t de muestras emparejadas a un nivel de confianza del 95%.

Las gráficas se realizaron con el programa Microsoft® Excel (Office Professional Plus 2013).

5 Resultados

5.1 Estudio morfológico de las especies en cultivo

El estudio morfológico de las especies se realizó a partir de material cultivado en las mismas condiciones (descritas en apartado 4.5).

La morfología de las distintas especies se describe en la tabla 1. En la figura 7 se puede ver las diferencias morfológicas a nivel celular.

Podemos observar que las cuatro especies de *Ulva* cultivadas presentan una morfología muy distinta. *U. ohnoi* es la que tiene la lámina más fina, mientras que *U. australis* y *U. fasciata* presentan las láminas más gruesas. *U. rigida* tiene las células más pequeñas y *U. fasciata*, *U. australis* y *U. ohnoi* las células más grandes.

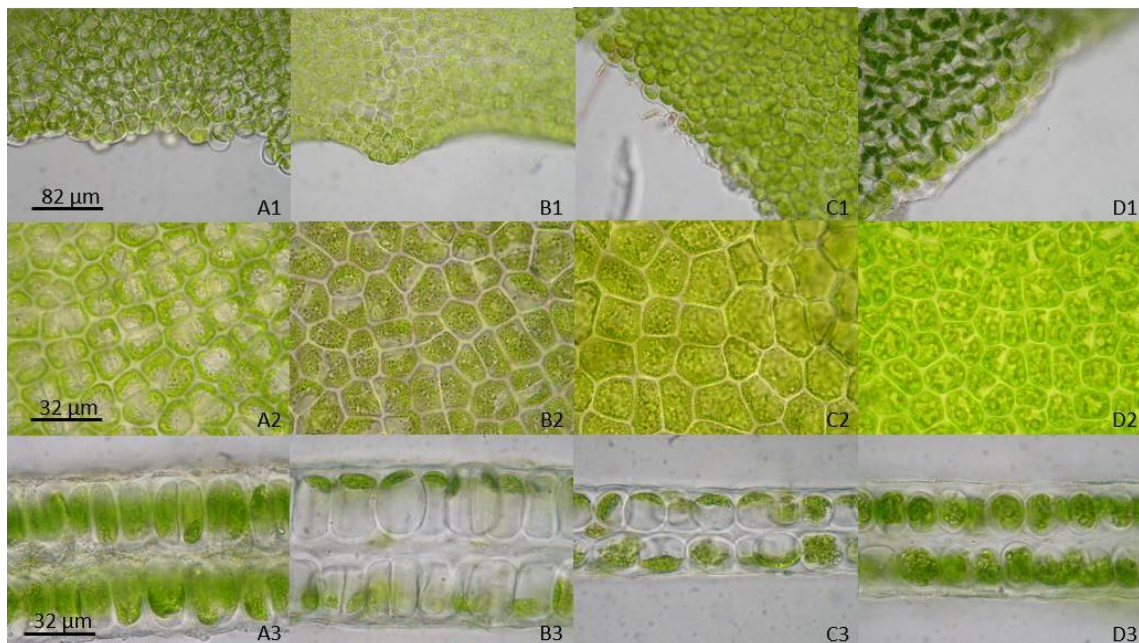


Figura 7: Morfología celular de cuatro especies de *Ulva* procedentes de un cultivo en suspensión en tanque. A) *U. australis*; B) *U. fasciata*; C) *U. ohnoi*; D) *U. rigida*. 1) Visión superficial del margen microscópico; 2) Visión superficial de la zona apical-media; 3) Visión transversal de la zona apical-media.

| | U. australis | U. fasciata | U. ohnoi | U. rigida |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Color | Verde oscuro oliváceo | Verde pálido | Verde brillante con brillo metálico | Verde claro a oscuro, con brillo metálico |
| Consistencia | Media-dura | Dura | Blanda | Dura |
| Textura | Plana o algo curvada | Ligeramente corrugada | Muy corrugada | Plana, poco corrugada |
| Perforaciones | Pequeñas, agrupadas linealmente en líneas concéntricas centro-base o en líneas paralelas | Pocas, submarginales | Pocas, centrales | Con pocas perforaciones o sin ellas |
| Margen | Ligeramente festoneado | Festoneado | Liso | Generalmente liso |
| Borde microscópico | Entero, con grandes dientes macroscópicos | Liso, con ligeras protuberancias o denticulaciones macroscópicas | Liso con células gruesas redondeadas | Dientes microscópicos presentes en la parte basal de algunos especímenes |
| Visión superficial | Células dispuestas en grupos indistintos o en filas desordenadas con forma poligonal y esquinas redondeadas. L: 16-23 μm ; A: 10-17 μm | Células dispuestas en grupos indistintos con forma poligonal angulosa. L: 18-29 μm ; A: 13-27 μm | Células desordenadas con forma poligonal. L: 20-31 μm ; A: 11-23 μm | Células en largas filas o grupos indiferenciados con forma poligonal irregular. L: 13-22 μm ; A: 9-14 μm |
| Visión transversal zona apical | Células alargadas con vértices redondeados. L: 22-32 μm ; A: 9-19 μm | Células muy cuadradas sin diferencias entre haz y envés. L: 20-28 μm ; A: 14-26 μm | Células redondeadas. L: 15-25 μm ; A: 13-17 μm | Células redondeadas. L: 17-22 μm ; A: 13-18 μm |
| Visión transversal zona basal | Células rectangulares alargadas. L: 30-39 μm ; A: 15-17 μm | Células desde rectangulares a cuadradas. L: 29-35 μm ; A: 18-25 μm | Células rectangulares con paredes gruesas. L: 17-23 μm ; A: 14-20 μm | Células ovaladas con extremo plano. L: 35-45 μm ; A: 12-22 μm |
| Grosor lamina apical | 73-77 μm | 70-73 μm | 40-43 μm | 54-56 μm |
| Grosor lamina basal | 96-120 μm | 90-92 μm | 57-63 μm | 93-96 μm |
| Grosor lamina media apical | 5-8 μm | 5-6 μm | 3-4 μm | 5-7 μm |
| Grosor lamina media basal | 12-14 μm | 6-8 μm | 4-7 μm | 9-14 μm |
| Pirenoides | 1-(2) | 1-(2) | 1-(3) | 2-4 |

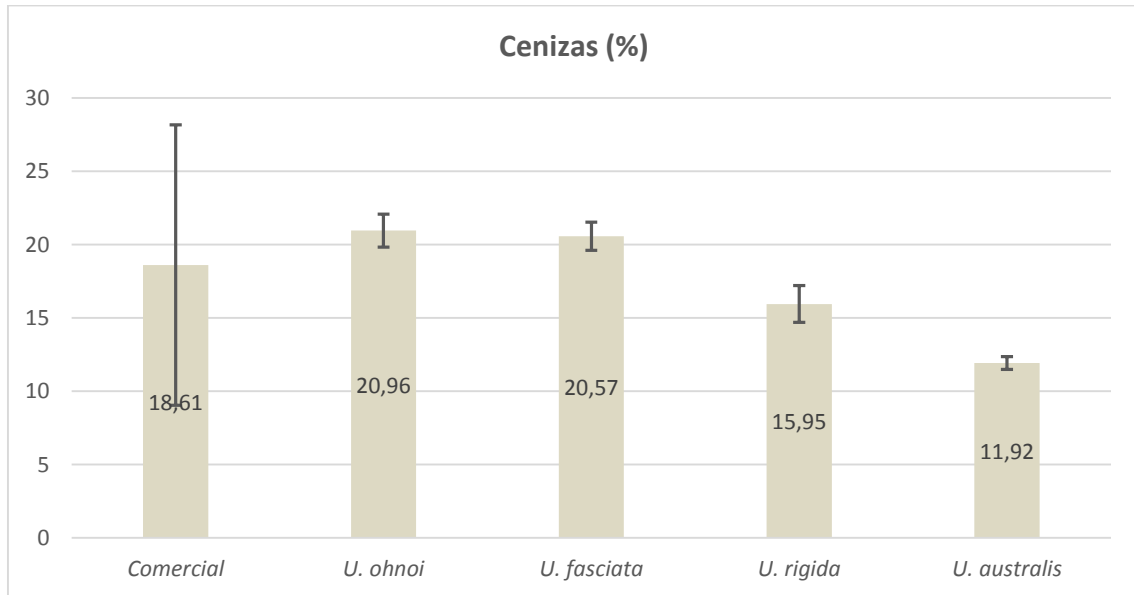
Tabla 1: Descripciones morfológicas de cuatro especies de *Ulva* cultivadas mediante suspensión en tanque. L) largo celular; A) ancho celular.

5.2 Valores nutricionales de las especies

La composición nutricional permite valorar los posibles usos y el precio de venta de la biomasa algal obtenida en cultivo.

Todos los valores de composición química fueron calculados en relación a 100 gr de biomasa. Se emplearon 100 gr de biomasa seca para el análisis químico de las cuatro especies de *Ulva* y un total de 50 gr de dos kits de algas comerciales distintos para el cálculo del valor nutricional de “lechuga de mar” comercializada para la alimentación humana.

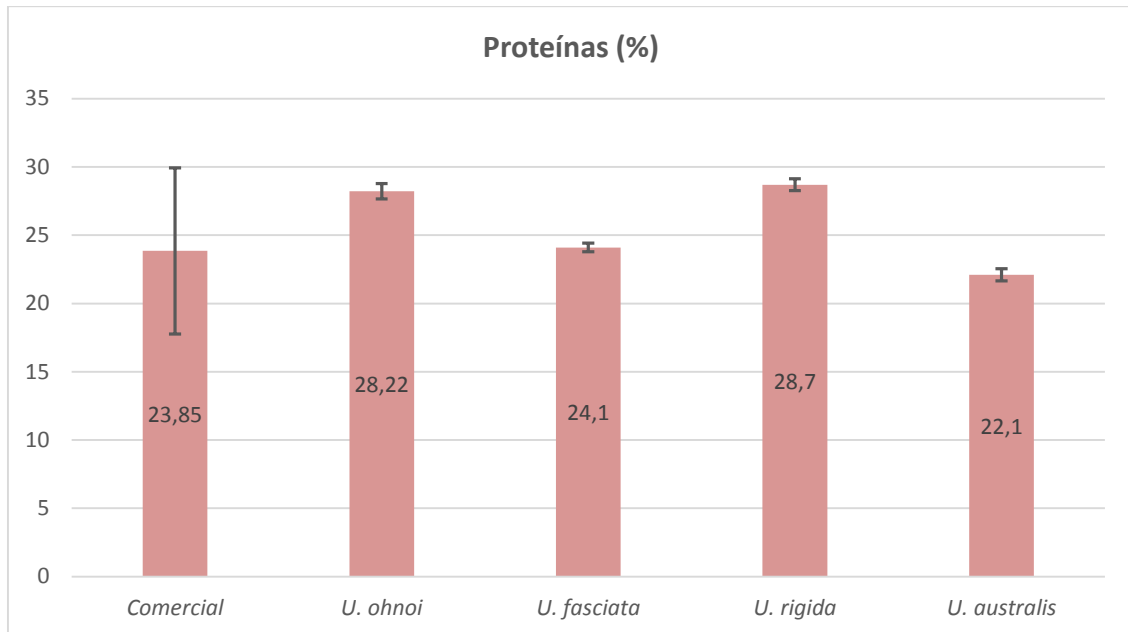
El residuo en cenizas nos permite saber qué especies producirán menos residuos después de la utilización de su biomasa en producción de biocombustibles, biocauchos, etc. En la gráfica 1 vemos que *U. australis* y *U. rigida* son las que producen una menor cantidad de cenizas y *U. ohnoi* y *U. fasciata* son las que producen una mayor cantidad. La muestra comercial presenta una gran variabilidad en su composición química de cenizas.



Gráfica 1: Residuo en cenizas (% en 100 g) de un producto comercial de *Ulva* spp. y cuatro especies de *Ulva*: *U. ohnoi*, *U. fasciata*, *U. rigida* y *U. australis*.

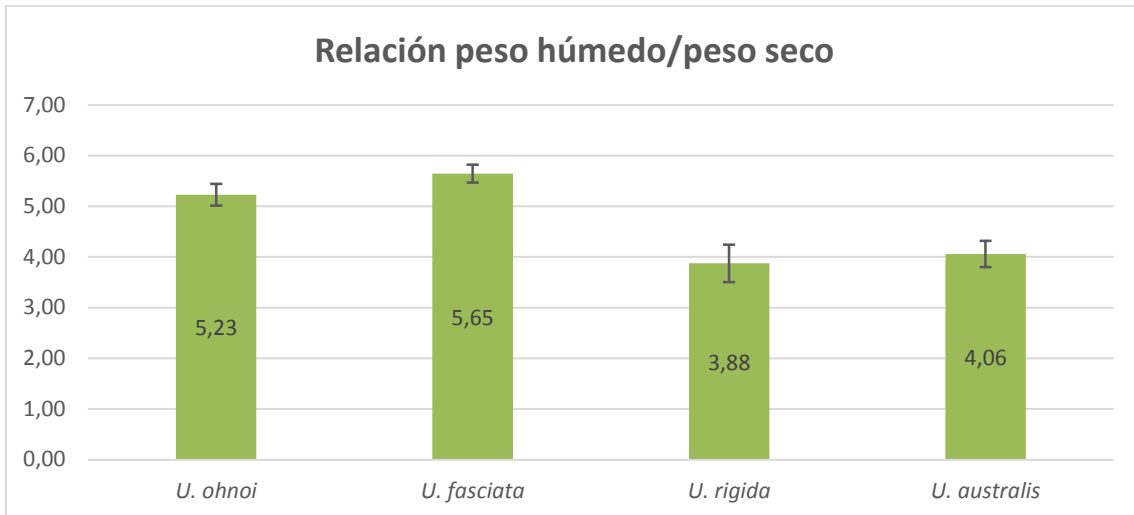
La composición química de proteínas es esencial para realizar una valoración del potencial nutricional de la biomasa algal. En la gráfica 2 observamos que *Ulva ohnoi* y

U. rigida son las especies con mayor contenido proteico, mientras que *U. fasciata* y *U. australis* son las que presenta un menor contenido. La muestra comercial presenta una gran variabilidad del contenido en proteínas.



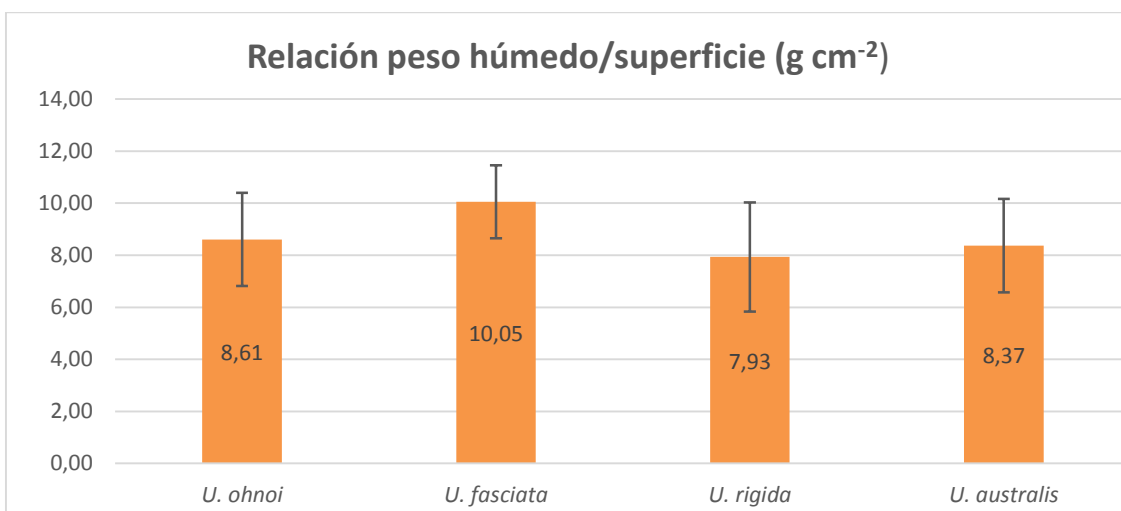
Gráfica 2: Composición química de proteínas (% en 100 g) de un producto comercial de *Ulva* spp. y cuatro especies de *Ulva*: *U. ohnoi*, *U. fasciata*, *U. rigida* y *U. australis*.

La relación peso húmedo/peso seco nos permite determinar el valor de venta en peso fresco y peso húmedo de la biomasa algal. Índices bajos nos indican que especie tendrá una menor pérdida de peso respecto a especies con índices altos cuando se realice el secado de la biomasa. También nos indica que especies tienen una mayor proporción de agua en su composición, y, por lo tanto, que especies tendrán una mayor capacidad de conversión de nutrientes en biomasa nutritiva. En la gráfica 3 vemos que *U. rigida* y *U. australis* son las especies que conservaran más peso después de realizar el secado de la biomasa. *U. fasciata* es la especie que presentan una mayor proporción de agua en su composición, mientras que *U. ohnoi* presenta valores intermedios.



Gráfica 3: Relación peso húmedo/peso seco de cuatro especies de *Ulva*: *U. ohnoi*, *U. fasciata*, *U. rigida* y *U. australis*.

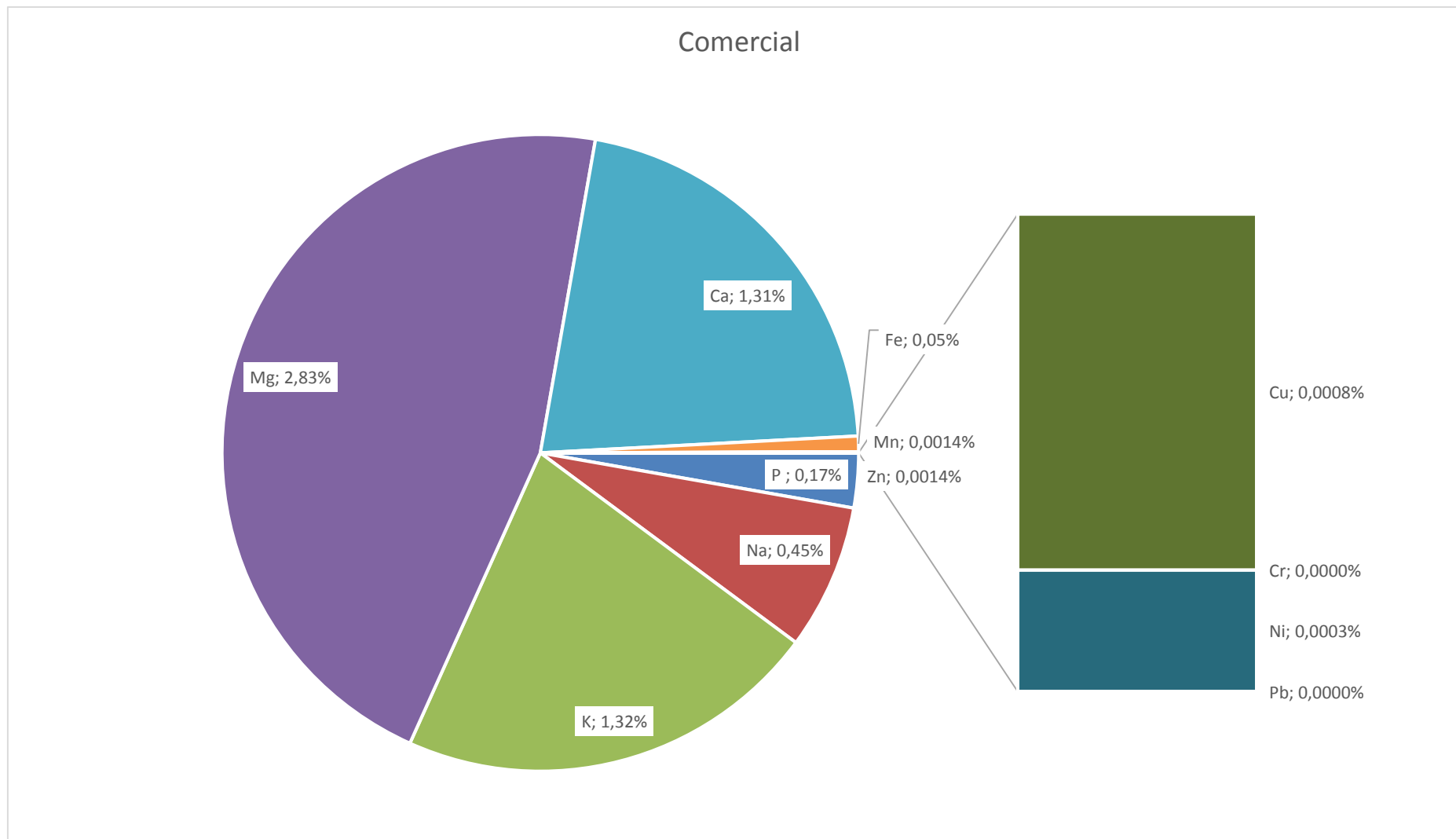
La relación peso húmedo/superficie permite determinar el rendimiento de las especies en cultivo (cuánta biomasa en peso húmedo se generará por m^{-2}). Por otro lado, también se puede emplear como un indicador del estado fisiológico de los cultivos (especies con altas tasas de crecimiento suelen mantener índices bajos y especies con bajas tasas de crecimiento suelen presentar índices altos). En la gráfica 4 se puede ver que las distintas especies de *Ulva* presentan una gran variabilidad de su relación peso húmedo/superficie. *U. fasciata* es la que presenta la relación media más alta.



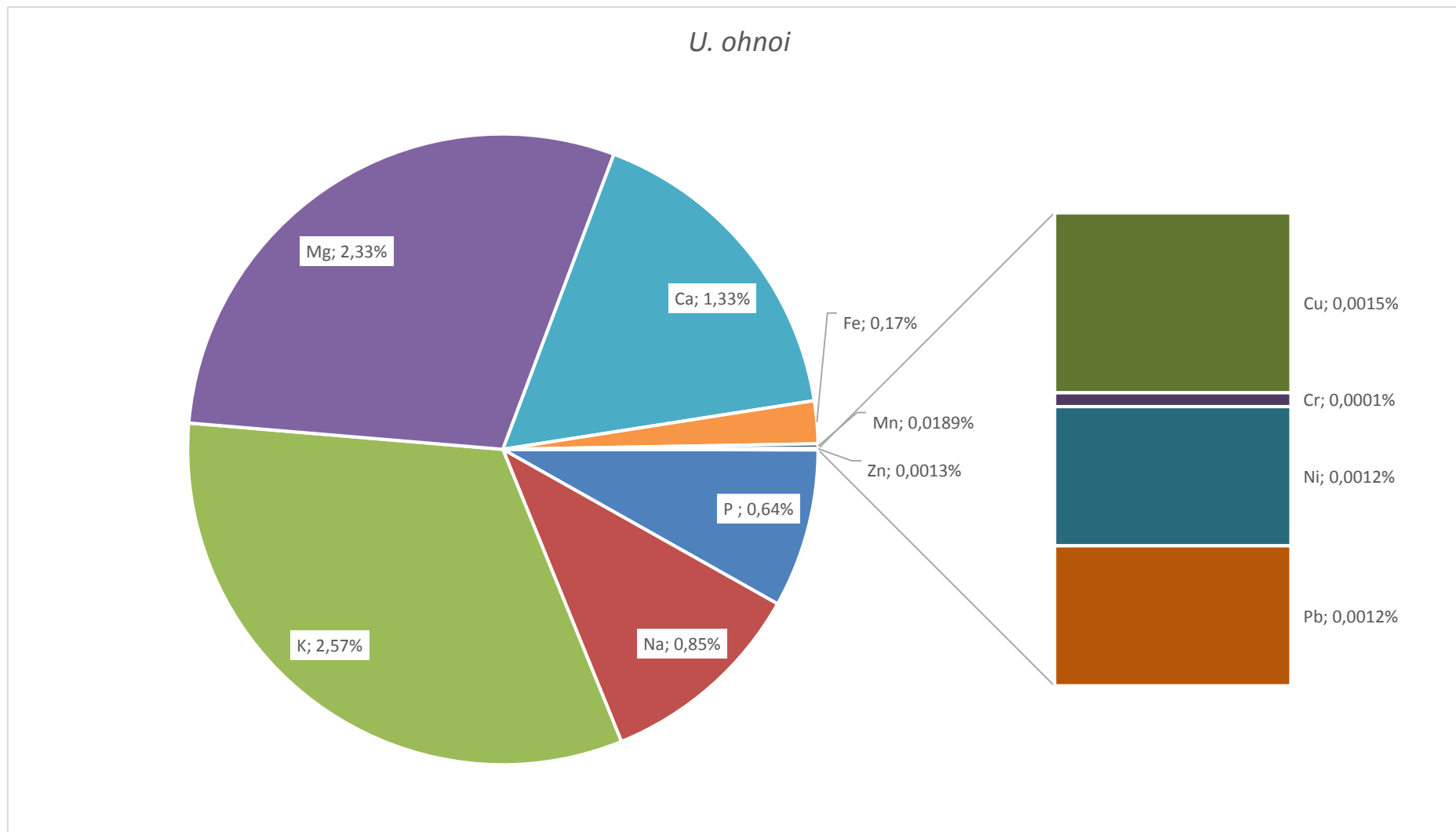
Gráfica 4: Relación peso húmedo/superficie de cuatro especies de *Ulva*: *U. ohnoi*, *U. fasciata*, *U. rigida* y *U. australis*.

La composición química de macrominerales y oligoelementos varía considerablemente entre especies y entre especies cultivadas en medios con alto contenido en nitrato y fosfato y especies comerciales cultivadas en medio no enriquecidos (Gráficas 5, 6, 7, 8 y 9).

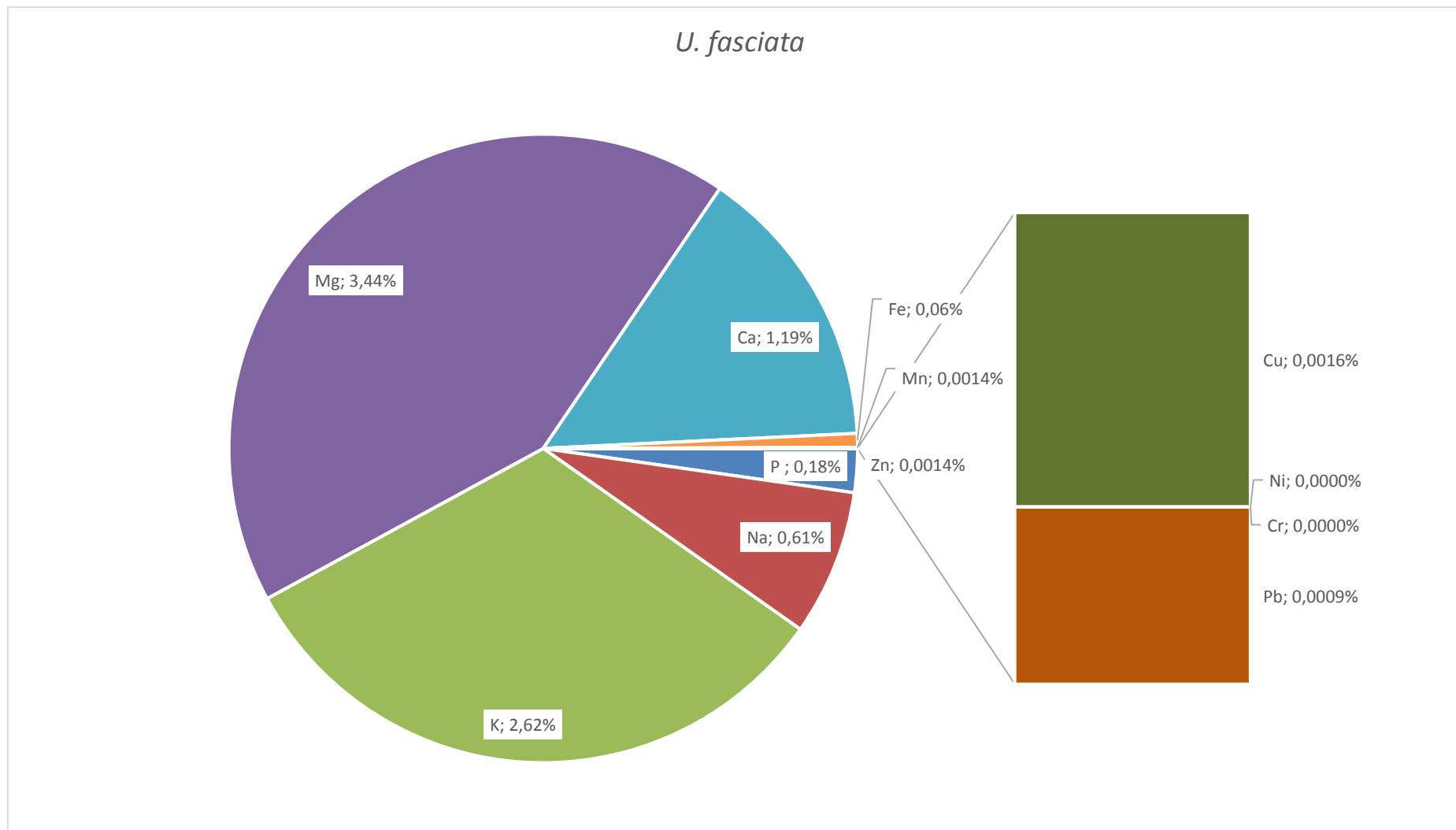
La muestra comercial y *Ulva fasciata* son las que presentan un mayor contenido en magnesio, pero presenta carencias de algunos metales y son las más desequilibradas en su composición nutricional. *U. rigida* y *U. ohnoi* son las que presentan un mejor equilibrio nutricional, disponiendo de una composición de macrominerales y oligoelementos variada. *U. australis* es la que presenta la mejor proporción de magnesio, potasio y sodio.



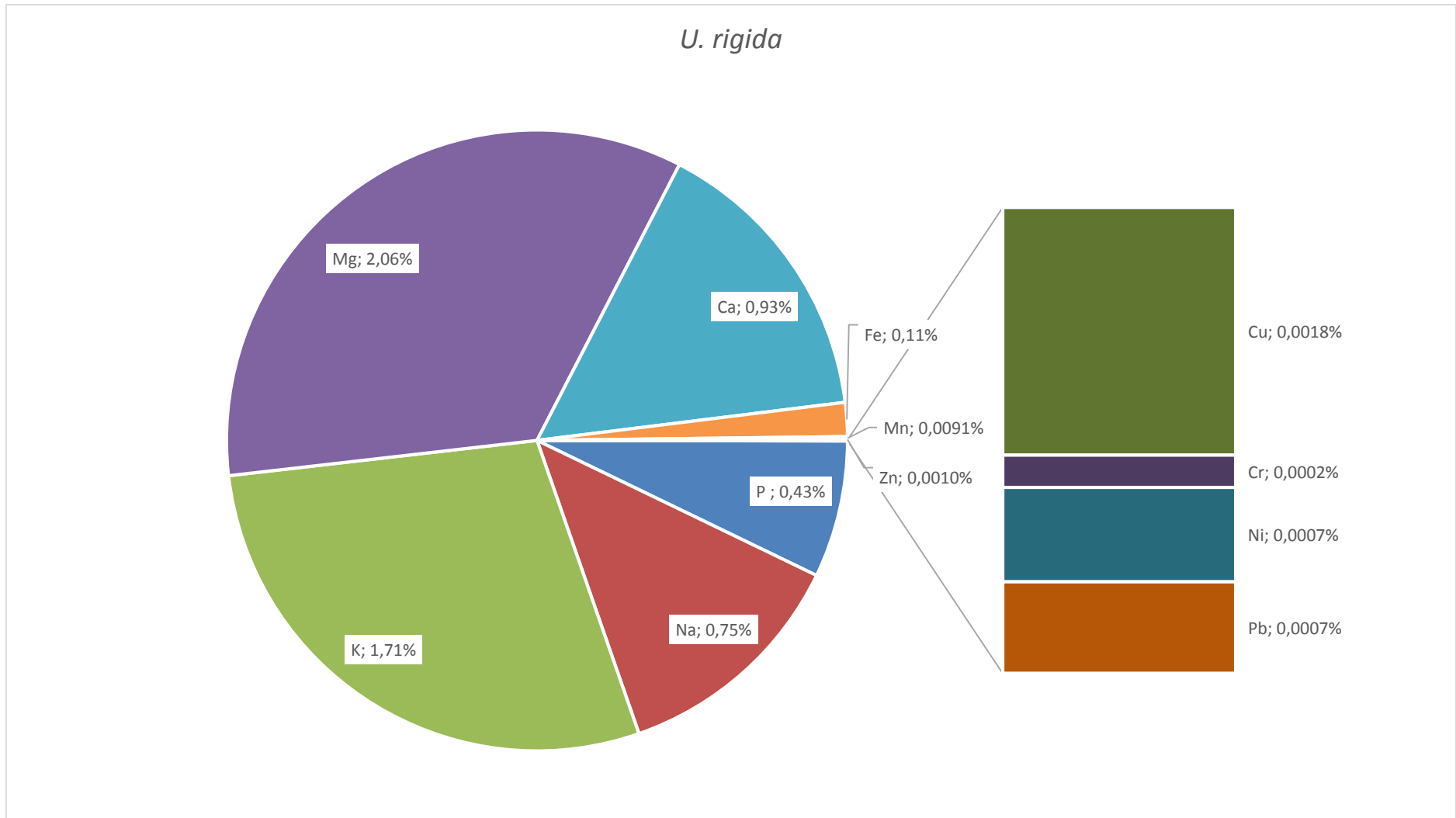
Gráfica 5: Composición química de macrominerales y oligoelementos (% en 100 g) de la muestra comercial de *Ulva* spp.



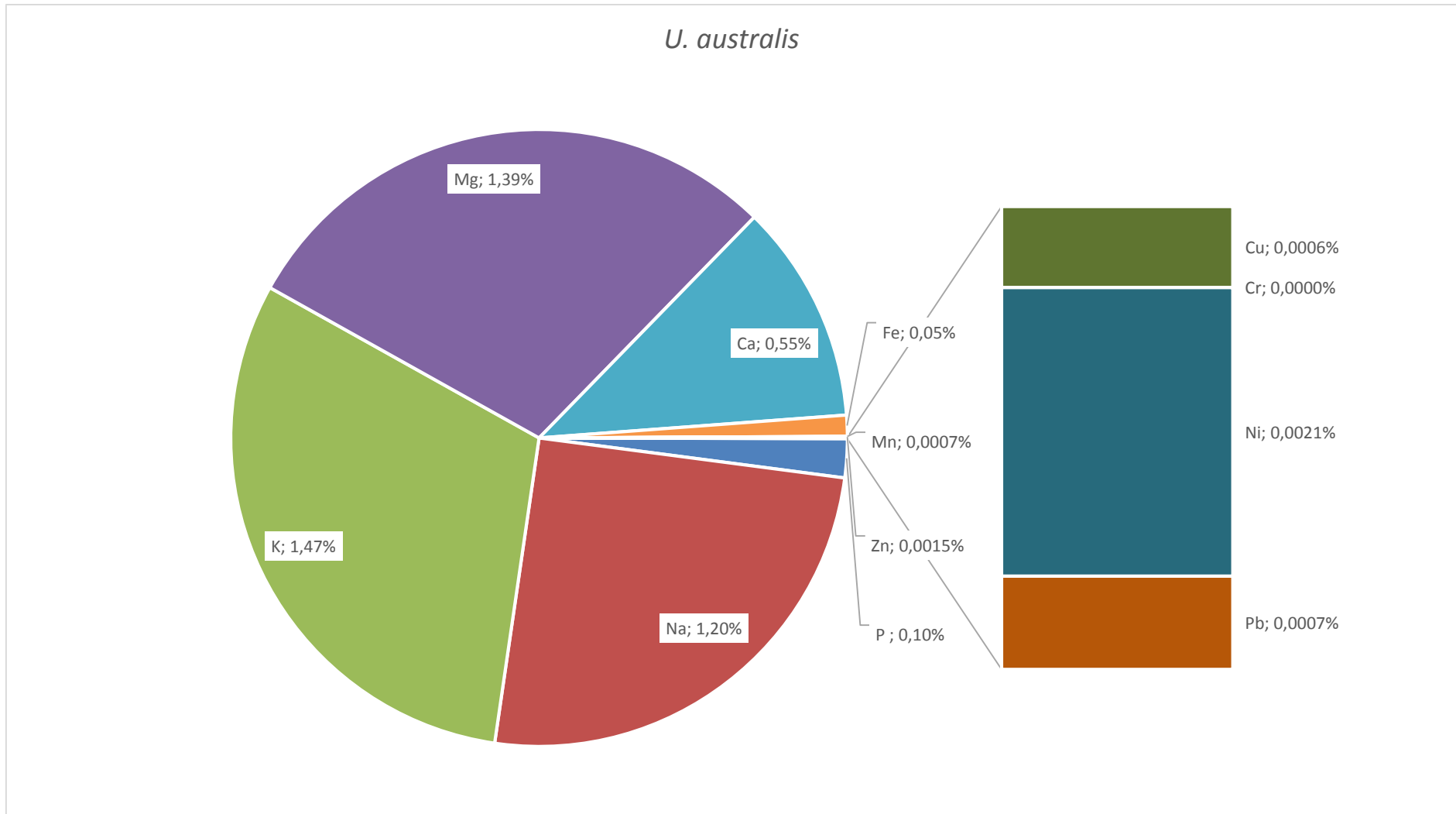
Gráfica 6: Composición química de macrominerales y oligoelementos (% en 100 g) de *Ulva ohnoi*.



Gráfica 7: Composición química de macrominerales y oligoelementos (% en 100 g) de *Ulva fasciata*.



Gráfica 8: Composición química de macrominerales y oligoelementos (% en 100 g) de *Ulva rigida*.

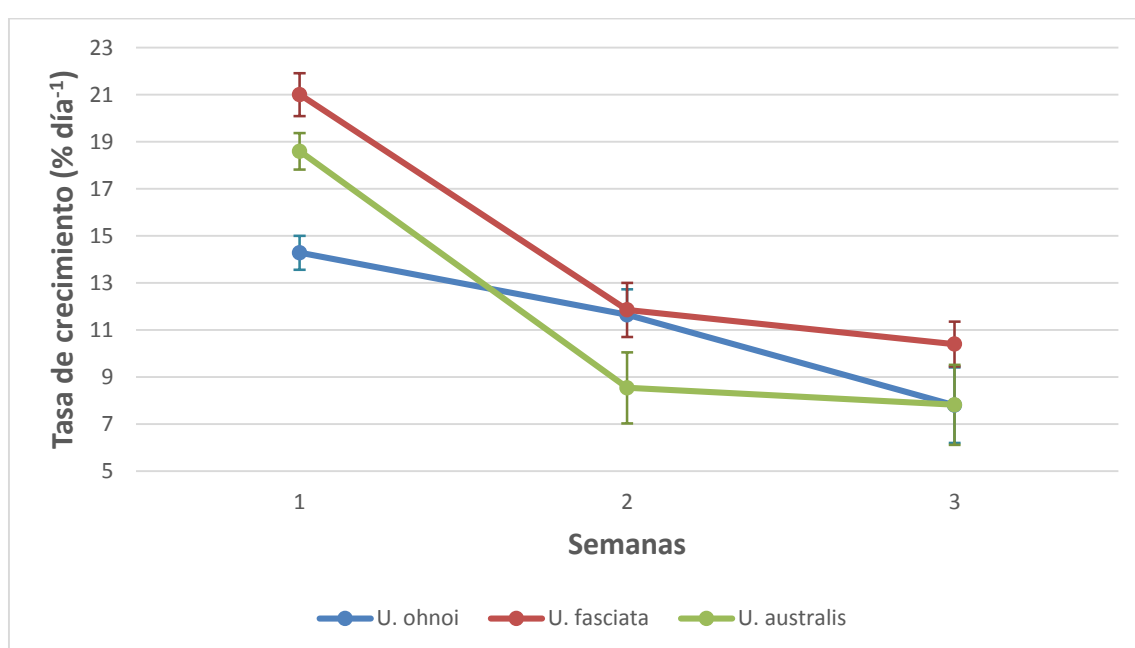


Gráfica 9: Composición química de macrominerales y oligoelementos (% en 100 g) de *Ulva australis*.

5.3 Tasas de crecimiento y productividad en tanque

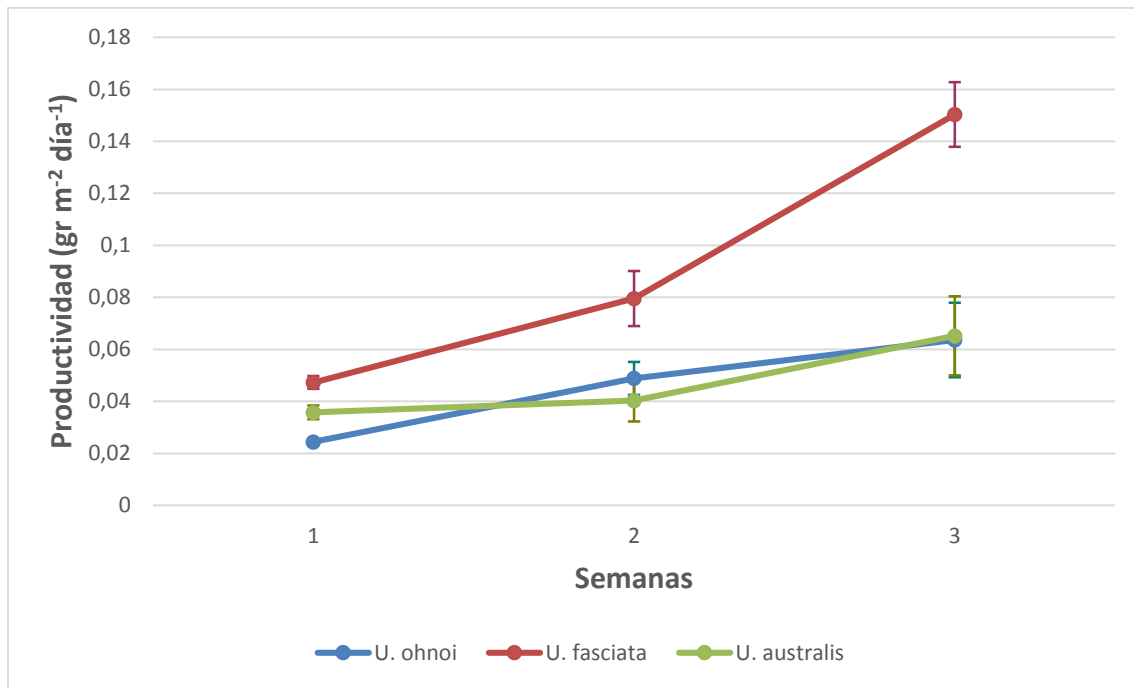
Uno de los principales aspectos que se debe determinar a la hora de seleccionar una especie para su cultivo y uso como biofiltro es su capacidad de crecer en un sistema de cultivo artificial, es decir, debe disponer de tasas de crecimiento y productividad altas y constantes durante su cultivo en tanque.

La tasa de crecimiento y la productividad en tanque fueron estudiadas para tres especies de *Ulva* (Gráfica 10 y Gráfica 11):



Gráfica 10: Tasas de crecimiento medias y desviaciones estándar de las especies *Ulva ohnoi*, *U. fasciata* y *U. australis*.

Se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la tasa de crecimiento de todas las especies en todas las semanas, a excepción de las especies *U. ohnoi* y *U. fasciata* en la semana 2 y las especies *U. ohnoi* y *U. australis* en la semana 3 ($p > 0,05$). La especie que presentó mayores tasas de crecimiento fue *U. fasciata* ($21,01 \pm 0,91$) en la semana 1 y la que presentaron menores tasas de crecimiento fueron *U. ohnoi* ($7,8 \pm 1,61$) y *U. australis* ($7,82 \pm 1,7$) en la semana 3. La que mostró un crecimiento más constante fue la *U. ohnoi*.



Gráfica 11: Productividad media y desviaciones estándar de las especies *Ulva ohnoi*, *U. fasciata* y *U. australis*.

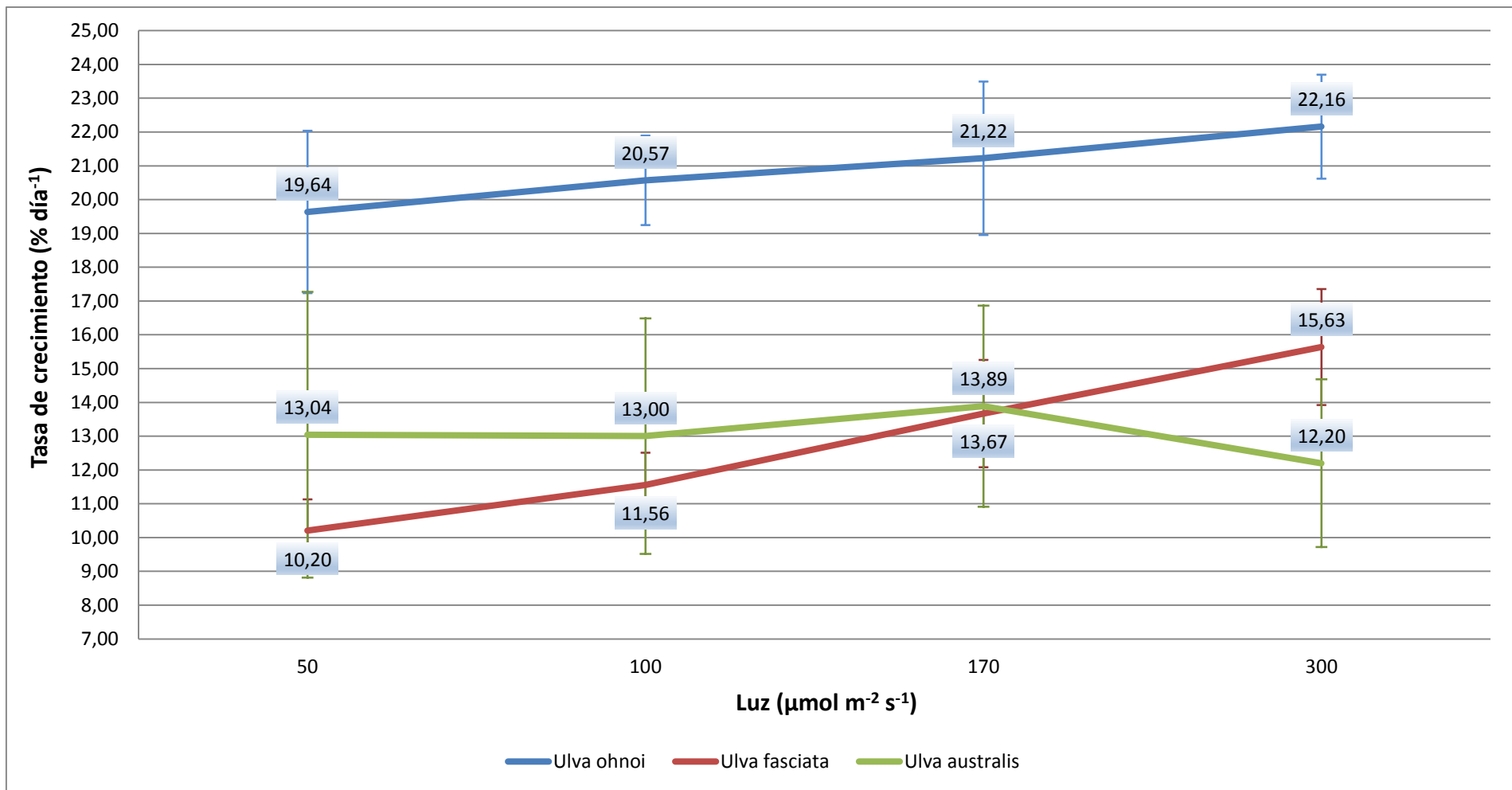
Se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la productividad de todas las especies en todas las semanas, a excepción de las especies *U. ohnoi* y *U. australis* en la semana 2 y en la semana 3 ($p > 0,05$). La especie que presentó mayor productividad fue *U. fasciata* y la que presentaron menores productividades fueron *U. ohnoi* y *U. australis*. La que mostró un aumento de peso más constante fue *U. ohnoi*.

No se pudieron obtener resultados de *U. rigida* debido a su gran tendencia a esporular, lo que imposibilitó la obtención de datos reales de crecimiento.

5.4 Efecto de la luz sobre las tasas de crecimiento

La luz es uno de los principales factores abióticos que influyen en el crecimiento de las macroalgas, ya que al ser organismos fotosintéticos precisan de esta fuente de energía para realizar la fotosíntesis y activar su metabolismo anabólico.

Las tasas de crecimiento fueron estudiadas para tres especies de *Ulva* (Gráfica 12):



Gráfica 12: Tasas de crecimiento medias y desviaciones estándar de las especies *U. ohnoi*, *U. fasciata* y *U. australis* a distintas cantidades de luz. Los valores indica la tasa de crecimiento (% día⁻¹) para cada especie en cada nivel de luz.

Se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la tasa de crecimiento entre los niveles de luz $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *U. fasciata*, los demás niveles no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$). En las especies *U. australis* y *U. ohnoi* no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ninguno de los niveles de luz estudiados.

U. ohnoi fue la especie que presentó una tasa de crecimiento media ($20,9 \pm 1,07$) significativamente mayor ($P < 0,05$) respecto a *U. fasciata* ($12,77 \pm 2,39$) y *U. australis* ($13,03 \pm 0,69$). Entre *U. fasciata* y *U. australis* no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las tasas de crecimiento.

No se pudieron obtener resultados de *U. rigida* debido a su gran tendencia a esporular, lo que dificultó la obtención de datos reales de crecimiento a las distintas dosis lumínicas experimentales.

6 Discusión

Las especies de *Ulva* estudiadas en este trabajo siguen presentando diferencias morfológicas después de su cultivo en tanque. Estas diferencias nos permiten clasificar a las especies en dos arquetipos morfológicos: láminas finas, con muy poca pared media y muy corrugadas, como *Ulva ohnoi*, y láminas más gruesas, consistentes (debido al grosor de la pared media) y lisas a ligeramente corrugadas como *U. rigida*, *U. fasciata* y *U. australis*. Esta distinta morfología puede fomentar que existan diferencias en las tasas de crecimiento y la productividad, ya que las láminas finas muy corrugadas podrían disponer de una mejor capacidad en la obtención de nutrientes al poseer una superficie no homogénea que facilitaría la renovación de la capa límite. Por otro lado, *U. ohnoi* presentan un tamaño celular relativamente grande en relación al grosor de lámina y una pared media muy pequeña, lo que puede suponer una ventaja en términos de crecimiento y valor nutricional al destinar la mayoría de los nutrientes que asimila a la formación de nuevas células y contenido celular en vez de utilizarlos en la fabricación de pared media.

En lo referente a la composición nutricional, podemos observar que los productos comerciales de *Ulva* spp. presentan grandes variaciones en su contenido en proteínas, macrominerales y oligoelementos, mientras que las especies cultivadas en medios con

altas cargas de nitrato y fosfato presentan contenidos más estables y sustancialmente diferentes. Atendiendo a las diferencias entre especies podemos ver que *U. ohnoi* y *U. rigida* son las que presentan un mayor potencial nutricional debido a su baja proporción de cenizas, alto contenido en proteínas, buena relación peso húmedo/peso seco y peso húmedo/superficie, y su composición de macrominerales y oligoelementos variada y equilibrada. *U. australis* también muestra buenos valores nutricionales, especialmente en la proporción de magnesio, potasio y sodio. *U. fasciata* es la que presenta una composición nutricional más desequilibrada y los peores valores nutricionales, siendo su alto contenido en magnesio la única característica interesante.

En la experiencia de crecimiento vemos que *U. fasciata* y *U. australis* presentan crecimientos con tasas muy variables respecto a las de *U. ohnoi*, especie que tiene un desarrollo más estable. En todos los casos las tasas de crecimiento se encuentran entre el 10 y 20% día⁻¹. Las causas de la variabilidad en las tasas de crecimiento pueden ser muchas (esporulación, fase del ciclo, ritmos circadianos, variaciones de nutrientes, temperatura, pH...), por lo que es difícil buscar una única explicación a este comportamiento.

Los resultados obtenidos en la experiencia del efecto de la luz sobre la tasa de crecimiento indican que: *U. fasciata* posiblemente no tenga su sistema fotosintético saturado a las dosis lumínicas estudiadas, ya que dicha tasa aumenta significativamente al aumentar la dosis lumínica, lo que está en consonancia con su área de distribución fundamentalmente pantropical. Por otra parte *Ulva ohnoi* debe tener su sistema fotosintético prácticamente saturado a las dosis lumínicas más altas, ya que aunque hay un aumento de su tasa de crecimiento al aumentar las mismas, este aumento no es estadísticamente significativo. Algo análogo ocurre con *Ulva australis*, esta especie no muestra un aumento significativo de su tasa de crecimiento al aumentar la dosis lumínica, lo que nos indica que sus sistemas fotosintéticos deben estar también saturados; sin embargo las menores tasas de crecimiento en esta especie comparadas con las de *U. ohnoi* podrían ser debidas a que la temperatura de estudio, $20 \pm 0,2$ °C pudiera ser demasiado elevada por ser una especie de óptimo septentrional.

De las tres especies estudiadas, *U. ohnoi* es la que presenta una mayor tasa de crecimiento media, por lo que se asume que es la especie con mejor eficiencia fotosintética.

Los resultados obtenidos en esta experiencia (5.4) no son equiparables a la experiencia de crecimiento en tanque (5.3), puesto que las condiciones experimentales no son equiparables, principalmente aquellas relacionadas con la temperatura y especialmente con la dosis lumínica, ya que la que reciben los discos en la cámara es muy superior a la que reciben los discos en el cultivo en suspensión en tanque. Los resultados de ambas experiencias de crecimiento reflejan una gran variabilidad en la tasa del mismo. Esta variación posiblemente se deba a múltiples factores como la fase del ciclo de vida (gametófitos vs. esporófitos), la morfología (determinadas morfologías pueden dar una mejor adaptación al régimen hidrodinámico), el estado fisiológico, las variaciones en nutrientes y la relación N:P, la temperatura, el pH, etc.

En ambas experiencias de crecimiento se puede ver que las tres especies estudiadas, *Ulva ohnoi*, *U. fasciata* y *U. australis*, presentan tasas de crecimiento comprendidas entre el 10 y el 20 % día⁻¹. Estas tasas son similares a las observadas en *Ulva lactuca* (Neori *et al.*, 1991), *U. pseudocurvata* (Lüning *et al.*, 2008), *U. prolifera* y *U. linza* (Luo *et al.*, 2012). Estas altas tasas de crecimiento hacen que las especies de *Ulva* tengan un gran potencial para su uso como biofiltro en sistemas de AMTI.

Finalmente se debe indicar que la gran tendencia que tiene *U. rigida* a esporular, lo que dificultó la obtención de datos de crecimiento en este trabajo, pudo ser debida a que se trabajó con esporófitos. En el futuro se debería emplear la fase gametofítica para determinar si la fase del ciclo vital es la razón de esa gran tendencia a reproducirse o es un carácter propio de la especie.

7 Conclusiones

Los resultados de todas las experiencias realizadas indican que las especies de *Ulva* utilizadas presentan unas tasas de crecimiento comprendidas entre el 10 y 20 % dia^{-1} , un alto contenido proteico y en otros nutrientes esenciales, lo que las hace muy adecuadas tanto como biofiltro como por su valor añadido para su empleo en la alimentación animal o humana.

Los estudios realizados en morfología, composición nutricional, productividad en un sistema de cultivo en suspensión en tanque y comportamiento a distintas dosis lumínicas de las cuatro especies ensayadas permiten concluir que *Ulva ohnoi* es la mejor candidata para su aplicación como biofiltro en sistemas de AMTI en recirculación.

A la vista de todos los resultados y considerando la distancia filogenética entre las distintas especies es evidente que dicha distancia no está en absoluto correlacionada con su comportamiento en cultivo o composición química.

Estudios futuros deberán determinar el efecto que puedan tener tanto la fase del ciclo como las condiciones de cultivo (variaciones de pH y temperatura, intensidad lumínica y fotoperíodo, nutrientes) o el estado fisiológico sobre la tasa de crecimiento y sus oscilaciones en estas y otras especies del género *Ulva*.

8 Referencias bibliográficas

- Baamonde S., Baspino I., Barreiro R., and Cremades J. 2007. Is the cryptic alien seaweed *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) widely distributed along European Atlantic coasts?. *Botanica Marina* 50: 267-274.
- Bolton J. J., Robertson-Andersson V. D., Shuuluka D. and Kandjengo L. 2009. Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *Journal of Applied Phycology* 21: 575-583.
- Carrasco F. 2008. Biocauchos que nacen en el mar. Informe de proyecto.
- Cremades J., Bárbara I. and Veiga A. J. 2002. “Algas” In: Proyecto Galicia, Naturaleza, Tomo XLI. *Botánica I*: 384-557. Hércules Ediciones S.A., A Coruña.
- Cruz-Suárez L. E., León A., Peña-Rodríguez A., Rodríguez-Peña G., Moll B., and Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301: 64-68.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, 2014.
- Hernández I., Pérez-Pastor A., Mateo J. J., Megina C. and Vergara J. 2008. Growth dynamics of *Ulva rotundata* (Chlorophyta) in fish farm: Implications for biomitigation at a large scale. *Journal of Phycology* 44: 1080-1089.
- Hiraoka M., Shimada S., Uenosono M. and Masuda M. 2003. A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycological Research* 51: 17-29.
- Hoeksema B. W. and van de Hoek C. 1983. The taxonomy of *Ulva* (Chlorophyceae) from the Coastal Region of Roscoff (Britany, France). *Botanica Marina* 26: 65-86.
- Lawton R. J., Mata L., de Nys R. and Paul N. A. 2013. Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: Selecting target species and strains. *Plos One* 8.
- Liu D., Keesing J. K., Xing Q. and Shi P. 2009. World’s largest macroalga bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China. *Marine Pollution Bulletin* 58: 888-895.
- Liu F., Pang S., Chopin T., Gao S., Shan T., Zhao X. and Li J. 2013. Understanding the recurrent large-scale green tide in the Yellow Sea: Temporal and spatial correlations between multiple geographical, aquacultural and biological factors. *Marine Environmental Research* 83: 38-47.
- Lüning K., Kadel P. and Pang S. 2008. Control of reproduction rhythmicity by environmental and endogenous signals in *Ulva pseudocurvata* (Chlorophyta). *Phycological Society of America* 44: 866-873.

- Luo M. B., Liu F. and Xu Z. L. 2012. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquatic Botany* 100: 18-24.
- Macchiavello J. and Bulboa C. 2014. Nutrient uptake efficiency of *Gracilaria chilensis* and *Ulva lactuca* in an IMTA system with the red abalone *Haliotis rufescens*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 42: 523-533.
- Montingelli M. E., Tedesco S. and Olabi A. G. 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 43: 961-972.
- Mshigeni K. E. and Kajumulo A. A. 1979. Effects of the environment on polymorphism in *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta, Ulvaceae). *Botánica Marina* XXII: 145-148.
- Neori A., Cohen I., and Gordin H. 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents II. Growth rate, yield and C:N ratio. *Botanica Marina* 34: 483-489.
- Neori A., Shpigel M. and Ben-Ezra D. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186: 279-291.
- Nielsen M. M., Bruhn A., Rasmussen M. B., Olesen B., Larsen M. M. and Moller H. B. 2012. Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *Journal of Applied Phycology* 24: 449-458-
- Nobre A. M., Robertson-Andersson D., Neori A. and Sankar K. 2010. Ecological-economic assessment of aquaculture options: Comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture* 306: 116-126.
- Planas M., Pérez-Lorenzo M., Hjelm M., Gram L., Fiksdal I.U., Bergh O. and Pintado J. 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibriosis* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255: 232-333.
- Plaza M., Cifuentes A. and Ibáñez E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19: 31-39.
- Robertson-Andersson D., Potgieter M., Hansen J., Bolton J. J., Troell M., Anderson R. J., Halling C. and Probyn T. 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 20: 579-595.
- Salvesen I., Skjermo J. and Vadstein O. 1999. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/k strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture* 175: 337-350.
- Valente L. M. P., Gouveia A., Rema P., Matos J., Gomes E. F. and 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.

Desarrollo de cultivos de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de AMTI

- Vizcaíno A. J., Mendes S. I., Varela J. L., Ruiz-Jarabo I., Rico R., Figueroa F. L., Abdala R., Moriñigo M. A., Mancera J. M. and Alarcón F. J. 2015. Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research* 1-15.
- Wichard T., Charrier B., Mineur F., Bothwell J. H., De Clerck O. and Coates J. C. 2015. The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. *Frontiers in Plant Science* 6: 72.
- Wichard T. 2015. Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). *Frontiers in Plant Science* 6: 86.
- Womersley H. B. S. 1984. The marine benthic flora of Southern Australia, Part I. *Handbook of the Flora & Fauna of South Australia*. D. J. Woolman, Government Printer, South Australia.