

E.2.2. Procedimientos y protocolos de cultivo de las especies de macroalgas seleccionadas

ALGALUP - Alternativa integral para la explotación de macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

0558_ALGALUP_6_E

Mayo 2022



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

Contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1 CULTIVOS FCUP/CIIMAR..... | 5 |
| 2.1.1 Ensayo de temperatura y densidad de cultivo en <i>Codium tomentosum</i> | 5 |
| 2.1.2 Ensayo de nutrientes en <i>Codium tomentosum</i> | 6 |
| 2.1.3 Densidad de crecimiento <i>Laminaria ochroleuca</i> | 8 |
| 2.2 CULTIVOS EN ANFACO-CECOPESCA | 8 |
| 2.2.1 Experimentos con <i>Codium spp</i> | 8 |
| 2.2.2 Experimentos con <i>Osmundea pinnatifida</i> | 9 |
| 3. RESULTADOS..... | 10 |
| 3.1 CULTIVOS EN FCUP/CIIMAR | 10 |
| 3.1.1 Experimento de temperatura y densidad de cultivo en <i>Codium tomentosum</i> ... | 10 |
| 3.1.2 Experimento de nutrientes con <i>Codium tomentosum</i> | 12 |
| 3.1.3 Densidad de crecimiento en <i>Laminaria ochroleuca</i> | 15 |
| 3.2 CULTIVOS EN ANFACO CECOPESCA..... | 16 |
| 3.2.1 Experimentos con <i>Codium spp</i> | 16 |
| 3.2.2 Experimentos con <i>Osmundea pinnatifida</i> | 20 |
| 4. CONCLUSIONES | 21 |
| 4.1 <i>Codium tomentosum</i> | 21 |
| 4.2 <i>Osmundea pinnatifida</i> | 21 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 23 |



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

1. INTRODUCCIÓN

Las macroalgas representan un ecosistema de gran valor en la biosfera, principalmente por los servicios ecosistémicos que ofrecen, como la biomasa, el amortiguamiento de la energía del oleaje, retención de sedimentos y protección contra la erosión. Ambientes costeros ricos en macroalgas traen consigo una alta productividad primaria y diversidad biológica, y pueden ser considerados zonas de refugio y crianza de juveniles de especies marinas como peces y crustáceos (Terrados & Borum 2004, Lara-Domínguez 2005). Muchas especies de interés económico son recolectadas del medio natural, con el consiguiente posible impacto sobre los ecosistemas sostenidos por estas algas. Por ese motivo es necesario desarrollar técnicas de cultivo que permitan reducir la dependencia de la extracción del medio natural para la obtención de biomasa de macroalgas.

En este informe se ha incluido el trabajo realizado en el marco de la Actividad 2, Tarea 2.2 del proyecto ALGALUP. Estas tareas han consistido en el cultivo de dos de las especies de interés seleccionadas en el proyecto incluyendo los entregables 2.2.1, 2.2.2 y 2.2.3 relativos a las experiencias de cultivo de las especies *Codium tomentosum*, *Laminaria ochroleuca* y *Osmundea pinnatifida*. En el FCUP/CIIMAR se han trabajado las especies *Codium tomentosum* y *Laminaria ochroleuca*, y en ANFACO *Codium tomentosum*, y *Osmundea pinnatifida*. El objeto de la realización de estos ensayos fue optimizar un protocolo de cultivo para estas especies y comparar las necesidades nutricionales.

***Codium tomentosum*, Stackhouse, 1797**

Pertenece a un género de algas verdes ampliamente distribuidas por la costa atlántica de Europa y Norte de África, así como en las Islas Canarias, Mediterráneo, Sri Lanka y Japón. Es una especie que crece sobre rocas en el mesolitoral, tanto en zonas de costas expuesta como protegidas, llegando hasta los 20 metros de profundidad. Morfológicamente los individuos presentan un talo cilíndrico, regularmente dicotómico con consistencia esponjosa y elástica, con color verde oscuro. Pueden crecer hasta los 30 cm de largo, y sus ramas, hasta los 8-10 cm de diámetro (Park and Son, 1992; Silva, 2018).

La importancia de la especie radica en las propiedades nutricionales con alto contenido en minerales, como el calcio, yodo y magnesio, así como fuente de proteínas y rica en fibra. Tiene un alto contenido en Omega 3 y en moléculas bioactivas (fármacos analgésicos y anti-inflamatorios en su mayoría), y ricas en ácido salicílico. Además, son potentes mensajeros químicos sumamente importantes para la respuesta inmunitarias e inflamatorias (Rivero et al, 2020).



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

***Laminaria ochroleuca*, Bachelot de la Pylaie, 1824**

Es considerado un modelo de estudio como el “Golden kelp”, dentro de las algas pardas. Esto es debido a su alta relevancia en funciones ecológicas debido a su alta distribución por singularidad de ambientes: desde aguas de temperaturas templadas a frías, desde Morocco al sud de Inglaterra, y con formaciones en aguas profundas en las Islas Azores o en el Mar Mediterráneo (Franco et al., 2007). Morfológicamente, presenta una coloración castaña-amarillenta con una característica coloración amarilla en la zona de unión de la lámina con el estipe. El estipe es cilíndrico con un diámetro considerable y flexible. Los rizoides se unen formando una base cónica sólida, con un diámetro de 18 cm fijo al sustrato rocoso (Ribeiro, 2016). Se le considera alga medicinal remineralizante y estimulante del metabolismo general, por sus altas cantidades en sodio, potasio, yodo, calcio y sílice, y vitaminas como A, B, C, D y E. Entre sus aplicaciones, destaca en el sector de la salud por su extracción de ficocoloides, ya que demostraron ser extractos con actividad analgésica en el sistema nervioso central, y como agente de protección de la estructura del ADN contra la radiación UV (Mendes et al, 2013; Ribeiro, 2016). Además, en estudios como Oumaskour et al. 2012, se demostró su actividad antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana y anti-inflamatoria (Ribeiro, 2016).

***Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse 1809**

Esta especie es un alga roja comestible y conocida por tener un sabor picante distintivo que le da el nombre común “pimienta de mar” (Paiva et al. 2014). *O. pinnatifida* se encuentra entre la flora intermareal de gran parte del litoral peninsular, en la costa baja y media (Cardoso et al. 2014), pero solo alcanza el tamaño y la abundancia necesaria para ser explotable en el litoral de Galicia y occidente de Asturias. Es una especie que forma densas poblaciones sobre las rocas del litoral superior en localidades semiprotegidas y/o semiexpuestas al oleaje (Bunker et al. 2010). Es fuente de fibra, proteínas y ácidos grasos (Patarra et al. 2013) y se trata de un recurso que solo se puede comercializar en fresco porque seco pierde la mayoría de las cualidades organolépticas que le confieren valor. Es una especie muy variable en tamaño y color dependiendo del nivel de la costa donde se encuentre: en el nivel superior suele ser de color amarillo verdoso, debido a la exposición a altos niveles de luz solar, mientras que en el nivel inferior puede volverse púrpura el marrón rojizo (Bunker et al. 2010).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 CULTIVOS FCUP/CIIMAR

2.1.1 Ensayo de temperatura y densidad de cultivo en *Codium tomentosum*

En este ensayo se estudió el efecto de la temperatura, densidad de cultivo en el crecimiento, productividad y su consecuencia en la presencia de epífitas de la especie *Codium tomentosum*. Para ello, se consideró el factor densidad con 4 niveles de biomásas diferentes (15-30-45-60 g/l) con 3 réplicas cada uno. El experimento tuvo una duración de 4 semanas de cultivo, en una cámara frigorífica donde se colocaron todos los tratamientos a una temperatura fija. Se realizaron en total de 3 experimentos para testar diferentes temperaturas. El factor temperatura tenía un intervalo de fluctuación de ± 0.7 , siendo las temperaturas establecidas de 13 ± 0.7 , 15 ± 0.7 y 17 ± 0.7 °C. Se hicieron campañas de muestreos en la playa de Aguçadoura ($41^{\circ}25'50''$ N, $8^{\circ}46'37''$ W) en la zona norte de Portugal, donde se extrajo el material biológico a utilizar. Dicho material fue tratado en el laboratorio mediante lavados, extracción de epífitas y cortes de partes afectadas. El material se redujo a filamentos de 10-12 cm para su posterior utilización en los ensayos

Como material de laboratorio, propiamente para el cultivo se utilizaron balones de 1 litro, con varillas de 20 cm aproximadamente, filtros de $0,2 \mu\text{m}$ y esponjas. Todo el material previamente esterilizado por autoclave. A nivel condiciones del ambiente, se programó un fotoperiodo de 8:16 con una iluminación de $100 \mu\text{moles}$ y aireación constante. El agua a utilizar era agua de mar esterilizada de la misma forma.

En cuanto al aporte nutricional, se utilizó el medio de cultivo Provasoli's Enriched Seawater (PES), con una concentración $\frac{1}{4}$ de la concentración estándar a la semana. Al final del experimento se recogieron muestras de agua de 50 ml y se analizó la concentración de nutrientes del medio de cultivo relativas a nitratos y amonio.

Por su parte, en cuanto al tratamiento de datos, se realizaron cálculos de crecimiento, utilizando la siguientes formulas:

$$\text{Tasa de crecimiento: } \left(\ln \left(\frac{g_{\text{iniciales}}}{g_{\text{finales}}} \right) \right) \div \text{días} \times 100$$

$$\text{Productividad: } \frac{g_{\text{finales}} - g_{\text{iniciales}}}{\text{Vol} \times n^{\circ} \text{ días}}$$

Los datos de crecimiento y productividad fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) a partir del programa R.project. Se realizó un ANOVA para cada caso de estudio, uno para la tasa de crecimiento y otro para los datos de productividad. En los cuales se repitió la misma estructura estadística: se tuvieron en cuenta dos factores fijos y ortogonales: Densidad de



cultivo (DC_a) y Temperatura (T_b), cuya estructura de modelo lineal fue la siguiente:

$$X_1 = DC_a + T_b + DC_a * T_b$$

Se hizo en último lugar un test a posteriori, test de Cochran, para ver en qué factores específicamente se encontraban las diferencias significativas. Todos los datos siguieron la normal y eran homogéneos.

2.1.2 Ensayo de nutrientes en *Codium tomentosum*

El ensayo de nutrientes en el cultivo de la especie *Codium tomentosum* se llevó a cabo con el objetivo de estudiar el efecto de diferentes formas de nitrógeno como fuente de nutrientes en el crecimiento y tasa de absorción de nutrientes (V_r) en el medio de cultivo. Para ello se utilizaron 3 tratamientos, con 3 réplicas cada uno, con diferentes cantidades de nutrientes (Tabla 1), en los que se utilizó un tratamiento para testar únicamente el amonio (NH_4^+), otro para los nitratos (NO_3^-) y uno final con una mezcla balanceada de ambos (F1), siempre todos los tratamientos con la misma base de fosfatos. Los nutrientes se analizaron con respecto al tiempo; se recogieron 50 ml de muestra a los 0, 4, 24, 48 y 72 horas de cultivo de los 3 tratamientos y sus respectivas réplicas.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo de nutrientes de *C. tomentosum* y *L. ochroleuca*. Se utilizaron 3 tratamientos con diferentes cantidades (μM) de nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4^{3-}).

| | NO_3^- | NH_4^+ | PO_4^{3-} |
|----------------------------|----------|----------|-------------|
| F1 = 1:1 ratio | 150 | 150 | 30 |
| NH4 = Sólo amonio | 0 | 300 | 30 |
| NO3 = Sólo nitratos | 300 | 0 | 30 |

Se utilizó una biomasa de 30 g/l escogida del ensayo anterior, por tratarse del mejor resultado de crecimiento, productividad y análisis visual. Del mismo modo, entre las tres temperaturas del ensayo anterior, se escogió para este la temperatura de 13 grados como temperatura óptima de cultivo. El tratamiento biológico de *C. tomentosum*, tal y como hicimos en el ensayo anterior, se basó en su recolecta en la playa de Aguçadoura, y en una serie de lavados, limpieza de epífitas y cortes de partes afectadas.

Del mismo modo, se utilizaron los mismos materiales para su cultivo: balones de 1 l, varillas de 20 cm aproximadamente, filtros de 0,2 μm y esponjas. Siguiendo con el mismo procedimiento de esterilización por autoclave.

Por su parte, se hizo el tratamiento de los datos mediante el cálculo de la tasa de absorción de nutrientes (V_r) mediante la siguiente fórmula:

$$v_r = \frac{(S_i - S_f) * Vol}{t * fw}$$

Donde:

S_i - es la concentración de sustrato al inicio del tiempo de intervalo (μM)

S_f - es la concentración de sustrato al final del tiempo de intervalo (μM)

Vol – volumen en litros

T – tiempo total (h)

Fw – el peso fresco del material biológico (g/l)

Por otro lado, se midió de la misma forma tasa de crecimiento y productividad para ver el efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo. Las fórmulas utilizadas son las mismas de la experiencia anterior:

$$\text{Tasa de crecimiento: } \left(\ln \left(\frac{\frac{g}{l} \text{ finales}}{\frac{g}{l} \text{ iniciales}} \right) \right) \div \text{días} \times 100$$

$$\text{Productividad: } \frac{g \text{ finales} - g \text{ iniciales}}{Vol \times n^\circ \text{ días}}$$

Los datos de absorción de nutrientes se sometieron a análisis estadístico mediante el programa R. Project. Con los datos de absorción de nutrientes (X_1), se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA), ortogonal de dos factores fijos: Tratamiento de nutrientes (T_{na}) e Intervalo de tiempo (T_b). El cual se utilizó para cada nutriente testado y cuyo modelo lineal fue el siguiente:

$$X_1 = T_{na} + T_b + T_{na} * T_b$$

Se hizo en último lugar un test a posteriori, test de Cochran, para ver en qué factores específicamente se encontraban las diferencias significativas. Todos los datos siguieron la normal y eran homogéneos.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

2.1.3 Densidad de crecimiento *Laminaria ochroleuca*

Previamente al ensayo de crecimiento fue necesario preparar el material biológico de *L. ochroleuca*. Para ello se extrajeron esporas de láminas reproductivas recolectadas en la playa de Viana de Castelo. Tras su extracción se mantuvieron en crecimiento vegetativo con luz roja y a una temperatura de 15 °C para desarrollar los gametofitos. Mediante la germinación de los gametófitos, fueron producidos esporófitos manteniéndolos a una temperatura de 12°C y alrededor de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa.

Se utilizaron láminas de 2-3 cm de longitud de *L. ochroleuca* distribuidas en 3 tratamientos con 3 réplicas cada uno, con diferentes cantidades de nutrientes (tabla 1), en los que se utilizó un tratamiento para testar únicamente el amonio, otro para los nitratos y uno final con una mezcla balanceada de ambos, siempre todos los tratamientos con la misma base de fosfatos. En este caso únicamente se midió el crecimiento y la tasa de productividad por el efecto de los nutrientes, utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Tasa de crecimiento: } \left(\ln \left(\frac{g_{\text{finales}}}{g_{\text{iniciales}}} \right) \div \text{días} \right) \times 100$$

$$\text{Productividad: } \frac{g_{\text{finales}} - g_{\text{iniciales}}}{\text{Vol} \times n^{\circ} \text{ días}}$$

2.2 CULTIVOS EN ANFACO-CECOPECA

2.2.1 Experimentos con *Codium spp*

El *Codium spp* empleado en estos experimentos fue recogido en los alrededores de cabo Estai (Ría de Vigo, 42°11'02.1" N; 8° 48'50.7" W.)

Experimento 1

Esta experiencia se realizó en botellones de 5 l con dos réplicas por condición. Las condiciones lumínicas empleadas fueron luz blanca de día (5.400 lux, 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o una combinación de luz blanca + roja (360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El fotoperiodo fue de 14 h luz: 10 h oscuridad. El medio en el que se cultivaron consistió en agua de mar suplementada con 1.000 μM de N en forma de NaNO_3 y 100 μM de P en forma de NaH_2PO_4 , y con 0,2 ml/l de la mezcla de microelementos y vitaminas para cultivo de microalgas Goldmedium B (AQUALGAE S.L.). Los botellones fueron mantenidos en una cámara de cultivo isoterma a una temperatura de 20 \pm 1°C.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

Semanalmente, se retiraban las algas de los botellones, se escurrían y se pesaban. El agua se renovaba completamente y se añadían nutrientes nuevos.

Experimento 2

Esta experiencia se realizó en botellones de 5 l y fue realizada de forma secuencial. En una primera fase (Experimento 2.1), se cultivaron 4 botellones de *Codium spp.*, a los que se aplicó luz blanca de día (5.400 lux, $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en un fotoperiodo de 14 h luz: 10 h oscuridad. El medio en el que se cultivaron fue agua de mar suplementada con 500 μM de N en forma de NaNO_3 y 50 μM de P en forma de NaH_2PO_4 . Estos cultivos se mantuvieron durante 50 días.

A los 29 días de iniciarse los cultivos con luz blanca, se instalaron 3 botellones más de *Codium spp.*, iluminados con una combinación de luz blanca + roja ($360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el mismo fotoperiodo que los anteriores. La suplementación de nutrientes fue también la misma.

Cuando los botellones que estaban iluminados con luz blanca alcanzaron los 50 días de cultivo se retiró una parte de la biomasa, dejándose unos 125 g por botellón, la misma cantidad que en los cultivos iluminados con luz blanca + roja. Al mismo tiempo, se prepararon 3 botellones con 150 g de *Codium spp.* suplementados con 500 μM de NaNO_3 y 75 μM de NaH_2PO_4 . Esta nueva fase del experimento se denominó Experimento 2.2. En el experimento 2.1 a día 21 del inicio del cultivo de los botellones iluminados con luz blanca y roja tenían una con una densidad media de 125 g, estos cultivos continuaron cultivándose con las mismas condiciones formando parte del experimento 2.2.

Durante todo el experimento completo los botellones fueron mantenidos en una cámara de cultivo isoterma a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Semanalmente, se retiraban las algas de los botellones, se escurrían y se pesaban. El agua se renovaba completamente y se añadían nutrientes nuevos.

2.2.2 Experimentos con *Osmundea pinnatifida*

La *O. pinnatifida* empleada en estos experimentos fue recogida en la Playa del Fechiño (Canido, Ría de Vigo, $42^\circ 12' 4,02'' \text{ N}$; $8^\circ 48' 6,22'' \text{ W}$).

Experimentos 1 y 2

Los primeros experimentos de cultivo de *O. pinnatifida* se realizaron en enero y febrero de 2020, en botellas de 1 l y utilizando las concentraciones de nutrientes que se habían utilizado en las experiencias anteriores de cultivo de *Chondrus crispus* 1.000 o 2.000 μM de NaNO_3 , 100 o 200 μM de NaH_2PO_4 y 0,5 ml/l de Goldmedium B. La cantidad de biomasa inicial fue en un caso de 13 g y en otro de 32 g por botella.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

Experimento 3

La *O. pinnatifida* empleada en este experimento fue recogida en la Playa del Fechiño (Canido, Ría de Vigo, 42°12'4,02" N; 8° 48'6,22" W).

El tercer experimento se llevó a cabo de enero a marzo de 2021 en botellas de 1 l con densidades iniciales entre 7-8 g/l. *O. pinnatifida* es una especie que en Galicia aparece en los meses de invierno, a partir de noviembre-diciembre, y empieza a desaparecer en abril. Se localiza en el intermareal, en zonas sombreadas de las rocas. Por este motivo, se planteó la hipótesis de que un factor importante en el éxito del cultivo de esta especie sería aportar la intensidad correcta de luz, como ocurre en el caso de *Codium spp.* La temperatura del agua puede ser también un factor a tener en cuenta, pero en este experimento no se controló. Los botellones fueron mantenidos en una cámara de cultivo isoterma a una temperatura de 20 ±1°C.

Se realizó un experimento multifactorial en el que se utilizaron dos intensidades de luz: 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL) y 84 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL), y dos concentraciones de nutrientes, 500 y 50 μM N y P y 200 y 20 μM N y P respectivamente. Así, se ensayaron 4 condiciones experimentales, denominadas HL-200, HL-500, LL-200 y LL-500, en triplicado.

3. RESULTADOS

3.1 CULTIVOS EN FCUP/CIIMAR

3.1.1 Experimento de temperatura y densidad de cultivo en *Codium tomentosum*

Los 3 ensayos mostraron el mismo patrón en cuanto a concentración de biomasa, en el cual conforme mayor es la densidad de cultivo mayor es la productividad en el cultivo y menor es la tasa de crecimiento. La temperatura por su parte también afectó al desarrollo de *C. tomentosum*, donde las temperaturas más bajas tienen mayor productividad y parecen mejorar las condiciones de cultivo. El mayor registro promedio de productividad de cultivo fue de 7,03 ± 6,20 g/l/semana a 13°C para los 60 g de densidad de cultivo (Figura 1), seguido de 3,64±2,49 y 4,59±2,20 g/l/semana para los 15 y 17°C respectivamente.

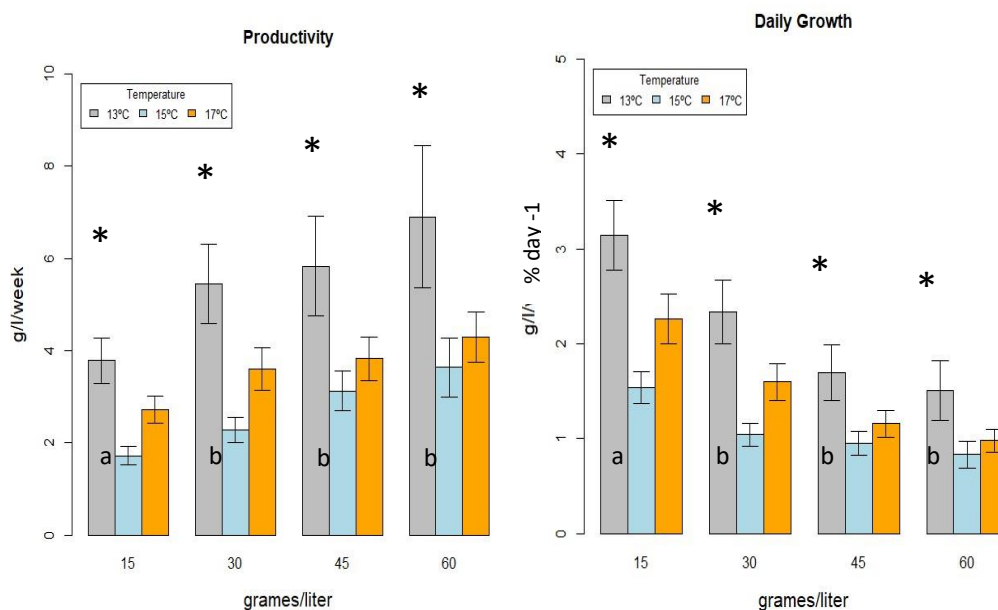


Figura 1. Tasa de crecimiento (% día⁻¹) y tasa de productividad (g/l/semana) de *Codium tomentosum* en los diferentes experimentos de temperatura: 13°C, 15°C y 17°C. Diferencias significativas entre temperaturas (*) y entre densidad de cultivo (a;b).

En la tasa de crecimiento y productividad, la densidad de cultivo de 15 g/l y, por su parte, la temperatura de 13 °C, presentaron diferencias significativas con respecto al resto. Teniendo 15 g/l una tasa de crecimiento significativamente mayor pero una productividad significativamente menor. Los cultivos sometidos a 13 °C presentaron datos significativamente mayores en ambos factores.

En la tasa de crecimiento, los resultados muestran una tendencia en la que se favorece también el crecimiento de *C. tomentosum* a temperaturas menores. En este caso destacan las densidades de cultivo menores por tener una mayor tasa de crecimiento conforme menor es la temperatura. La mayor tasa de crecimiento por tanto se registró en densidades de 15 g a 13 °C con un valor promedio de $3,15 \pm 1,52$ % día⁻¹, seguido de $1,54 \pm 0,68$ y $2,35 \pm 0,79$ % día⁻¹, para las temperaturas de 15 y 17 °C respectivamente.

La relación de la temperatura con ambos factores aún es algo difusa ya que a pesar de que el patrón es claro en la productividad y tasa de crecimiento con respecto a los 13 °C, la diferencia encontrada entre las otras dos temperaturas no deja claro cómo afecta esa subida de dos grados entre los 15 y los 17 °C, ya que parece que puede ser incluso más beneficioso para la especie desarrollarse a los 17 °C que a los 15 °C.

En cuanto a los niveles de nutrientes, se registraron mayores niveles de nitratos que de amonio en todos los experimentos, siendo los de amonio mínimos y poco destacables (Figura 2). De todas formas, no se ha observado limitación por nutrientes en ningún caso.

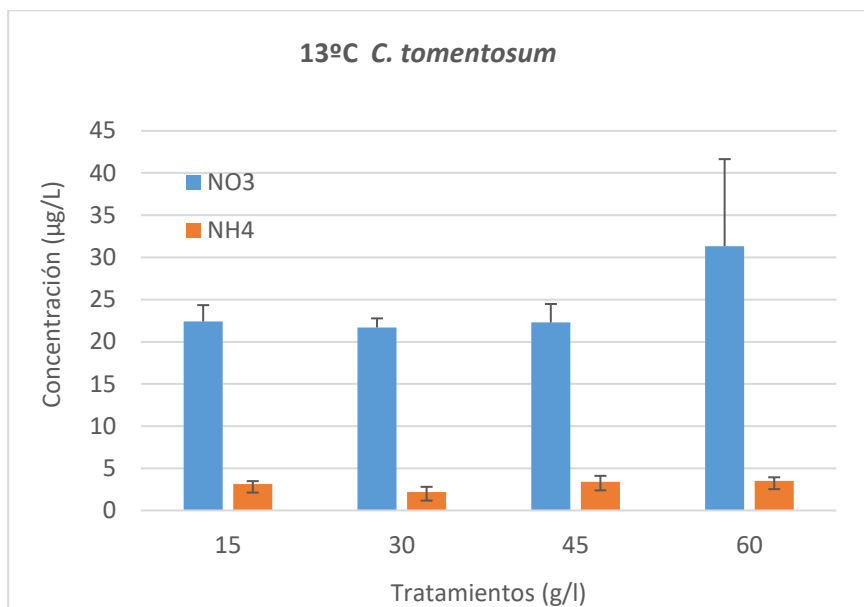


Figura 2. Concentración de los nutrientes nitratos y amonio ($\mu\text{g/L}$) en el cultivo de *C. tomentosum* a 13 °C de temperatura.

3.1.2 Experimento de nutrientes con *Codium tomentosum*

El ensayo de nutrientes por tiempos mostró variabilidades entre tratamientos, tiempos y tipo de nutriente a estudiar. La mayor tasa de absorción con respecto al tiempo fue de amonio, seguido de nitrato, siendo el fosfato nutriente base en todos los tratamientos.

La tasa de absorción en el tratamiento F1 (Figura 3) de los 3 nutrientes, fue elevada tras las 24 horas de cultivo. La tasa de absorción más significativa, se da con el nutriente amonio en el intervalo de 4 h de cultivo, donde es significativamente mayor al resto de intervalos, con una media de absorción aproximada de 3 g/h. A partir de las 24 h todos los nutrientes son absorbidos por *C. tomentosum*.

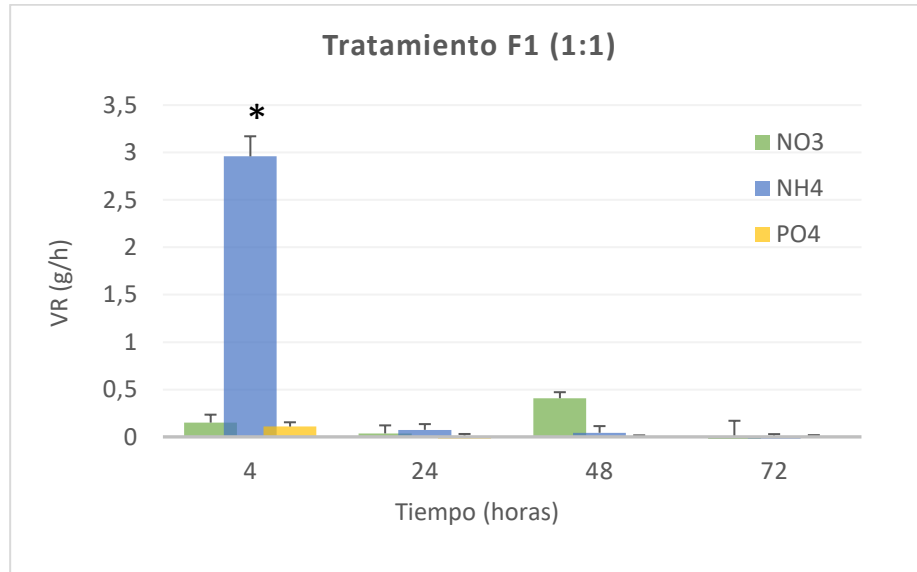


Figura 3. Tasas de absorción del tratamiento F1 (1:1) de los nutrientes nitrato (NO₃), amonio (NH₄) y fosfato (PO₄), en tiempos de cultivo 4h; 24h; 48h; 72h. Diferencias significativas mostradas como (*).

En cuanto al tratamiento de nitrato (NO₃) (Figura 4), la tasa de absorción del nitrato fue más elevada a partir de las 48h de cultivo, siendo significativamente mayor al resto de tiempos de cultivo, absorbiéndose un 0,5 g/hora. Siendo, por tanto, más rápidamente removable por *C. tomentosum* en las primeras 48 horas, desapareciendo progresivamente del medio tras 72h de cultivo.

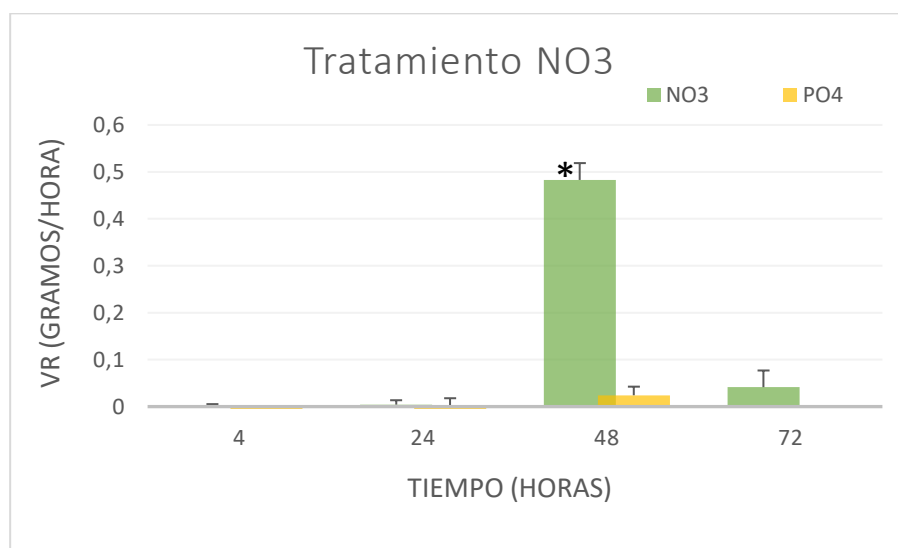


Figura 4. Tasas de absorción del tratamiento de nitrato (NO₃) de los nutrientes nitrato (NO₃) y fosfato (PO₄), en tiempos de cultivo 4 h; 24 h; 48 h; 72 h. Diferencias significativas mostradas como (*).

Con respecto al tratamiento del amonio (NH_4) (Figura 5), tal y como ocurría en el tratamiento F1, el amonio se absorbe en las primeras cuatro horas de cultivo, con una tasa de 2,5 g/hora aproximadamente, siendo significativamente mayor al resto de los tiempos. Tras las 4 horas de cultivo el amonio es absorbido en su totalidad, presentando pequeñas acumulaciones posteriormente. Siendo, por tanto, más rápidamente consumido por *C. tomentosum* en las primeras 4 horas, desapareciendo progresivamente del medio tras 72 h de cultivo.

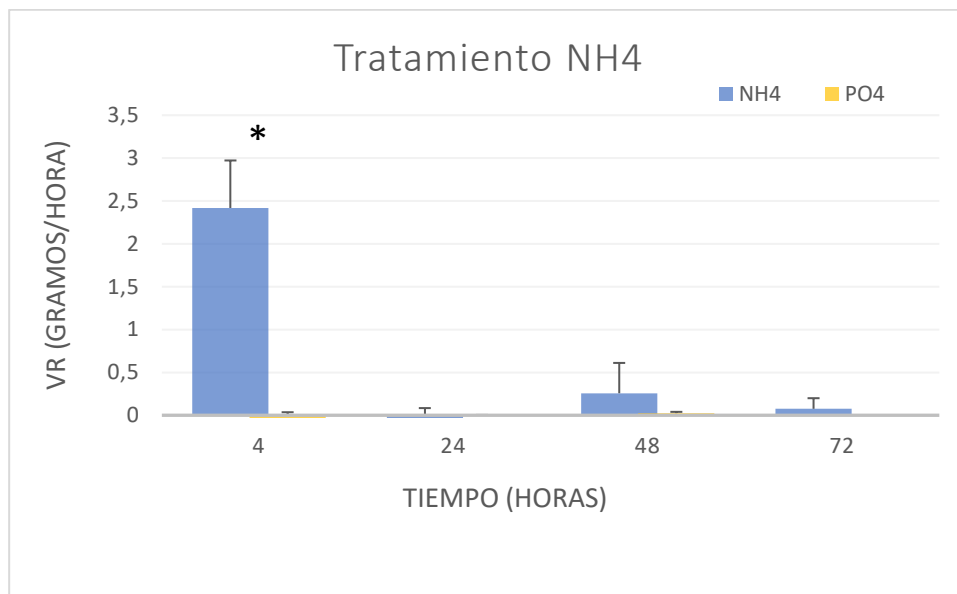


Figura 5. Tasas de absorción del tratamiento de amonio (NH_4) de los nutrientes, amonio (NH_4) y fosfato (PO_4), en tiempos de cultivo 4 h; 24 h; 48 h; 72 h. Diferencias significativas mostradas como (*)

En relación al efecto del tipo de tratamientos de nutrientes empleados con respecto al crecimiento (Figura 6), no se vieron diferencias destacadas en ningún tratamiento. La productividad estuvo en torno a los 2,7 g/l/ semana, indicando que el cambio de dosis de nutriente no perjudicaría al desarrollo del cultivo a corto plazo.

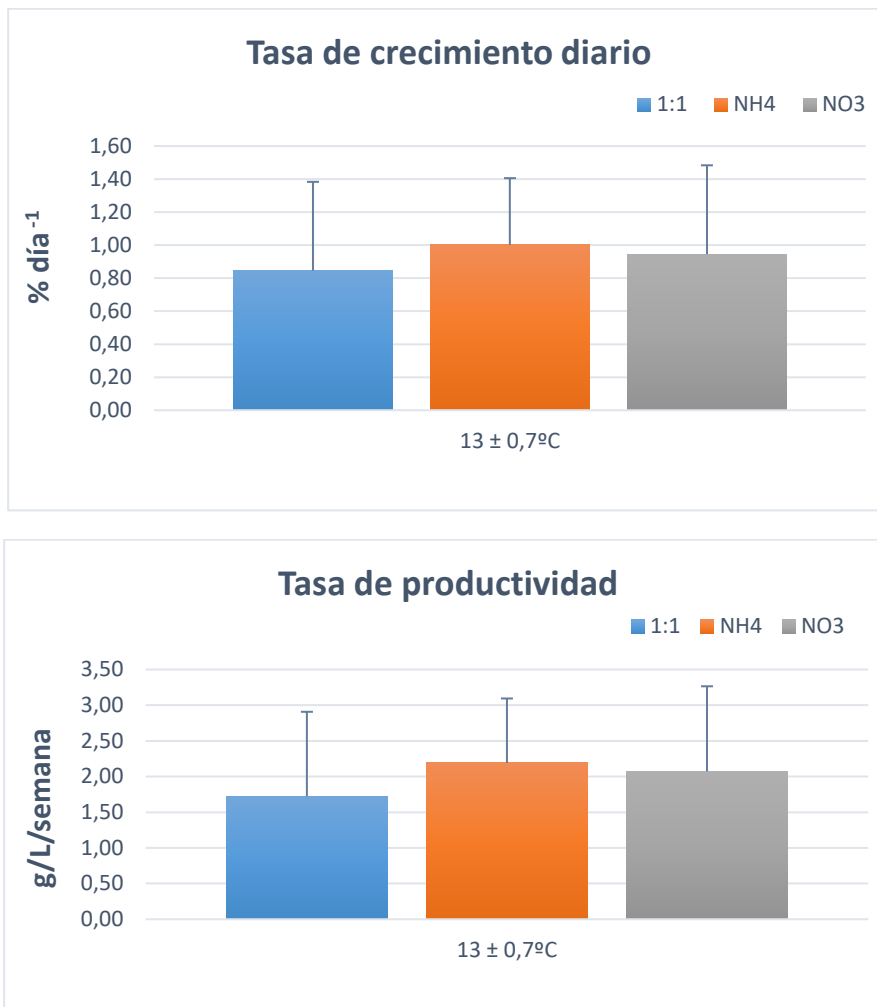


Figura 6. Tasa de crecimiento (% día⁻¹) y tasa de productividad (g/l/semana) de *Codium tomentosum* en los tratamientos de nutrientes F1 (1:1), NH₄ y NO₃.

3.1.3 Densidad de crecimiento en *Laminaria ochroleuca*

El crecimiento y la productividad en *L. ochroleuca* no destacó demasiado en productividad y crecimiento diario con respecto a los tratamientos de nutrientes (Figura 7). Se puede ver un mayor crecimiento y productividad en los tratamientos F1 y NH₄, donde se mostraron valores muy similares en torno a 8 g/l/semana de tasa de crecimiento y 3 g/l/semana de productividad.

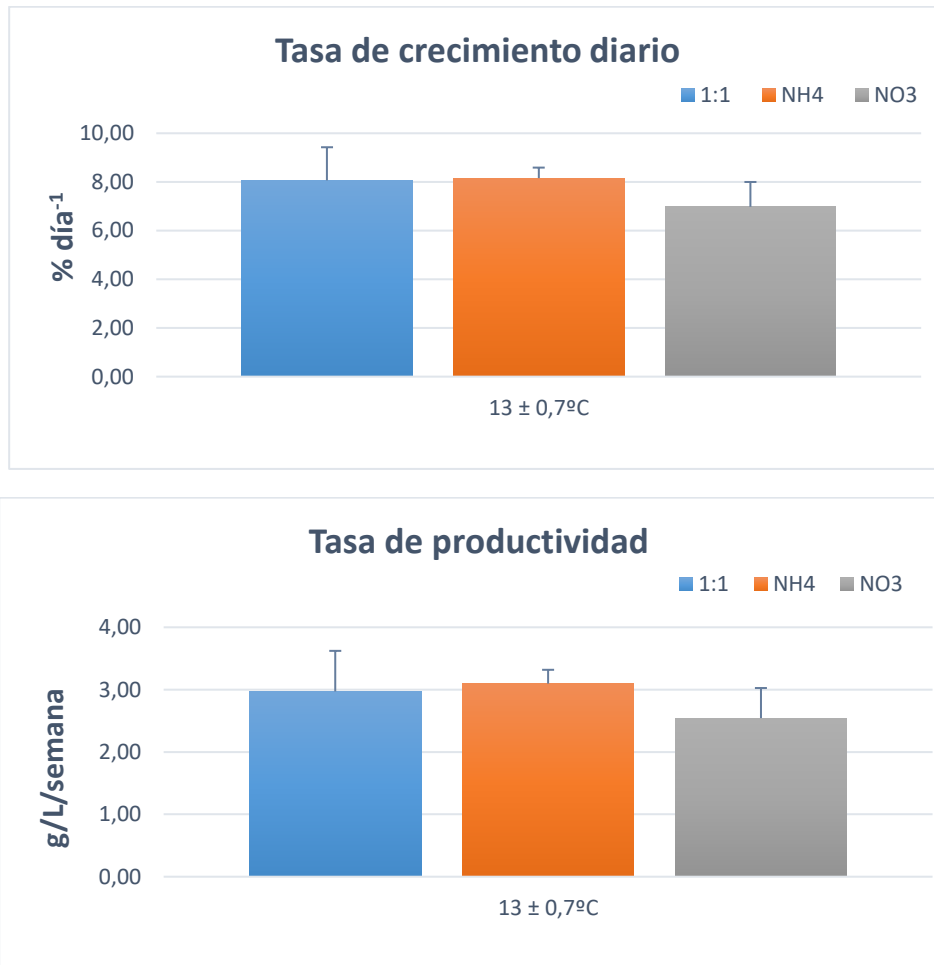


Figura 7. Tasa de crecimiento (% día⁻¹) y tasa de productividad (g/l/semana) de *Laminaria ochroleuca* en los tratamientos de nutrientes F1(1:1), NH₄ y NO₃.

3.2 CULTIVOS EN ANFACO CECOPESCA

3.2.1 Experimentos con *Codium spp*

Experimento 1

En la gráfica (Figura 8) se observa que los cultivos iluminados con luz blanca experimentaron un crecimiento sostenido hasta el día 33 de cultivo, pero a partir de ese momento se observó un rápido deterioro y pérdida de peso. En el caso de los cultivos iluminados con luz blanca suplementada con luz roja, el peso inicial se mantuvo hasta el día 33, pero a continuación el deterioro fue mucho más rápido.

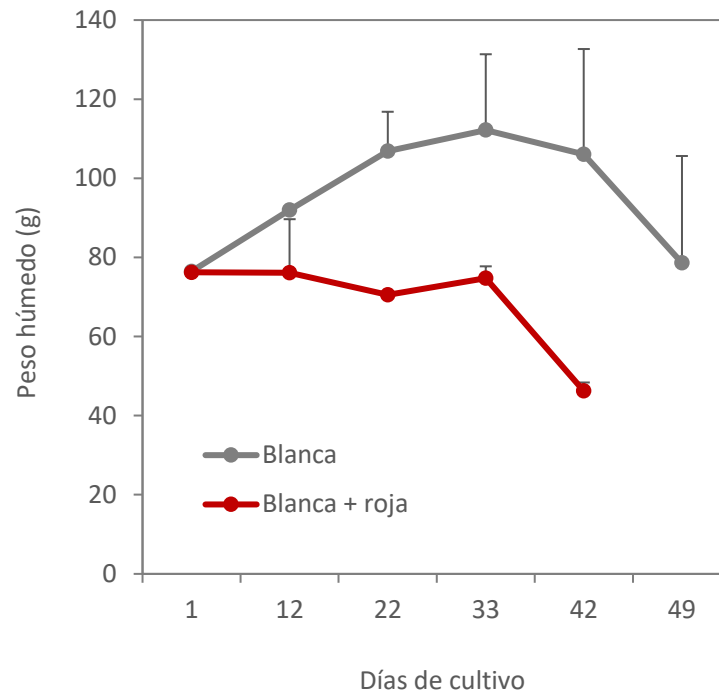


Figura 8. Resultados en peso húmedo a lo largo del experimento 1 del cultivo de *Codium spp* iluminados bajo dos condiciones diferente.

Se observó que los cultivos contenían una mezcla de dos especies, una de las cuales se deterioraba mucho más rápido que la otra. Además de ser macroscópicamente diferentes (una de ellas con ramas más largas que la otra), la observación al microscopio permitió ver que la primera presentaba utrículos no mucronados, mientras que la segunda presentaba utrículos mucronados. Esto sugiere que nos encontramos ante una mezcla de *Codium vermilara* o *Codium tomentosum* y *Codium fragile*.

Experimento 2

En el Experimento 2.1, por fin se logró un crecimiento sostenido y constante de *Codium spp.* en las dos condiciones de iluminación, durante 50 días en el caso de los cultivos iluminados con luz blanca, y 21 en el caso de los cultivos de luz blanca+roja (Figura 9).

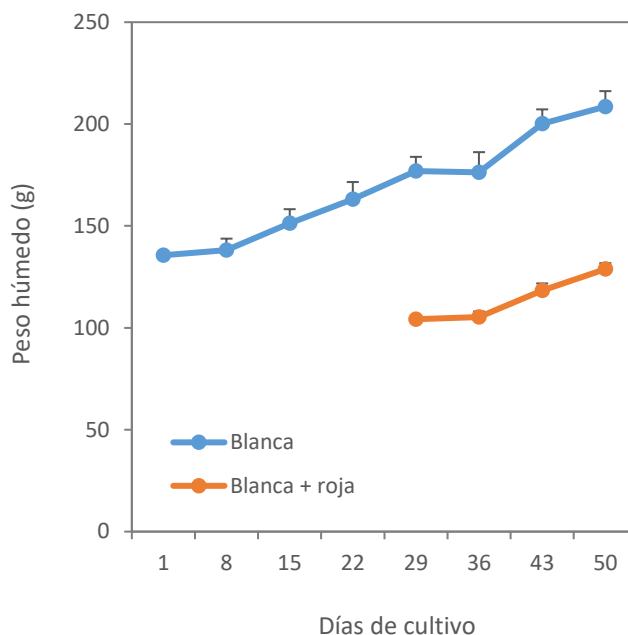


Figura 9. Resultados en peso húmedo de los cultivos de *Codium spp.* a lo largo del experimento 2.1 iluminados bajo dos condiciones diferentes.

En la última semana de cultivo, en los botellones iluminados con luz blanca se observó un estancamiento en el crecimiento. Se manejó la hipótesis de que los cultivos comenzaban a experimentar una limitación por luz debido al crecimiento de la biomasa, por lo que se retiró una parte de las algas, dejándose unos 125 g por botellón, la misma cantidad que en los cultivos iluminados con luz blanca + roja. Al mismo tiempo, se prepararon 3 nuevos botellones con unos 150 g de *Codium spp.* cada uno, suplementados con 500 μM de NaNO_3 y 75 μM de NaH_2PO_4 . Esta nueva fase del experimento se denominó Experimento 2.2.

En el Experimento 2.2, se consiguió nuevamente el crecimiento sostenido de los cultivos (Figura 10). Al comparar las tasas de crecimiento acumulado (Figura 11), se observa que incrementar la concentración de P en el medio de 50 a 75 μM no da lugar a un mayor crecimiento. En cambio, utilizar una combinación de luz blanca + roja incrementa la tasa de crecimiento respecto a utilizar solamente luz blanca, cuando la diferencia de intensidad luminosa es inferior al 10 % (360 frente a 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cuando se estancó el crecimiento de las algas, se retiró nuevamente biomasa y se continuó con el experimento, observándose que se reanudaba el crecimiento.

Los resultados del Experimento 2 contrastan con los del Experimento 1, realizado en condiciones similares. Las principales diferencias fueron una mayor concentración de nutrientes y el uso de micronutrientes en el Experimento 1, así como una concentración de biomasa inicial menor. Así, los malos resultados del Experimento 1 podrían atribuirse a un exceso de nutrientes, al efecto negativo de algún micronutriente o a una iluminación excesiva para la densidad de biomasa utilizada. Dado que *Codium spp.* aparece en Galicia en los meses de verano y crece en los niveles



superiores del intermareal, incluidas cubetas poco profundas sometidas a una radiación solar intensa, es poco probable que el deterioro de los cultivos en el Experimento 1 se debiese a un exceso de luz.

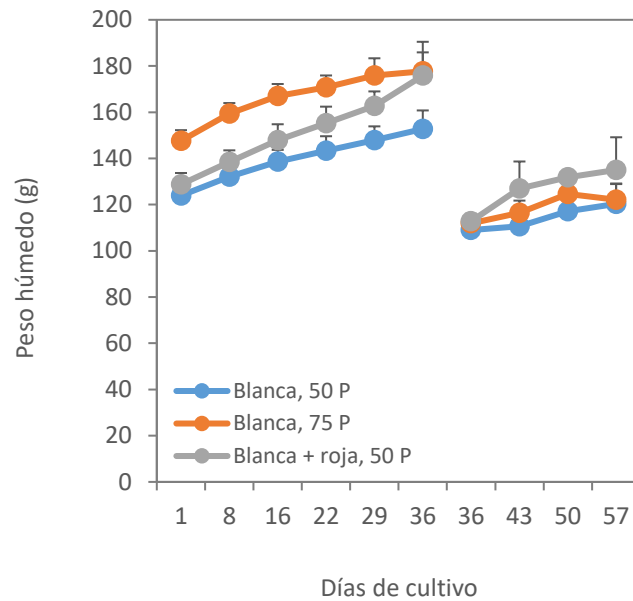


Figura 10. Resultados en peso húmedo de los cultivos de *Codium spp.* a lo largo del experimento 2.2 iluminados con luz blanca y suplementados con 50 μM P, con luz blanca y suplementados con 75 μM P, y con luz blanca+roja suplementados con 50 μM P.

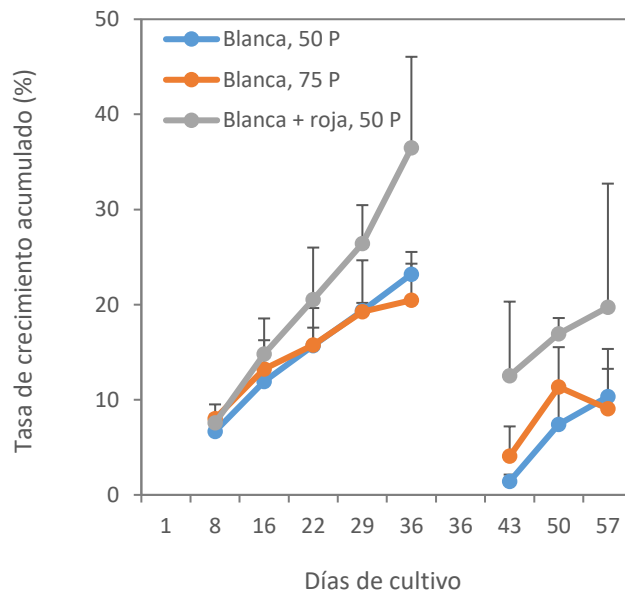


Figura 11. Tasas de crecimiento acumulado de *Codium spp.* en el experimento 2.2

Los resultados del Experimento 2 demuestran que es posible mantener *Codium spp.* en cultivo en interior durante periodos prolongados; en el caso de los cultivos mantenidos con luz blanca y 50 μ de P, hasta 105 días.

3.2.2 Experimentos con *Osmundea pinnatifida*

Experimento 1 y 2

En estos ensayos se produjo un rápido deterioro de las algas, con pérdida de color y fragmentación del talo.

Experimento 3

En todas las condiciones experimentales se observó una fase inicial de crecimiento, más o menos larga, en la que se obtuvieron tasas de crecimiento entre el 12 % y el 35 %. Los mayores valores de crecimiento se obtuvieron en LL-200 y HL-200, y la fase de crecimiento más prolongada se obtuvo en esta última condición; los cultivos LL-200 comenzaron a perder peso a partir del día 22 (Figura 12).

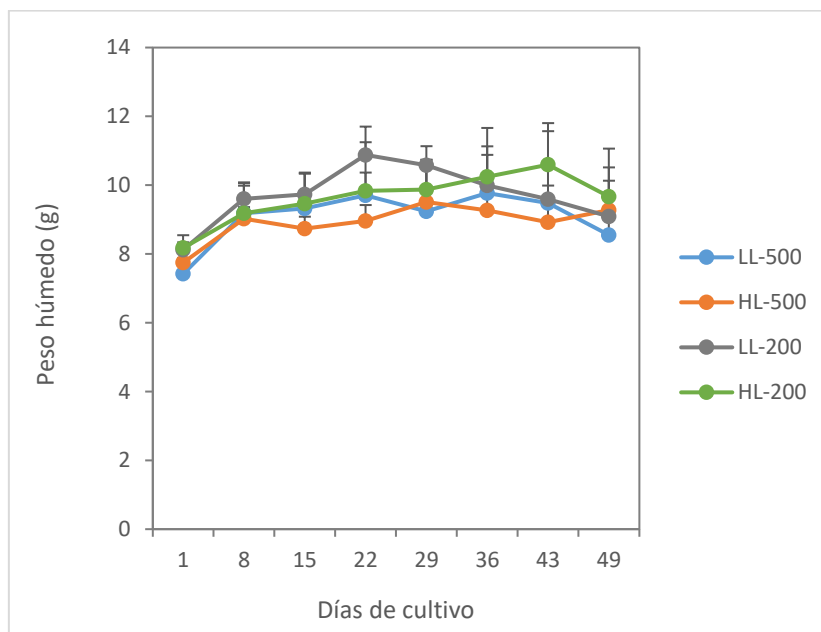


Figura 12. Peso húmedo de *O. pinnatifida* durante el experimento multifactorial.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

4. CONCLUSIONES

4.1 *Codium tomentosum*

En relación a la biomasa inicial empleada en cultivos de *C. tomentosum* se puede concluir que las densidades bajas alcanzan tasas de crecimiento mayores pero productividades menores por lo que lo ideal sería emplear densidades intermedias en torno 25-30 g/l para poder tener un equilibrio entre la tasa de crecimiento y la productividad del alga en cultivo.

En cuanto a la temperatura de cultivo para esta especie se comprobó que la temperatura más baja estudiada que correspondía a 13 °C, alcanzaba tanto una mayor productividad como una mayor tasa de crecimiento, los datos fueron mayores significativamente respecto a las otras dos temperaturas estudiadas. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre ambos factores es algo difusa, ya que, aunque sin diferencias significativas, entre las otras dos temperaturas estudiadas 15 °C y 17 °C, se obtuvieron mejores datos en la temperatura mayor. Este dato, sumado a que en los experimentos de cultivo de *Codium* spp que tuvieron lugar en ANFACO, donde los cultivos se encontraban en una sala isoterma de 20 °C±1 °C mostrando buenas tasas de crecimiento, parece indicar que el efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento no resulta significativo en las condiciones estudiadas.

En relación al aporte nutricional para el cultivo de *Codium* spp los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas sobre la tasa de crecimiento ni la productividad si se emplean diferentes fuentes de nitrógeno o si estas se combinan cuando estas fuentes son amonio y nitrato. A pesar de que las tasas de absorción para el amonio son mayores dentro de las primeras horas de cultivo esto no parece tener efecto sobre el crecimiento del alga. Por otro lado, emplear una concentración de fosfato 10 veces menor que la que se aporte de nitrógeno parece una buena elección ya que se comprobó que incrementar la concentración de fósforo en el medio no tenía efecto en la tasa de crecimiento del alga. Concentraciones de 500 µM de N y 50 µM de fosfato obtuvieron buenas tasas de crecimiento aunque concentraciones algo menores 300:30 N-P µM también dieron buenos resultados sin que *Codium* spp se viera limitado por nutrientes.

Finalmente, en cuanto a la iluminación utilizar una combinación de luz blanca + roja con un fotoperíodo de 14:10 luz-oscuridad, incrementa la tasa de crecimiento respecto a utilizar solamente luz blanca, cuando la diferencia de intensidad luminosa es inferior al 10 % (360 frente a 330 µmol m⁻² s⁻¹).

4.2 *Osmundea pinnatifida*

De las dos condiciones de intensidades lumínicas probadas se puede concluir que fue la menor de las estudiadas, correspondiente a 84 µmoles m⁻² s⁻¹ la que obtuvo mejores resultados ya que con esta iluminación se consiguió un crecimiento más prolongado en el tiempo, por lo que sería



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



ALGALUP

· Green future ·

la idónea a emplear en un protocolo de cultivo de la especie a escala de laboratorio. Esto confirma la hipótesis planteada inicialmente de que aportar la intensidad correcta de luz es un factor importante en el éxito del cultivo de esta especie. Con respecto al contenido de nutrientes aportados al medio se consiguieron mayores valores de crecimiento con la condición 200 y 20 μM N y P respectivamente, por lo que no parece ser una macroalga con elevadas exigencias nutricionales.

O. pinnatifida es una especie que abundante en los meses de invierno, a partir de noviembre-diciembre, y empieza a desaparecer en abril. Se localiza en el intermareal, en zonas sombreadas de las rocas por lo que en el medio natural no soporta temperaturas elevadas. Por esto, pese a que en estos experimentos no se controló, una condición interesante para mejorar su cultivo sería probar diferentes condiciones de temperaturas con la hipótesis de que temperaturas más bajas podrían mejorar los resultados obtenidos.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bunker, F.S.D., Brodie, J.A., Maggs, C.A. & Bunker, A.R. 2010. Seasearch guide to seaweeds of Britain and Ireland. Marine Conservation Society, Ross-on-Wye. 224 pp
- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., Pereira, L., 2014. Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. *Curr. Org. Chem.* 18, 896–917. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116>
- Domínguez A. 2005. Pastos marinos. En: Moreno-Casasola P, E Peresbarbosa-Rojas & AC Travieso-Bello (eds). Manejo costero integral: el enfoque municipal, pp. 229-240. Instituto de Ecología / Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Xalapa.
- Franco et al: The 'golden kelp' *Laminaria ochroleuca* under global change: Integrating multiple eco-physiological responses with species distribution models.
- Mendes, M, Pereira, R, Sousa Pinto, I, Carvalho, AP, Gomes, AM. 2013. Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the North Portuguese Coast. *International Food Research Journal*, 20(6), pp. 3337-3345
- Oumaskour, K. et al., 2012. Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *African Journal of Biotechnology*, 11(104), pp. 16831-16837.
- Paiva, L., Lima, E., Patarra, R.F., Neto, A.I., Baptista, J., 2014. Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chem.* 164, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.119>
- Park, S and Son, C. (1992). Effects of light and temperature on morphogenesis of *Codium fragile* (Suringar) Hariot in laboratory culture. *ALGAE*, 213.
- Patarra, R.F., Leite, J., Pereira, R., Baptista, J., Neto, A.I., 2013. Fatty acid composition of selected macrophytes. *Nat. Prod. Res.* 27, 665–669. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.688048>
- Ribeiro- (2016). Identificação e Análise do Potencial Antifúngico dos Polissacarídeos das Algas *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*. Departamento de ciências da vida. Faculdade de ciências e tecnologia. Univerisdade de Coimbra.
- Rivero, M., Jaramillo, J., Cervel, F., Montero, J and Montejo, M. (2020). Meridies: Revista científica de escuela secundaria. *Asociación Investigación en Secundaria*. 23, pp 1-114.
- Silva, (2018). Cultivation of *Osmundea pinnatifida* and *Codium tomentosum*, native seaweed species with commercial potential. *Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos* Departamento de Biologia.
- Terrados J & J Borum. 2004. Why are seagrasses important? Goods and services provided by seagrass meadows. In: Borum J, CM Duarte, D Krause-Jensen & T Greve (eds). *European seagrasses: An introduction to monitoring and management*, pp. 8-10. The M&MS Project, Copenhagen