

# Optimización del cultivo en tanque de distintas especies de “lechuga de mar” (*Ulva* spp., Chlorophyta)



**Autor:** Alberto Couce Rodríguez

**Tutor:** Javier Cremades Ugarte

## Contenido

Portada .....	0
Resumen .....	2
Resumo .....	2
Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Materiales y metodología .....	5
Recogida de muestras, caracterización de las especies. ....	5
Caracterización morfológica .....	6
Análisis genético y composición química .....	6
Medio y régimen de cultivo.....	7
Estudio del crecimiento en tanques .....	8
Determinación del rango óptimo de luz .....	9
Resultados.....	11
Caracterización morfológica .....	11
Análisis de composición química.....	14
<i>Ulva ohnoi</i> .....	15
<i>Ulva fasciata</i> .....	16
<i>Ulva rigida</i> .....	17
<i>Ulva australis</i> .....	18
Estudio del crecimiento en tanques .....	19
Determinación del rango óptimo de luz .....	20
Comparativa de las tres especies estudiadas.....	21
Conclusiones.....	21
Referencias bibliográficas .....	22

## Resumen

En el presente trabajo se recogen algunas técnicas para estudiar las diferencias existentes durante el proceso de cultivo de 4 especies diferentes del género *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) y así buscar la manera de optimizarlo para las diversas especies de este género. Para ello, se estudiaron características morfológico-anatómicas observables, diferencias genéticas, y características fisiológicas, con el fin de observar distintas respuestas a las diversas condiciones de cultivo a las que fueron sometidas. Las características morfológicas fueron recopiladas en este trabajo a partir de observaciones propias, revisiones bibliográficas, y las características fisiológicas estudiadas mediante diversas experiencias llevadas a cabo en laboratorio. Todo esto fue realizado con el fin de esclarecer una serie de patrones que den lugar a un método de cultivo estable, así como sus requerimientos pertinentes con el fin de optimizar el cultivo de estas especies en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI).

## Resumo

No presente traballo recóllense algunhas técnicas para estudar as diferenzas existentes durante o proceso de cultivo de 4 especies diferentes do xénero *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) Linnaeus e así buscar a maneira de optimizalo para as diversas especies deste xénero. Para isto, estudiáronse características morfolóxico-anatómicas observables, diferenzas xenéticas e características fisiolóxicas co fin de observar distintas respostas ás diversas condicións de cultivo ás que foron sometidas. As características morfolóxicas foron recopiladas neste traballo a partir de observacións propias, revisións bibliográficas e as características fisiolóxicas estudiadas mediante diversas experiencias levadas a cabo no laboratorio. Todo isto foi realizado co gallo de esclarecer patróns que den lugar a un método de cultivo estable, así como os seus requerimientos pertinentes coa finalidade de optimizar os cultivos destas especies en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI).

## Introducción

Las especies marinas del género *Ulva* Linneus a menudo sobresalen como individuos localmente dominantes en las zonas submareales e intermareales rocosas a lo largo de todo el mundo (Kirkendale *et al.*, 2013). Este género, a menudo, ocupa también zonas de estuario o rías donde la mezcla de aguas da lugar a una calidad del medio que favorece el desarrollo de *Ulva* sobre el de otras especies más estenohalinas. Las especies de este género, por su carácter nitrófilo y fotófilo, y su capacidad de vida libre y reproducción por fragmentación están a menudo ligadas a procesos de “mareas verdes” y otros *blooms* algales (Hiraoka *et al.*, 2003a, 2004; Kirkendale *et al.*, 2013).

La tolerancia que presentan las especies de *Ulva* a un amplio rango de condiciones ambientales y su carácter oportunista que las hace muy frecuentes en las comunidades del *fouling* hace que el tráfico marítimo y la acuicultura sean unos importantes vectores de dispersión de estas especies (Mineur *et al.*, 2007), lo que ha dado lugar a un aumento cada vez mayor de la aparición de especies de este género en áreas muy distantes de su presunta distribución original (Heesch *et al.*, 2009).

La detección e identificación de especies alóctonas del género *Ulva* ha probado ser una difícil tarea (Baamonde López *et al.*, 2007; Heesch *et al.*, 2009) y a menudo estudiada en base a unos pocos caracteres morfológicos y anatómicos utilizados para la discriminación entre especies (Bliding 1968; Hoeksema & van de Hoek 1983; Koeman 1985; Baamonde López *et al.*, 2007). Por ejemplo, las sencillas láminas distromáticas o tubulares de las especies de este género proporcionan muy pocos caracteres taxonómicos: forma y grosor del talo, presencia de espinas marginales macro o microscópicas, tamaño y disposición de las células en visión superficial, disposición de los cloroplastos y número de pirenoides (Bliding 1968; Koeman & van den Hoek 1981). Además, según los trabajos de Steffensen (1976), Mshigeni & Kajumulo (1979), Tanner (1986) y Malta *et al.*, (1999) las variables ambientales pueden alterar sustancialmente estos caracteres morfológicos, añadiendo así, un mayor nivel de dificultad a la hora de estimar el valor taxonómico de los mismos.

A lo largo de las últimas décadas, esta dificultad para la identificación y caracterización de las diversas especies del género ha dado lugar a un aumento en el uso de técnicas moleculares (Baamonde López *et al.*, 2007). Dichas técnicas, permiten desde la mera

caracterización e identificación de las diferentes especies, hasta realizar análisis filogenéticos que permitan discernir en qué medida las diferentes especies están relacionadas genética y evolutivamente.

Por otra parte el género *Ulva* ha suscitado interés en las últimas décadas como organismo útil para su empleo en técnicas de biorremediación ambiental y por el creciente valor añadido de la biomasa obtenida especialmente mediante técnicas de cultivo integrado. En este sentido es especialmente importante el empleo de la biomasa de *Ulva* en la alimentación animal y humana debido a sus buenas cualidades nutricionales (Bolton *et al.*, 2009; Taboada *et al.*, 2010). En la actualidad son cada vez más frecuentes las investigaciones encaminadas a estudiar los requerimientos de cultivo de estas especies para su integración en sistemas multitróficos con otros organismos como orejas de mar, langostinos, etc. (Robertson *et al.*, 2008, Bolton *et al.*, 2009, Cruz-Suárez *et al.*, 2010); hasta el punto de que (Bolton *et al.*, 2009) incluyen un análisis DAFO sobre el potencial uso de *Ulva spp.* en estos sistemas de cultivo.

Gracias a los trabajos de Robertson *et al.* (2008), Bolton *et al.* (2009) y Cruz-Suárez *et al.* (2010) han salido a la luz las ventajas de la integración del cultivo de *Ulva spp.* en sistemas de cultivo de otros organismos ya de por sí rentables económicamente. Esta integración trae como principal ventaja principal el incremento de la calidad tanto del producto principal de cultivo como de las condiciones del sistema empleado para su producción. Entre las ventajas previamente mencionadas destacan: (i) la reducción del gasto energético derivado del cultivo debido a un aumento de la temperatura del agua recirculada, (ii) el control por parte de *Ulva spp.* del crecimiento de la flora microbiana asociada a estos sistemas en el caso de los cultivos de abalón (*Haliotis midae*), (iii) una mejora en la calidad del producto debido a la disminución de la concentración de lípidos del exoesqueleto y a un aumento, tanto en la tasa de crecimiento como en la concentración proteica en el caso de langostino (*Penaeus vannamei*) y (iv) una reducción en los problemas ligados al cultivo no integrado de la propia *Ulva*, como la reducción de la turbidez del agua y de la cantidad de organismos epífitos (en especial *Myrionema strangulans*), que suponen pérdidas en el rendimiento de los sistemas de cultivo actuales. En cuanto a las desventajas, se destaca ante todo, el hecho de que (i) *Ulva spp.* Todavía en muchos casos no es recogida para su venta y, por tanto, su producción no genera un beneficio económico directo y (ii) el cultivo de esta especie conlleva un mantenimiento y

cuidado que no están contemplados en los planes de cultivo monoespecíficos empleados anteriormente, lo que genera el rechazo de algunos productores (Bolton *et al.*, 2009).

## Objetivos

- Conocer las características morfológicas, comportamiento en cultivo y composición nutricional de cuatro especies de *Ulva* spp. frecuentes en las costas de la Península Ibérica y que previamente han sido seleccionadas para su posible uso en sistemas de cultivo multitróficos integrado con peces planos (*Solea senegalensis*) en recirculación de agua. Estas especies son: *Ulva australis* Areschoug, *U. fasciata* Delile, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada y *U. rigida* C. Agardh.
- Estimar el rango de luz óptimo para el desarrollo de cada una de las cuatro especies de *Ulva*, así como su tasa de crecimiento asociada a dichas condiciones de luz.
- Proponer en base a todas las experiencias realizadas en el laboratorio y de los datos disponibles la especie de elección para actuar como biofiltro en un sistema acuícola multitrófico integrado en recirculación con peces.

## Materiales y metodología

### Recogida de muestras, caracterización de las especies.

El material de estudio de este trabajo fue obtenido de su recolección en diferentes puntos de la Península Ibérica. Las muestras de *Ulva rigida* y *U. australis* fueron recogidas en Cambados (Pontevedra), concretamente en el Puerto de Tragove (42°31'07.7"N 8°49'07.1"W). Las muestras de *U. ohnoi* fueron recogidas en San Fernando, Cádiz (36°28'39.4"N 6°12'52.4"W) y llevadas al laboratorio en menos de 48 horas. Las muestras de *U. fasciata* fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Barcelona, asociado al proyecto integRAS y llevadas al laboratorio en un período de 48 horas. Las muestras fueron llevadas al laboratorio del grupo BioCost en las instalaciones del centro de investigaciones científicas avanzadas (CICA) para su manipulación, conservación y estudio, con la mayor brevedad posible tras su recolección.

## **Caracterización morfológica**

Para la caracterización morfológica de las distintas especies de *Ulva* se realizó, en primer lugar, una comparación de los caracteres morfológicos distinguibles a simple vista. Se atendió a caracteres como: color, consistencia, márgenes, presencia y localización de perforaciones, etc. Se continuó con un análisis de los bordes microscópicos con la ayuda de una lupa de laboratorio Nikon SMZ-1 para observar la presencia de denticulaciones y morfología basal. Por último se realizó la observación de caracteres microscópicos como el grosor de lámina en las zonas basales y marginales del talo y forma de la células en visión transversal, grosor de las paredes celulares y de la lámina media, disposición, tamaño y ordenación celular en visión superficial, ubicación de los plastos en el citoplasma y número de pirenoides.

Para la caracterización de las especies, se utilizaron además de los métodos previamente descritos, análisis genéticos adicionales con el fin de confirmar las identificaciones: Estos métodos serán descritos más adelante.

Tanto para la realización del análisis microscópico comparado como para calcular la relación peso húmedo/peso seco, y peso húmedo/unidad de superficie, se utilizaron de cada especie 8 réplicas. Se consultó también la relación filogenética de las cuatro especies estudiadas para conocer su proximidad genética y comprobar si está relacionada con su similitud taxonómica.

## **Análisis genético y composición química**

Los datos utilizados para el análisis de valor nutricional fueron proporcionados por el grupo de investigación del Departamento de Biotecnología e Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad Politécnica de Barcelona asociado al proyecto de investigación integRAS.

El mismo grupo proporcionó datos sobre el valor y los contenidos nutricionales en 100g de materia seca de las láminas de *U. fasciata*, *U. ohnoi*, *U. rigida* y *U. australis* cultivadas en el laboratorio de BioCost en el CICA. Entre dichos valores se estudia el contenido en proteínas y cenizas así como el contenido de varios macro y micronutrientes.

Los análisis genéticos fueron llevados a cabo en los servicios centrales de la UDC por medio de la empresa Allgenetics. Las extracciones de ADN fueron realizadas mediante el uso de un kit de extracción de ADN NZY Plant/Fungi gDNA Isolation kit (NZYtech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un control negativo sin muestra fue utilizado como control para comprobar si había contaminación. Para realizar las PCRs se utilizaron se usó el par de primers RH1 (ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC) y 1285r (AAT TCA AAT TTA ATT TCT TTC C).

Los productos de la PCR obtenidos fueron precipitados en un gel de agarosa 1% y mostrados bajo condiciones de luz UV para contrastar su amplificación. Las muestras fueron identificadas a nivel de especie comparando las secuencias obtenidas con los registros disponibles en bases de datos públicas, utilizando Barcode Of Life Data system (BOLD).

### **Medio y régimen de cultivo**

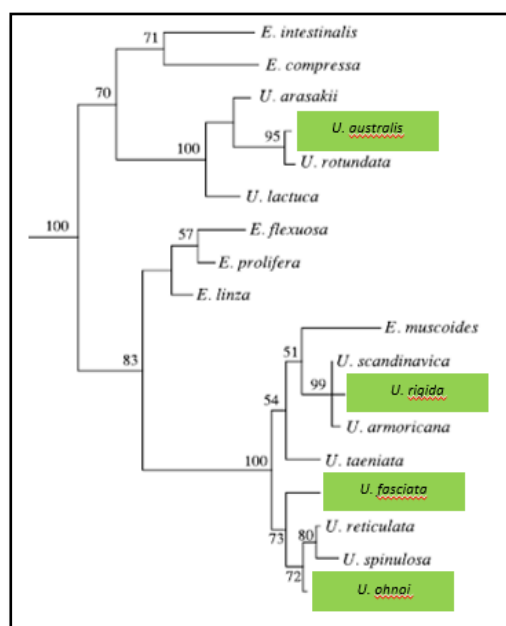
Las muestras fueron cultivadas en diferentes tanques de sección circular de 200 L de volumen, 60 cm de diámetro en la parte superior (o boca) del tanque y 51 cm de máxima profundidad. En primer lugar las algas fueron sometidas a un lavado con agua dulce con el fin de eliminar organismos epífitos que pudiesen suponer una amenaza para mantener las condiciones deseadas de cultivo. El cultivo consiste en meter las láminas de las algas en 100 litros de agua de mar filtrada con un filtro de cartucho (40µm) y aplicar un régimen de nutrientes constituido por: (i) 12 mg de  $\text{NO}_3\text{Na}$ , (ii) 0,3 mg de  $\text{P}_0_4\text{H}_2\text{Na}$  y (iii) 50 ml de solución de oligoelementos. Esta solución será la misma durante todo el experimento y a su vez está compuesta de: (i) 14g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (ii) 14g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (iii) 16 g de  $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , (iv) 0,5 g de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (v) 0,2 g de  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (vi) 0,5 g de  $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 1 L de agua destilada. Los valores para la concentración nutricional (N y P) fueron seleccionadas en base a la riqueza en estos elementos que suele tener el agua de cultivo de los sistemas de cultivo de *Solea senegalensis* en sistemas de recirculación (aprox. 20 ppm de N y 0,5 ppm de  $\text{P L}^{-1}$ ), estos valores fueron proporcionados por el Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Barcelona.



Para cada tanque se utilizó una lámpara de 41 cm de diámetro que porta una bombilla Pilux 230 V de 85 W e 6400 °K ecSAVER, cuya altura y distancia del tanque es ajustable. Esta lámpara estaba programada para proporcionar un fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad. Dichos tanques se conectan a un sistema de bombeo de aire con el fin de proporcionar una aireación constante a los cultivos realizados, favoreciendo así la hidrodinámica del tanque, y por consiguiente, la eficiencia fotosintética de los cultivos, homogeneizando a su vez, la cantidad de tiempo disponible que tienen las láminas para captar la mayor cantidad de energía lumínica posible facilitada por el sistema.

### Estudio del crecimiento en tanques

Para el estudio de la tasa de crecimiento en condiciones de cultivo se inocularon discos troquelados de 2 cm de diámetro. Los discos fueron troquelados con un sacabocados metálico con una sección de 2 cm de diámetro. Se utilizaron 100 discos de cada especie que se pusieron en cuatro tanques independientes y fueron cultivados durante 3 semanas. Para obtener el peso húmedo inicial los discos fueron escurridos mediante un escurridor manual, secados con la ayuda de papel de filtro para eliminar la película superficial de agua y posteriormente pesados con una báscula RADWAG PS 600.R2. Los tanques de cultivo contenían 100 L de agua de mar filtrada (40 µm), enriquecida en nutrientes y sometida a la intensidad lumínica y fotoperíodo de la forma anteriormente descrita. La pérdida de agua por efecto de la evaporación se compensó a diario con la adición proporcional de agua dulce.



**Figura 1:** Relación filogenética en el género *Ulva*. Tomada de Hiraoka *et al.*, (2003a).

Los muestreos se realizaron cada 8 días mediante el escurrido y secado superficial de 20 discos seleccionados al azar de cada tanque, siguiendo el mismo método anteriormente citado, para así conocer su peso escurrido ( $P_t$ ) para un tiempo dado. Posteriormente al pesaje se comparaban los pesos finales para todas las especies involucradas en la experiencia. En el muestreo final se seleccionaron para cada especie los 10 discos más

próximos a la mediana en peso, con el fin de evitar el efecto de valores atípicos obtenidos. Los organismos epífitos derivados de la manipulación e idiosincrasia del sistema de cultivo fueron controlados mediante la limpieza mecánica de las láminas y sus sucesivos lavados en agua dulce. Los datos obtenidos fueron



**Figura 2:** Montaje y sistema de crecimiento en cámara de cultivo para la determinación del rango óptimo de luz.

empleados en el cálculo de la tasa de crecimiento y la productividad (Gráficas 7 y 9 respectivamente).

### **Determinación del rango óptimo de luz**

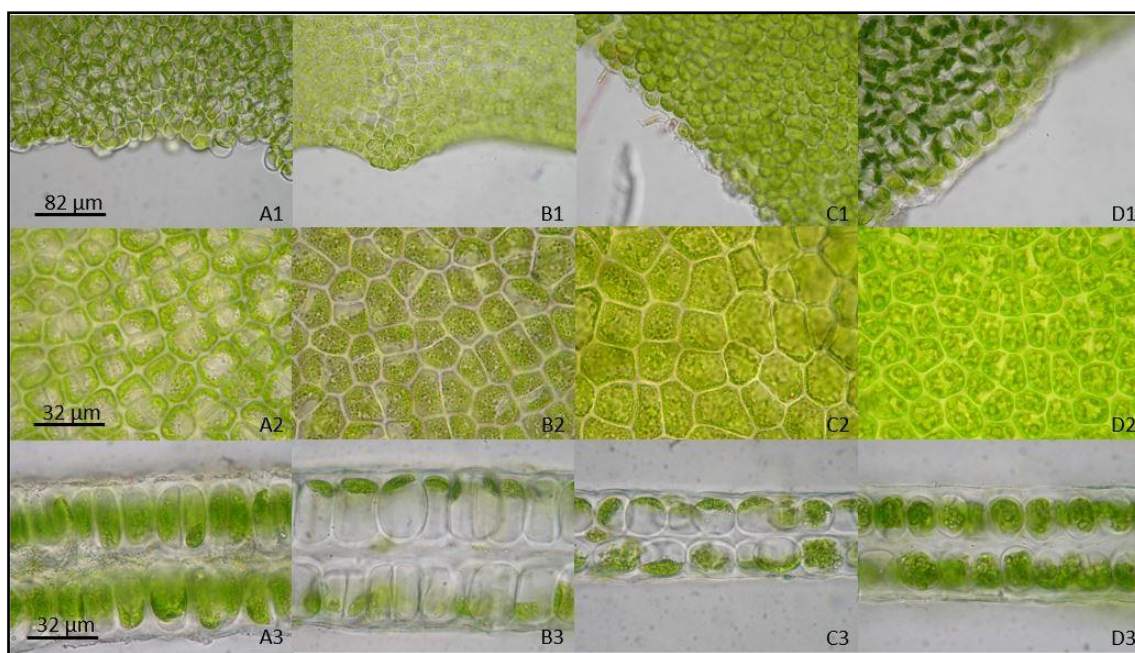
Para el cálculo de la tasa óptima de luz se realizaron varias experiencias en las que se usaron 32 discos de 2 cm de diámetro, tomados con un sacabocados de las zonas marginales de las láminas de las distintas especies de *Ulva*. Estos discos se cultivaban individualmente en duquesas de plástico de 50 ml con 20 ml de medio de incubación. Los discos eran pesados previamente al proceso de incubación para conocer su peso inicial ( $P_0$ ). El medio de incubación estaba compuesto de: (i) 3,6 L de  $H_2O_{sal}$ , (ii) 0,4 L de  $H_2O_{dulce}$ , (iii) 0,48 g de  $NO_3Na$ , (iv) 0,01 g de  $P_0_4H_2Na$  y (v) 2 ml de solución de oligoelementos. El agua total del medio de cultivo se esteriliza mediante un proceso de tinalización antes de la adición del resto de nutrientes al medio de cultivo. El proceso conocido como tinalización consiste en la esterilización por medio del calentamiento discontinuo de una muestra con el fin de eliminar tanto formas vegetativas como esporas de resistencia. Para ello se eleva su temperatura con la ayuda de una placa calefactora hasta alcanzar los 100 °C y se deja reposar 24 h para, pasado ese tiempo, volver a elevar su temperatura hasta los 100 °C aproximadamente y así ir disminuyendo su temperatura paulatinamente y eliminando con cada paso las formas de resistencia que puedan haber sobrevivido.

Los 32 discos fueron incubados durante una semana en 4 grupos de 8 duquesas sometidos a 4 niveles diferentes de luz (un grupo para cada nivel utilizado), proporcionados por la ayuda de mallas de sombreo. Gracias al pesado inicial de numerosos discos se pudo asignar la misma media muestral para cada grupo, mediante la selección de los discos más adecuados. Los 4 niveles de luz fueron: 300, 170, 100 y 50 micromoles  $m^{-2} s^{-1}$ . Las duquesas del primer nivel (L) tenían exposición directa a la luz, las del segundo nivel (S) fueron cubiertas por una malla, las duquesas del tercer nivel (O) por dos mallas, y las del tercer nivel (N) fueron cubiertas por 3 mallas. Las duquesas se situaron de forma aleatoria sobre una base de cartón revestida de cartulina negra en su interior con el fin de evitar falsos resultados por reflectancia. La base con las duquesas se introdujo en una cámara Liebherr model GKv 57 a 20 °C durante 7 días sobre un agitador modelo orbital shaker – DOSM, programado para proporcionar una agitación constante a 50 rpm. El medio de cultivo de las duquesas fue renovado cada 24 horas desde el inicio hasta la finalización de la experiencia. El muestreo final consistió en el pesado de los discos tras 8 días de cultivo ( $P_t$ ).

Para estudiar las posibles diferencias estadísticas entre las distintas especies y niveles de luz (ANOVA de un factor) se usó el programa para análisis estadístico R, junto con su librería R commander. Para comprobar la calidad de los resultados estadísticos se llevaron a cabo distintos análisis: (i) test de Breusch-Pagan (homogeneidad de datos), (ii) test de Durbin-Watson (autocorrelación y aleatoriedad), y (iii) test de Bonferroni (análisis de resultados atípicos).

## Resultados

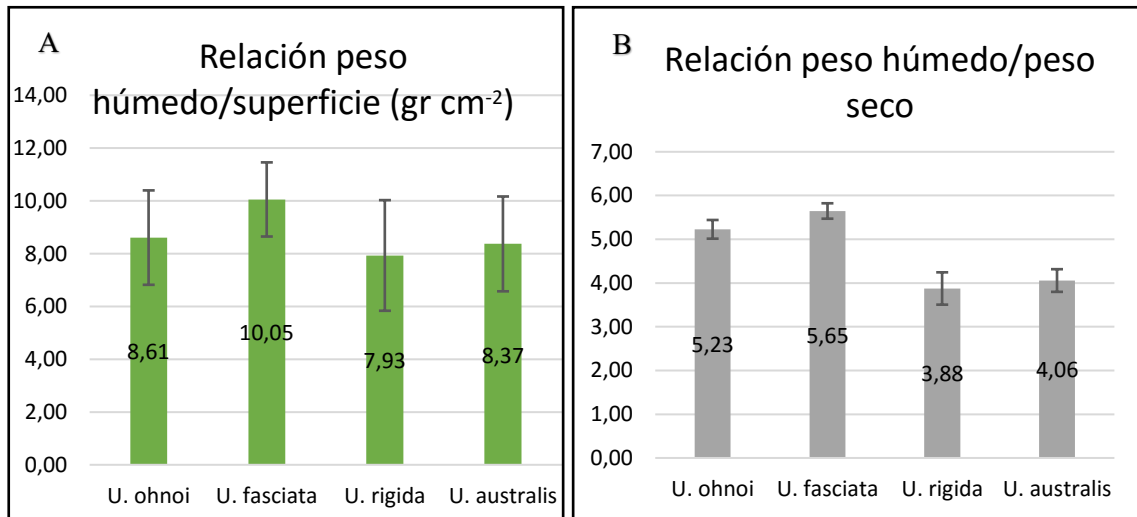
### Caracterización morfológica



**Ilustración 3:** Vista superficial del borde, vista superficial y corte transversal de la sección apical de *Ulva australis*, *U. fasciata*, *U. ohnoi* y *U. rigida*, respectivamente.

Tras el estudio de caracterización morfológica se encontraron varias diferencias entre especies, atendiendo a los siguientes caracteres taxonómicos (Tabla 1): Color, textura, margen, perforaciones, borde microscópico, ancho corte fino, ancho corte grueso, número de pirenoides, grosor de la lámina y grosor de la lámina media. Además también se recogen la longitud (L en la tabla 1) y anchura (A en la tabla 1) de las células observadas en visión superficial, en función de las medidas tomadas en laboratorio (Ilustración 3). También se observaron caracteres morfológicos adquiridos a lo largo del proceso de cultivo que en muchos casos no corresponden con las características de las especies procedentes del medio natural, principalmente modificaciones de las zonas marginales de las láminas (seguramente por el roce entre ellas), mayor frecuencia de perforaciones y variaciones de los tamaños celulares y del grosor de los talos.

Se analizaron también las relaciones de peso húmedo/peso seco y de peso húmedo/unidad de superficie (Gráfica 1). Como se puede ver en dicha gráfica *U. fasciata* es la especie que tiene las mayores relaciones, esto nos revela que es la que posee láminas más gruesas y con mayor proporción de agua, por lo que su cultivo es el de menor rendimiento en materia seca. Por el otro lado *U. rigida* es la que presenta las menores relaciones presenta, por lo que es la especie con mayor rendimiento en materia seca.



**Gráfica 1:** (A) Relaciones Peso húmedo/Peso seco (B) Peso húmedo/cm<sup>2</sup>

**Tabla 1:** Descripciones morfológicas de cuatro especies de *Ulva* cultivadas mediante suspensión en tanque.

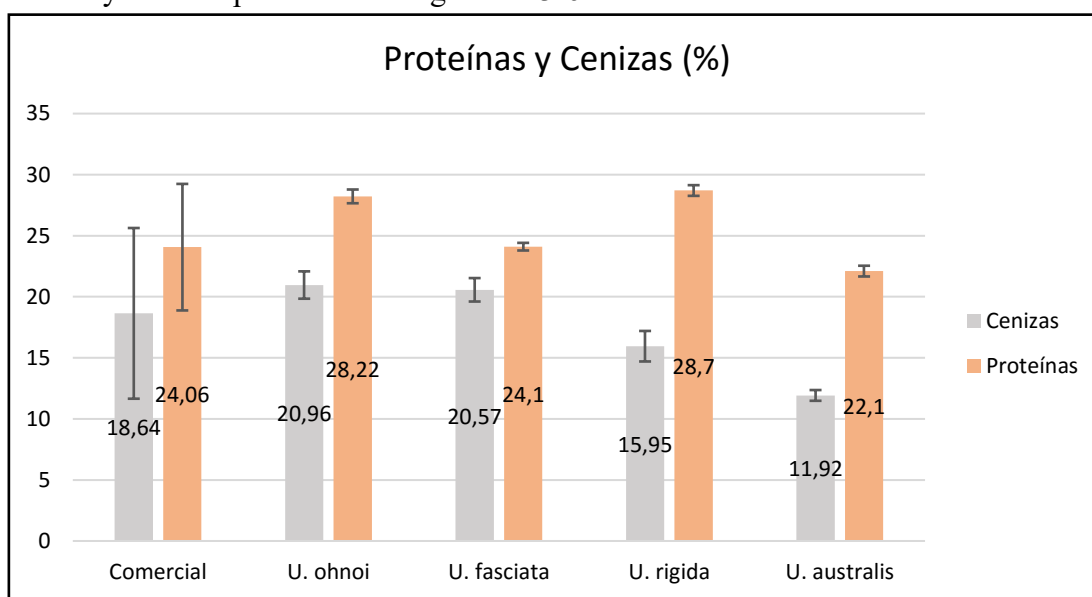
L) largo celular; A) ancho celular.

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

## Análisis de composición química

Los análisis de valor nutricional proporcionaron resultados acerca de la composición de cada una de las especies de estudio destacándose los resultados de contenido de cenizas y contenido de proteínas observables en la gráfica 2.

Además se observaron también diferencias en la cantidad de macrominerales, microminerales y metales pesados presentes en cada una de las especies de *Ulva* cultivadas en este trabajo. Estos resultados se exponen en la tabla 2 y las gráficas de interés y son comparables en las gráficas 3-6.



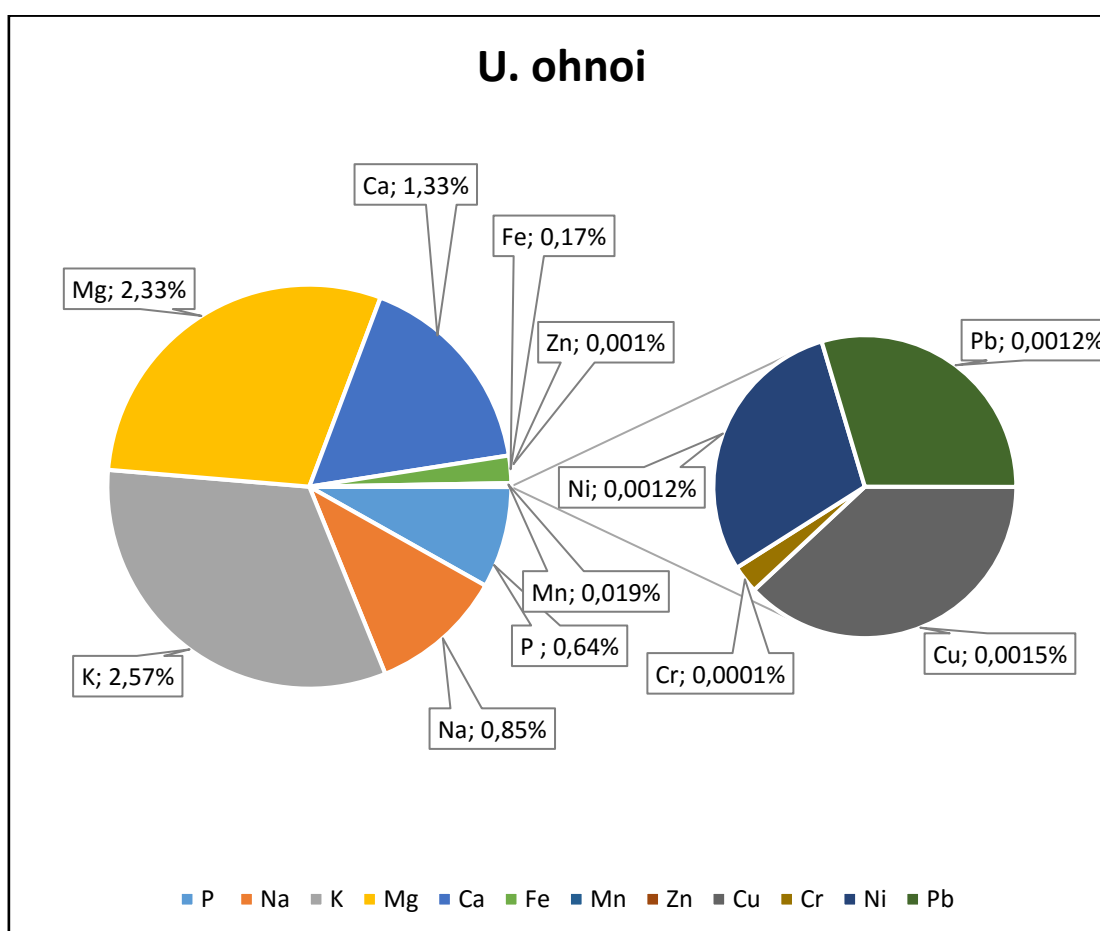
**Gráfica 2:** Relación y cantidad de cenizas y proteínas en las cuatro especies seleccionadas de *Ulva*.

**Tabla 2:** Macrominerales, microminerales y metales pesados en las cuatro especies seleccionadas de *Ulva*.

(mg/g)	Comercial	<i>U. ohnoi</i>	<i>U. fasciata</i>	<i>U. rigida</i>	<i>U. australis</i>
P	171,7 0,17%	643,9 0,64%	181,4 0,18%	427,9 0,43%	96,9 0,10%
Na	462,0 0,46%	848,73 0,85%	608,37 0,61%	750,06 0,75%	1201 1,20%
K	1355 1,36%	2573,0 2,57%	2620,3 2,62%	1709,3 1,71%	1466 1,47%
Mg	2839 2,84%	2329,9 2,33%	3440,2 3,44%	2062,5 2,06%	1390 1,39%
Ca	1311 1,31%	1331,3 1,33%	1194,67 1,19%	926,52 0,93%	548 0,55%
Fe	52 0,05%	173,4 0,17%	58,1 0,06%	105,69 0,11%	52,4 0,05%
Mn	1,46 0,001%	18,89 0,019%	1,36 0,001%	9,14 0,009%	0,71 0,001%
Zn	1,51 0,002%	1,28 0,001%	1,37 0,001%	1,03 0,001%	1,54 0,002%
Cu	0,87 0,0009%	1,54 0,0015%	1,56 0,0016%	1,76 0,0018%	0,6 0,0006%
Cr	0 0,0000%	0,12 0,0001%	0 0,0000%	0,23 0,0002%	0 0,0000%
Ni	0,26 0,0003%	1,19 0,0012%	0 0,0000%	0,67 0,0007%	2,14 0,0021%
Pb	0 0,0000%	1,2 0,0012%	0,94 0,0009%	0,65 0,0007%	0,69 0,0007%

## *Ulva ohnoi*

*Ulva ohnoi* presentó uno de los mayores valores de porcentaje de proteína (25-29 %) para 100 g de materia seca, aunque también una elevada cantidad de ceniza. Además fue la que mayor contenido en calcio presentaba de las cuatro especies (en torno a 1,33%). En torno al 0,0040% de su composición está constituida de metales pesados. Entre ellos se observó que la mayor concentración de plomo también pertenece a esta especie, alcanzando el 0,0012%.

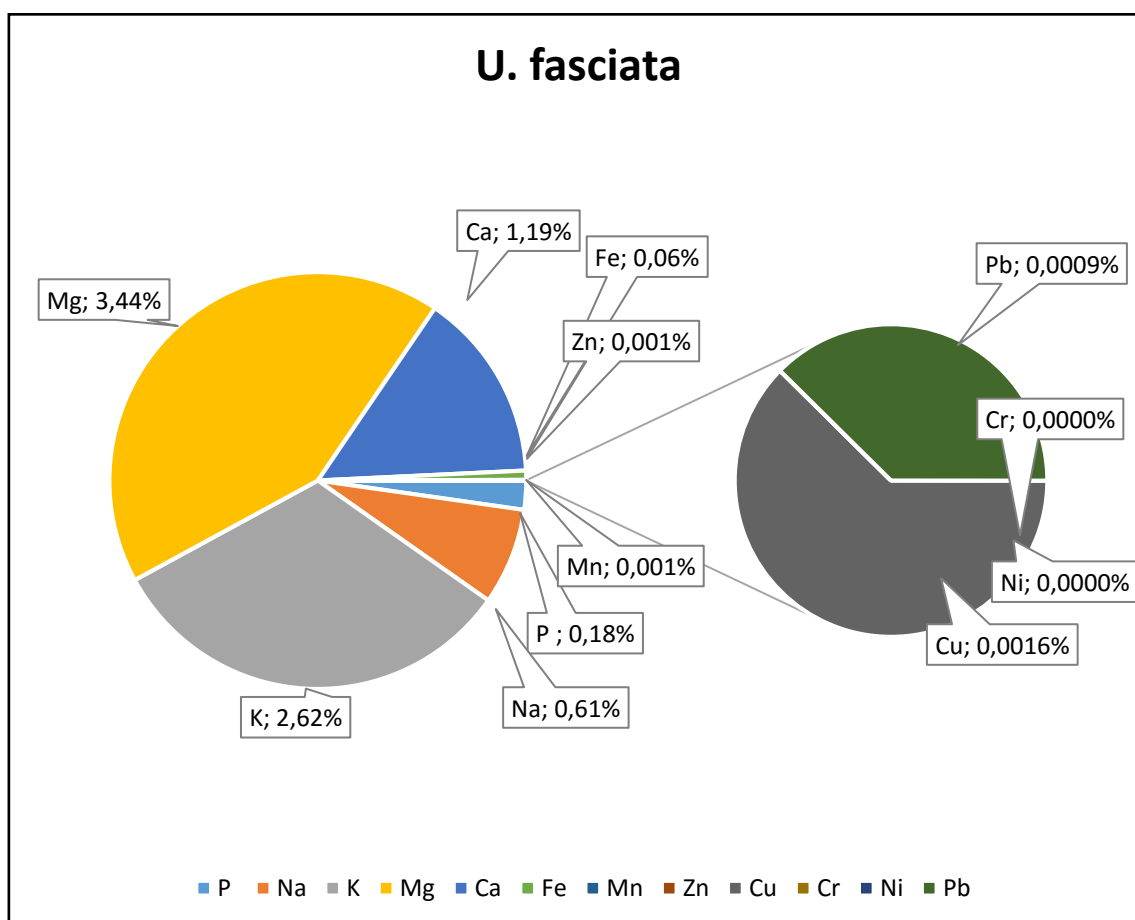


**Gráfica 3:** Macro y micronutrientes en 100g de peso seco de *Ulva ohnoi*.



### *Ulva fasciata*

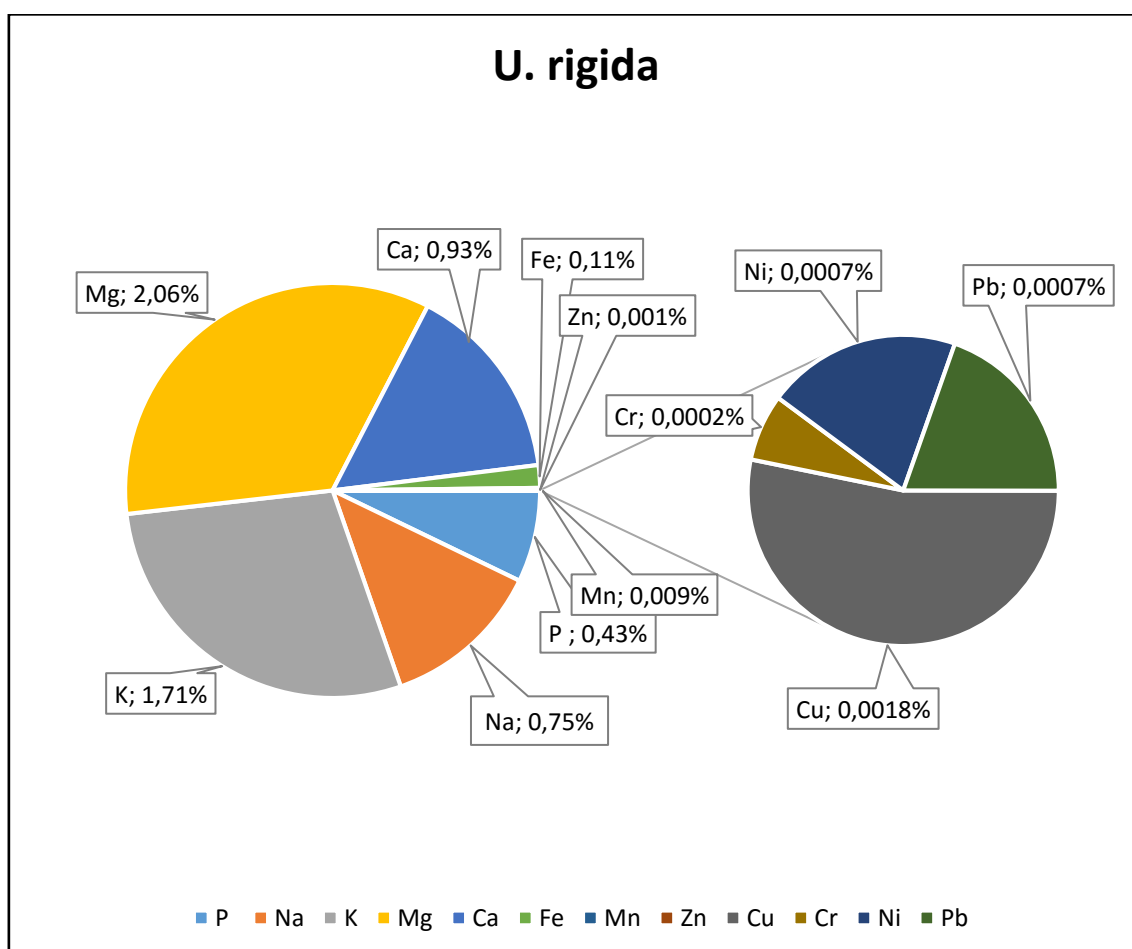
*U. fasciata* presentó un contenido en proteínas inferior a aquellos valores obtenidos por *U. ohnoi* y *U. rigida* y dicho valor está en torno al 24-25%. Además fue la especie que mayor contenido de magnesio presentó con mucha diferencia, alcanzando un valor del 3,44%. Además presentó una cantidad total de metales pesados con un porcentaje del 0,0025%.



**Gráfica 4:** Macro y micronutrientes en 100g de peso seco de *Ulva fasciata*.

## *Ulva rigida*

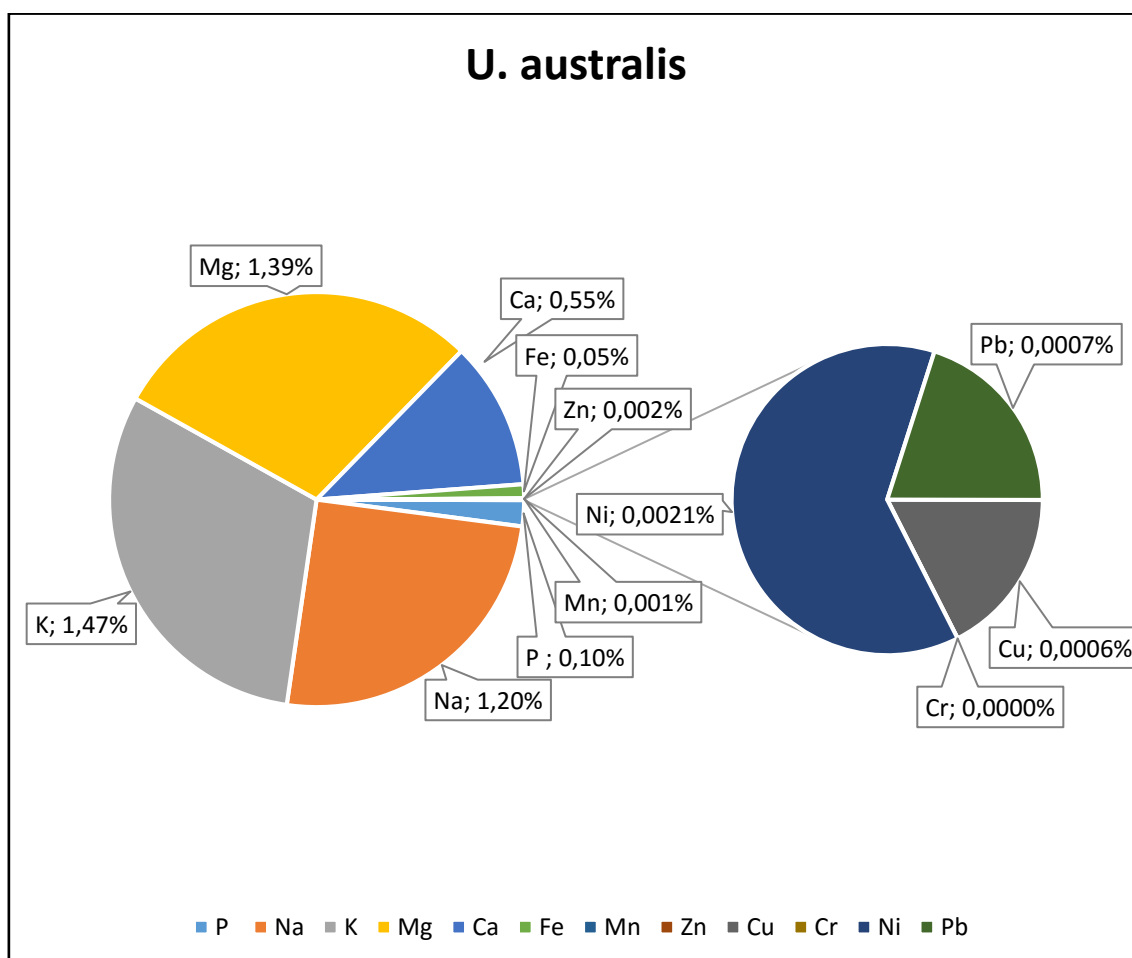
*U. rigida* presentó un porcentaje de contenido de proteínas similar al obtenido para *U. ohnoi* y, por tanto, siendo uno de los más elevados. Sin embargo, a diferencia de *U. ohnoi*, *U. rigida* presentó un contenido en cenizas un 5% inferior y presenta valores superiores para el cobre. Por otra parte *U. rigida* presenta el contenido más alto en cromo de las cuatro especies. El total de metales pesados equivale al 0,0032 % de su peso.



**Gráfica 5:** Macro y micronutrientes en 100g de peso seco de *Ulva rigida*.

## *Ulva australis*

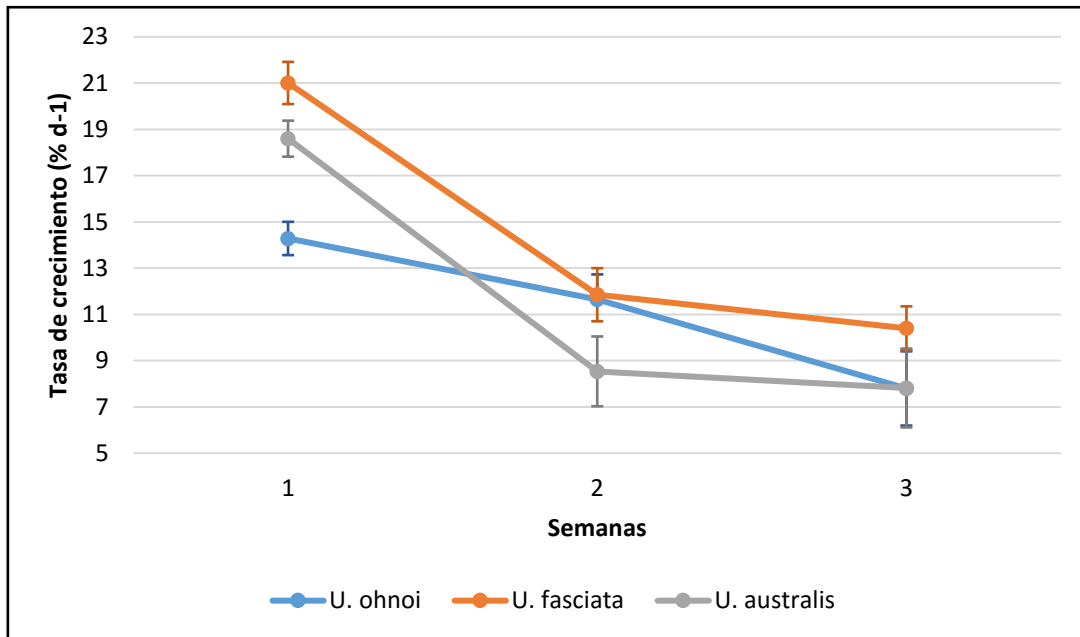
*U. australis* es la especie que ha presentado un menor contenido en proteínas, un 22% de media. Por otra parte es la especie con menor contenido de cenizas alcanzando un valor del 11,92 %. Desde el punto de vista de los macrominerales es la especie que muestra un mayor contenido en sodio, alcanzando el valor 1,20% y, en cuanto a los oligoelementos es la especie con mayor contenido en níquel, alcanzando aquí un valor del 0,0021 %. El contenido en metales pesados ronda el 0,0034%.



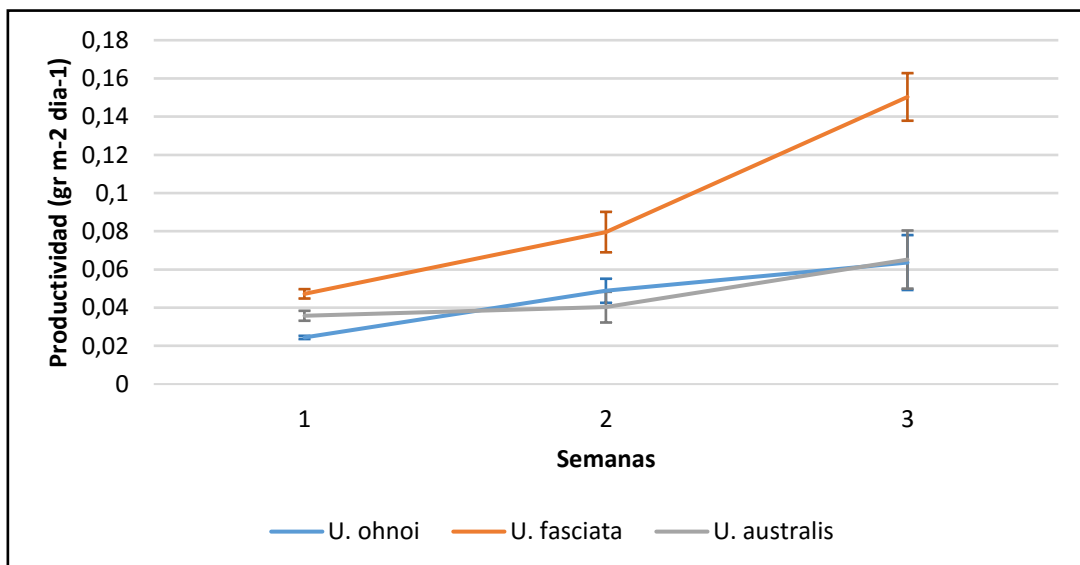
**Gráfico 6:** Macro y micronutrientes en 100g de peso seco de *Ulva australis*.

## Estudio del crecimiento en tanques

Los discos fueron cultivados a lo largo de 21 días, y pesados cada 8 días obteniendo los siguientes resultados. *U. rigida* fue descartada del experimento debido que sucedió un evento de esporulación, lo que provocó una notable pérdida de biomasa y disminución del tamaño de los discos, haciendo que los resultados obtenidos no sean representativos de su desarrollo vegetativo.



**Gráfica 7:** Evolución de la tasa de crecimiento por semana en fases tempranas del cultivo de 3 de las especies de *Ulva* ensayadas.



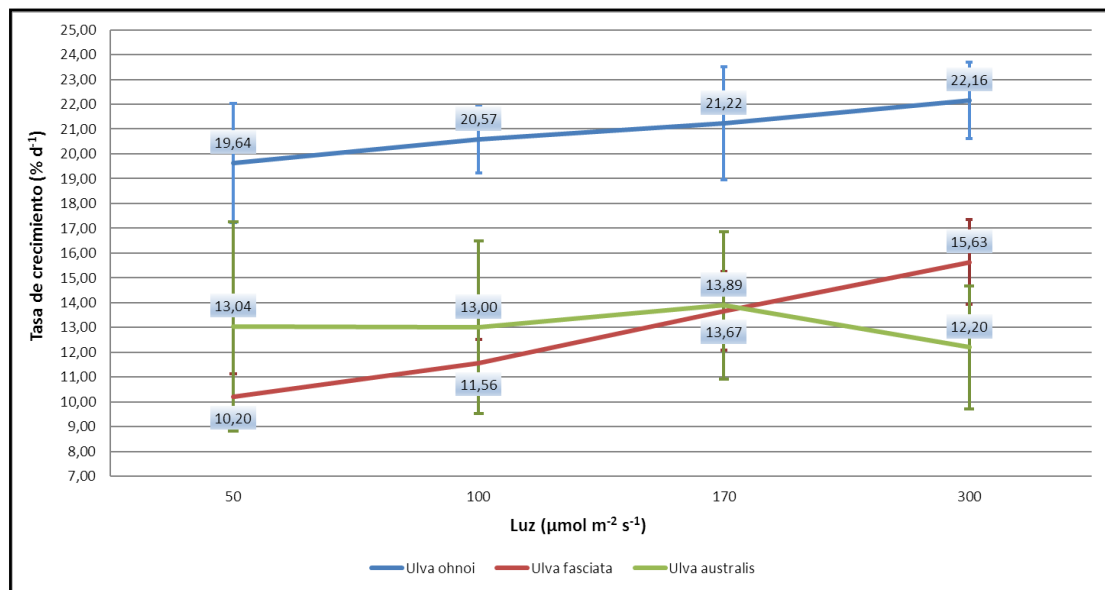
**Gráfica 8:** Productividad semanal en fases tempranas del cultivo de 3 de las especies de *Ulva* ensayadas.

Las tasas de crecimiento observadas se encontraron entre valores del 5 al 20% d<sup>-1</sup> (Gráfica 7), se observa aun así que *U.ohnoi* posee los valores más estables durante las primeras tres semanas y un crecimiento más progresivo.

### Determinación del rango óptimo de luz

En la segunda experiencia en cámara para valorar la influencia de la intensidad lumínica en el desarrollo de las distintas especies se observaron 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 (Gráfica 9). *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.

Como en la experiencia anterior 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.



**Gráfica 9:** Tasas de crecimiento con desviaciones típicas de 3 de las especies de *Ulva* ensayadas. Los valores indica la tasa de crecimiento (%) para cada especie en cada nivel de luz.

## Comparativa de las tres especies estudiadas

Los resultados obtenidos en esta experiencia (Gráfica 9) 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 una tendencia al 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.

## Conclusiones

- Podemos concluir que en vista de las experiencias y analíticas realizadas existen características morfológicas y químicas diferenciales entre las 4 especies de *Ulva* cultivadas en tanque con agua enriquecida en nutrientes.
- Los resultados del experimento sobre la influencia de la dosis lumínica entre las distintas especies permiten concluir que *U. ohnoi* es la especie de tasa de crecimiento más alta y estable en las condiciones experimentales ensayadas, por lo que es la más eficiente en el uso de la luz.
- Los resultados analíticos indican también que *U. ohnoi* es una de las especies de mayor porcentaje en proteínas y la que presenta un mejor balance en cuanto a macrominerales y oligoelementos.
- Por todo ello se propone el uso de *U. ohnoi* como biofiltro para el desarrollo de sistemas integrados peces-algas en recirculación de agua.
- Estudios posteriores son requeridos para establecer el comportamiento de estas especies en otras condiciones de cultivo, en particular en la influencia tanto de la fase del ciclo de vida como de los parámetros ambientales en el desencadenamiento de los procesos de esporulación.

## Referencias bibliográficas

- Bliding, C. (1968). Critical survey of European taxa in Ulvales. II. ULVA, Ulvaria, Monostroma, Kornmannia. *Botaniska notiser*.
- Baamonde, S., Bárbara, I., Barreiro, R., & Cremades, J. (2007). Is the cryptic alien seaweed *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) widely distributed along European Atlantic coasts?. *Botanica marina*, 50(5/6): 267-274.
- Bolton, J. J., Robertson-Andersson, D. V., Shuuluka, D., & 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(5): 575-583.
- Carlton, J. T. (1996). Marine bioinvasions: the alteration of marine ecosystems by nonindigenous species. *Oceanography-Washington DC – Oceanography society-*, 9: 36-43.
- Couceiro, L., Cremades, J., & Barreiro, R. (2011). Evidence for multiple introductions of the Pacific green alga *Ulva australis* Areschoug (Ulvales, Chlorophyta) to the Iberian Peninsula. *Botanica Marina*, 54(4): 391-402.
- Heesch, S., Broom, J. E. S., Neill, K. F., Farr, T. J., Dalen, J. L. & Nelson, W. A. (2009). *Ulva*, *Umbraulva* and *Gemina*: genetic survey of New Zealand taxa reveals diversity and introduced species. *Eur. J. Phycol.* 44:143–54.
- Hiraoka, M., Shimada, S., Uenosono, M., & Masuda, M. (2003a). A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov.(Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycological Research*, 52(1): 17-29.
- Kirkendale L., Saunders G. W., Winberg P. (2013) A molecular survey of *ulva* (chlorophyta) in temperate australia reveals enhanced levels of cosmopolitanism. *Phycological Society of America*, 49: 69–81
- Hoeksema, B. W., & Van den Hoek, C. (1983). The taxonomy of *Ulva* (Chlorophyceae) from the coastal region of Roscoff (Brittany, France). *Botanica Marina*, 26(2): 65-86.
- Koeman, R. P. T., & Van den Hoek, C. (1981). The taxonomy of *Ulva* (Chlorophyceae) in the Netherlands. *British Phycological Journal*, 16(1): 9-53.
- Koeman, R. P. T. (1985). Taxonomy of *Ulva* Linnaeus, 1753, and *Enteromorpha* Link, 1820,(Chlorophyceae) in the Netherlands.
- López, S. B., Fernández, I. B., Lozano, R. B., & Ugarte, J. C. (2007). Is the cryptic

- alien seaweed *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) widely distributed along European Atlantic coasts?. *Botanica Marina*, 50(5/6): 267-274.
- Malta, E. J., Draisma, S. G., & Kamermans, P. (1999). Free-floating *Ulva* in the southwest Netherlands: species or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison. *European Journal of Phycology*, 34(05): 443-454.
  - Mineur, F., Johnson, M. P., Maggs, C. A., & Stegenga, H. (2007). Hull fouling on commercial ships as a vector of macroalgal introduction. *Marine Biology*, 151(4): 1299-1307.
  - Mshigeni, K. E., & Kajumulo, A. A. (1979). Effects of the environment on polymorphism in *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta, Ulvaceae). *Botanica Marina*, 22(3): 145-148.
  - Robertson-Andersson, D. V., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J. J., Troell, M., Anderson, R. J., & Probyn, T. (2008). Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology*, 20(5): 579-595.
  - Schaffelke, B., Smith, J. E., & Hewitt, C. L. (2006). Introduced macroalgae—a growing concern. In *Eighteenth International Seaweed Symposium* (pp. 303-315). Springer Netherlands.
  - Steffensen, D. A. (1976). The effect of nutrient enrichment and temperature on the growth in culture of *Ulva lactuca* L. *Aquatic botany*, 2: 337-351.
  - Taboada, C., Millan, R., & Miguez, I. (2010) Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *J Sci Food Agric* 90:445–449.
  - Tanner, C. E. (1986). Investigations of the taxonomy and morphological variation of *Ulva* (Chlorophyta): *Ulva californica* Wille. *Phycologia*, 25(4): 510-520.