

PRACTICAS Curso 2006/2007
ACUICULTURA (Maricultura Vegetal)
(4º CURSO – FCM)

Relación de prácticas:

- Nº1.- Cultivo intensivo de macroalgas de interés industrial / Policultivos integrados / Patentes
- Nº2.- Ficocoloides
- Nº3.- Cultivo, cosechado y procesado de microalgas y cianobacterias de interés industrial
- Nº4.- Aplicación de algas en cosmética
- Nº5.- Aplicación de algas en alimentación humana

Nombre del alumno:

Grupo:

PRACTICA Nº 1.- CULTIVO INTENSIVO DE MACROALGAS DE INTERES INDUSTRIAL / POLICULTIVO / PATENTES

Organización de la práctica:

- 1.- Video – La farmacia del mar
- 2.- Presentación sistemas de cultivo / policultivo
- 3.- Realización de cálculos de densidades óptimas, producción, tasa de crecimiento, NUE, NUR (Anexo_cultivo)
- 4.- Video policultivo Canada
- 5.- Presentación Ecosferas
- 6.- Patentes y ejercicio patentes (Anexo_Patentes)
- 7.- Página web: AquaTT (www.aquatt.ie)

INTRODUCCION

El desarrollo de sistemas de cultivo intensivo en tierra "*indoor/outdoor*" surge a mediados de la década de los 70 (Neish et al. 1977; Ryhter et al. 1978) como resultado de la necesidad de desarrollar sistemas de producción intensiva de macroalgas marinas de interés comercial como fuente alternativa de biomasa, debido a la sobreexplotación de las poblaciones naturales.

Los sistemas de cultivo intensivo indoor/outdoor, a diferencia de los realizados en mar abierto ("*outdoor*"), se caracterizan por una mayor **producción por unidad de superficie** y un mayor control sobre el proceso de cultivo y sobre la calidad de la biomasa producida.

El cultivo intensivo puede ser realizado en diferentes sistemas de cultivo como tanques, estanques, tanques tipo *raceways* o en sistema de flujo por aspersión, con aporte discontinuo o continuo de agua (sistemas abiertos, cerrados, semicerrados). Una alternativa a la fertilización artificial la constituye el desarrollo de sistemas de biofiltración de efluentes de piscifactorias en el que los nutrientes disueltos en el agua son asimilados por las algas (Neori et al. 1991; Jiménez del Río et al. 1994).

Existen una gran variedad de factores que regulan la eficacia (rentabilidad) de los sistemas de cultivo intensivo. Estos factores pueden ser de tipo *abiótico* (irradiación, carbono inorgánico disuelto, pH, oxígeno disuelto, nutrientes, temperatura, salinidad), *bióticos* (densidad, morfología de la planta, epifitismo) y/o *técnicos* (aireación, paletas, diseño del tanque).

MATERIAL Y METODOS

- Preparación de tanques de cultivo: limpieza y tasas de renovación.
- Inoculación de la biomasa de *Gracilaria cornea* (densidad 9 g l⁻¹), *Hypnea spinella* (densidad 9 g l⁻¹), *Ulva* sp. (densidad 2 g l⁻¹).
- Control de parámetros físicos:
 - Irradiación / pH / temperatura / oxígeno disuelto
- Cosechado y cálculo de tasas de crecimiento y producción a los *t* días.
- Tasas de biofiltración (NUE) y asimilación de N-amonio (NUR)

Las prácticas de cultivo se realizarán en un invernadero con tanques semicirculares y circulares de 750 y 1500 L de capacidad, donde se tendrá en cuenta lo siguiente:

- Cultivo en aguas residuales procedentes de tanque de cultivo de dorada (*Sparus aurata*).
- Circuito abierto.
- Desarrollo de flora epífita en los tanques/algas de cultivo.

Calculo de la tasa específica de crecimiento.

Se calcula a partir de la estima de los incrementos de peso fresco escurrido con respecto al tiempo. Al referirnos a peso fresco escurrido hablamos de algas en el interior de redes suspendidas, de modo que, no presenten restos visibles de agua sobre la superficie del talo en el momento de la pesada.

Según DeElia y DeBoer (1978):

$$\mu (\% d^{-1}) = 100 \ln (P_f / P_0) / t$$

donde: μ = Tasa promedio de crecimiento diario en porcentaje (% d⁻¹)
 P_f = Peso de la biomasa alcanzada en t días
 P_0 = Peso de la biomasa inicial

Cálculo de la producción

Según DeBoer y Ryther:

$$P \text{ (g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = [(N_t - N_0) / t * (PS/PF)] / A$$

donde: P = Tasa de producción (en g PS m⁻² d⁻¹)
 $N_t - N_0$ = Excedente en gramos de PH, a los t días.
 PS/PH = Relación peso seco / peso escurrido.
 A = Área de cultivo en metros cuadrados

* El peso seco se determina con muestras secadas en estufa a 90 °C durante 24 h.

PARAMETROS FISICO QUIMICOS DE INTERES

- Irradiación / pH / Temperatura (°C) / Salinidad (‰) / Concentración de O₂ (mg l⁻¹)

OTROS DATOS DE INTERES

Relaciones Peso seco / Peso fresco y densidad óptima de cultivo de algunas especies

Species	dw/fw ratio	Densidad óptima por volumen (kg fresh wt. m ⁻³)	Densidad óptima por superficie (kg fresh wt. m ⁻²) ¿?
<u>Gracilaria cornea</u> var. red	0.12	6 – 9	SCT CPT
<u>Hypnea spinella</u>	0.11	4 – 6	SCT CPT
<u>Grateloupia dichotoma</u>	0.25	6 – 9	SCT CPT
<u>Halopithys incurva</u>	0.23	6	SCT CPT
<u>Codium taylorii</u>	0.09	10	SCT CPT
<u>Ulva rigida</u>	0.21	2	SCT CPT

Características de los tanques de cultivo:

1.- Tanques semicirculares de fibra (SCT)

Superficie = 1.8 m² (1.2 x 1.5 x 0.5 m profundidad máxima)
 Volumen = 750 L o 0.75 m³ (S:V = 2.4 m⁻¹)
 Aireación en una línea central que genera rotación en dos celdas a 4 ± 1 rpm

2.- Tanques circulares de polietileno (CPT)

Superficie = 1.5 m² (1.4 m ∅ x 0.95 m profundidad)
 Volumen = 1500 L o 1.5 m³ (S:V = 1.0 m⁻¹)
 Aireación en una tubería que rodea el fondo y que genera rotaciones de 3 ± 1 rpm

3.- Raceways de 8, 30 y 60 m² de superficie y entre 15 – 20 cm de profundidad

Calculo de la eficiencia de eliminación de N-amonio (NUE) y la tasa de asimilación de N-amonio (NUR).

$$\text{NUE (\%)} = 100 - ([\text{NH}_4^+]_s * 100 / [\text{NH}_4^+]_E)$$

$$\text{NUR (mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1}) = Q(S_i - S) / A$$

donde Q = flujo de agua (l h^{-1}),
S_i = concentración de N-amonio en la entrada (mmol),
S = concentración de amonio en la salida (mmol),
A = superficie del tanque (m^2).

Lo mismo se puede calcular para fosfatos.

BIBLIOGRAFIA

D'Elia C. F. & J. A. DeBoer. - 1978. J. Phycol. 14: 266-272.

DeBoer J. & J. Ryther. - 1977. In: R. W. Krauss (ed.), pp 231-248. Oregon State University Press.

Jiménez del Río, M., Z. Ramazanov & G. García-Reina, 1994. Scientia Marina. 59 (4): 1-7.

Neish, A. C.; P. F. Shacklock, C. H. Fox & F. J. Simpson 1977. Can. J. Bot., 55: 2263-2271

Neori, A., I. Cohen & H. Gordin, 1991. Bot. mar. 34: 483-489.

ANEXO 1.- Calcular producciones y tasas de crecimiento.

SP	PS/PF	TQ	A (m ²)	V (l)	INV.	Fo	Ft	t dias	Po (gr)	Pf (gr)	P grPSm ⁻² d ⁻¹	TC % d ⁻¹	D (g/L)
<i>G.cornea</i>	0,12	CPT	1,5	1500	II	sep-03	oct-03	7	9000	12325			6
<i>G.cornea</i>	0,12	CPT	1,5	1500	II	oct-03	oct-03	7	9000	11825			6
<i>G.cornea</i>	0,12	SCT	1,8	750	I	nov-03	nov-03	11	7500	9750			10
<i>G.cornea</i>	0,12	SCT	1,8	750	I	dic-03	dic-03	15	7500	10080			10
<i>G.cornea</i>	0,12	SCT	1,8	750	I	ene-04	ene-04	7	4500	6820			6
<i>G.cornea</i>	0,12	SCT	1,8	750	II	feb-04	feb-04	8	7500	9825			10
<i>G.cornea</i>	0,12	SCT	1,8	750	II	feb-04	feb-04	9	7500	9520			10
<i>H.spinella</i>	0,11	CPT	1,5	1500	I	dic-03	dic-03	7	9000	10750			6
<i>H.spinella</i>	0,11	CPT	1,5	1500	II	ene-04	feb-04	7	7500	9250			5
<i>H.spinella</i>	0,11	CPT	1,5	1500	II	oct-03	oct-03	7	9000	11600			6
<i>H.spinella</i>	0,11	CPT	1,5	1500	II	oct-03	oct-03	12	9000	12280			6
<i>H.spinella</i>	0,11	RW	8	1500	II	oct-03	nov-03	6	15000	22720			10
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	14	4500	8100			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	I	nov-03	nov-03	4	4500	7120			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	I	dic-03	ene-04	20	4500	7360			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	I	ene-04	ene-04	7	4500	7820			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	I	ene-04	ene-04	15	4500	7075			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	feb-04	feb-04	8	4500	6155			6
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	3000	5945			4
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	3000	5040			4
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	5250	8160			7
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	5250	8570			7
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	7500	9630			10
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	oct-03	nov-03	6	7500	10375			10
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	nov-03	nov-03	7	5250	7640			7
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	nov-03	nov-03	7	5250	7360			7
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	nov-03	nov-03	7	7500	9740			10
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	nov-03	nov-03	8	5250	8860			7
<i>H.spinella</i>	0,11	SCT	1,8	750	II	nov-03	nov-03	8	5250	8020			7

PRACTICA Nº 2.- FICOCOLOIDES

OBJETIVOS

Demostrar y enseñar:

1. Los principios, las necesidades y la realización de una extracción de agar, carragenatos y alginatos a escala de laboratorio
2. Cuales son los parámetros de caracterización y calidad de los diferentes ficocoloides y como se determinan
3. Cuales son las aplicaciones de cada tipo de ficocoloide dependiendo de sus características físico-químicas

INTRODUCCION

Los ficocoloides son polisacáridos estructurales que se encuentran en la pared celular y en la matriz intercelular de algunas especies de Feofitas y Rodofitas. En algunos casos pueden llegar a constituir hasta el 60% del peso seco del alga, aunque en las extracciones comerciales las concentraciones oscilan entre un 20 y un 30%. Sus funciones biológicas principales son las de mantener la integridad celular y generar fuerza mecánica.

Los ficocoloides se clasifican en los siguientes tipos:

- ALGINATOS: extraídos de Feofitas (*Laminaria, Ascophyllum, Macrocytis*)
- AGAR: extraídos de Rodofitas (*Gelidium, Gracilaria*)
- CARRAGENATOS: extraídos de Rodofitas (*Chondrus, Eucheuma*)

Las aplicaciones específicas, mercado y precio de estos polisacáridos dependen de su comportamiento en soluciones acuosas.

- Todos tienen gran poder viscosante y gelificante
- Los geles de agar y carragenato son termoreversibles y presentan grandes histéresis de gelificación
- Todos los geles aumentan su dureza al disminuir la temperatura y al aumentar la concentración.

1.- AGAR

Extracción de agar de *Gelidium* y *Gracilaria*

La principal diferencia entre la extracción de agar de *Gelidium* y *Gracilaria* radica en la necesidad de efectuar una "hidrólisis alcalina" previa (con cualquier especie de *Gracilaria*) cuya función es la de aumentar la dureza del gel del agar mediante la:

- hidrólisis de grupos sulfato y
- transformación de L-Galactosa 6 sulfato en 3,6 anhidro-galactosa

1.1.- Extracción de agar de *Gelidium*

Pretratamiento: Pesar 50 g de alga seca. Introducir las algas en un vaso de precipitado con una solución de 0.5 g de CO_3Na_2 en 800 ml de agua destilada.
Calentar a 80 °C durante 20 min agitando con una varilla de cristal.
Después de los 20 min, repetir tres veces el lavado del alga con agua del grifo.

Extracción: Introducir las algas en 1.5 L de agua destilada. Ajustar el pH entre 6.5 y 7.5 con ácido fosfórico al 10%. Meter el matraz en el autoclave (1 kg cm^{-2}) durante tres horas.

Filtración: Añadir 50 g de ayuda de filtración (tierra de diatomeas) y filtrar con aire comprimido. El filtrado se vierte en una bandeja y se mete en el congelador a -20 °C.

Al día siguiente se descongelará a temperatura ambiente y luego se secará en la estufa y se molerá.

1.2.- Extracción de agar de *Gracilaria*

Pretratamiento: Pesar 65 g de alga seca. Introducir las en 1 L de una solución de NaOH al 5%. Mantener a 70°C durante 2 horas y media. Entonces lavar 3 veces durante 15 min con agua fría y una vez con 1.5 L de agua con 0.32 ml de SO_4H_2 durante 20 min.

Extracción: Meter las algas en 1.5 L de agua destilada, calentar y antes de hervir enfriar a 80°C y ajustar el pH entre 6.4-6.6 con ácido fosfórico al 10%. Picar las algas con la picadora. Hervir durante 30 min agitando con una varilla continuamente.

Filtración: Añadir 50 g de ayuda de filtración y filtrar con aire a presión. Verter el filtrado en una bandeja y congelar a -20°C. Al día siguiente se descongelará a temperatura ambiente y luego se secará en la estufa y se molerá.

1.3.- Determinación del punto de fusión y punto de gelificación

1.3.1.- Punto de fusión

- Preparar una solución al 1.5% de agar en agua destilada. Disolver en una placa calefactora a reflujo durante 30 min cuando comience a hervir.
- Poner 20 ml de la solución en un tubo de vidrio (diámetro 18 mm y 15 cm largo) y dejarlo enfriar toda la noche en posición vertical.
- Poner el tubo con el gel en un vaso de precipitado lleno con agua y calentar en una placa calefactora con agitación.
- Situar una bola de acero de 16 mm de diámetro en la superficie del gel y poner un termómetro entre 50-100 °C en el agua.
- Cuando el agar comience a fundirse, la bola caerá al fondo del tubo. Mirar la temperatura del agua.
- Sacar el tubo del agua y medir la temperatura en su interior. Esa será la temperatura de fusión.

1.3.2.- Punto de gelificación

- Sacar la bola de metal del tubo e introducir una perla de vidrio. Situar el tubo en un vaso de precipitado lleno con agua que ha sido calentada a 50°C previamente. Introducir un termómetro en el tubo.
- Poner el tubo en un ángulo de 45° y rotarlo en el sentido de las agujas del reloj. La perla de vidrio debería moverse libremente en el fondo del tubo.
- A medida que la solución se enfría, continuar girando el tubo hasta que la perla de vidrio se para. La temperatura que marca el termómetro en ese momento es la temperatura de gelificación del agar.

1.4.- Determinación de la fuerza de gel (Método Kobe con el sistema Nikan)

Por este método se mide la fuerza capaz de romper un gel de una concentración de 1.5% en 20 s.

- Preparación del gel: Preparar una solución del 1.5% de agar como se explicó previamente (T^a de fusión). La cantidad a preparar es la necesaria para formar un gel de 3 cm de espesor en una caja metálica de 6 x 30 x 4.5 cm.
- Una vez formado el gel (enfriado a temperatura ambiente) se procederá a añadir pesos sobre un pistón de 1 cm² hasta que el gel se rompa justo después de 20 s. Si el pistón rompe el gel antes de los 20 s, repetir la operación en otro espacio libre utilizando menos peso.
- El peso empleado + el peso de la pieza que contiene el pistón representan la fuerza de gel de la solución.

¿?- Calcular los rendimientos en la extracción de agar: ¿Cuales fueron los rendimientos en % del agar de *Gelidium* y *Gracilaria*?

$R_{\text{Gel}} =$ % $R_{\text{Gra}} =$ %

¿?- Cuales fueron los puntos de fusión y gelificación del agar comercial y de los extraídos durante la práctica (si es posible).

$T_{\text{FusA}} =$ °C $T_{\text{FusG}} =$ °C $T_{\text{FusGr}} =$ °C
 $T_{\text{GelA}} =$ °C $T_{\text{GelG}} =$ °C $T_{\text{GelGr}} =$ °C

¿?- Cual fue la fuerza de gel (en Nikan = g en peso) del agar comercial y de los extraídos durante la práctica (si es posible).

$F_{gA} =$ Nikan $F_{gG} =$ Nikan $F_{gGr} =$ Nikan

2.- CARRAGENATOS

2.1.- Extracción de carragenatos de *Eucheuma*

- Pesar 10 g de alga e introducirlos en una solución de CaCl_2 al 2% (200 ml). Mantenerlo en esta solución durante 1 h. De esta manera se consigue que el carragenato insoluble se separe al lavar con una mínima cantidad de agua destilada después de haber filtrado con vacío.
- Suspender el alga hidratada en 300 ml de una solución 0.1M de NaOH.
- Mantener en un baño maría a 90-95°C durante 4 h. Agitar el matraz regularmente y asegurarse que el pH de la solución es alcalino con papel indicador de pH. Añadir unas gotas de NaOH 1M si la solución se vuelve ácida.
- Después de las 4 h, añadir 20 g de tierra de diatomeas y mezclar bien. Volver a incubar en el baño maría durante 5 min.
- Filtrar con aire a presión.

2.2.- Identificación del carragenato

- Verter 50 ml de la solución en un cristizador y enfriar la solución con la ayuda de una bandeja con hielo en escamas.

¿?- ¿Cuales fueron los rendimientos en la extracción de carragenatos?

$R_A =$ % $R_B =$ %

¿?- ¿De que tipo de carragenatos se trataba?

3.- ALGINATOS

3.1.- Extracción de alginato de *Laminaria*

Materiales: 0.2N HCl, 2M NaOH, NaCl, Etanol (96 y 60%), dietileter, papel de filtro, agitadores magnéticos, barras de vidrio

- Pesar 5 g de algas secas y molidas. Suspenderlas en 250 ml de HCl (0.2N) y mantenerlas en un agitador toda la noche. Al día siguiente filtrar el contenido del matraz y lavar el residuo 3 veces con agua destilada.
- Suspender las algas en 250 ml de agua destilada y neutralizar (pH 7.0) con adición de NaOH (2M) al mismo tiempo que se agita. El proceso de neutralización es lento y hay que controlarlo bien.
- Después de asegurarse que el pH es 7.0 filtrar la solución viscosa de alginato de sodio con aire a presión, añadir NaCl para alcanzar 0.5% (w/v) y agitar para solubilizarlo.
- Añadir un volumen igual de etanol 96% mientras se agita lentamente y recuperar la fibra de alginato con una barra de vidrio. Si no se forman fibras de alginato, éste puede ser recuperado por centrifugación o filtración.
- Lavar el precipitado 2 veces con 60% etanol, 2 veces con 96% etanol y finalmente con dietileter. Dejar el alginato de sodio en una cabina de extracción para evaporar el eter. Pesar y estimar el rendimiento en % por peso seco de alga.

¿?- ¿ Cuales fueron los rendimientos obtenidos en la extracción ?

3.2.- Propiedades de gelificación de los alginatos: influencia de la concentración de alginato y los iones en solución.

- Preparar 100 ml de soluciones al 4% de alginato de *Macrocystis* y *Laminaria hyperborea* con agitación, dejarlas bastante tiempo para disolver bien el alginato.
- Preparar soluciones adicionales disolviendo con agua destilada en proporción 1:20.
- Introducir las membranas de diálisis en agua destilada durante al menos 10 min.

- Cortarlas al tamaño de los cilindros de plástico. Cerrar uno de los extremos y llenar los cilindros con las diferentes soluciones. Cerrar el otro extremo con las anillas de goma evitando que queden burbujas de aire.
- Dejar los cilindros durante toda la noche en diferentes soluciones de: 0.1M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.1M HCl y 0.1M MgCl₂.

¿?- Observa y describe lo que ocurre después de abrir y separar los cilindros.

¿?- ¿Cual es la diferencia entre las soluciones 4% y 0.2% ?

¿?- Describe los resultados de la diálisis con HCl, CaCl₂ y MgCl₂

¿?- Las diferencias entre los diferentes alginatos son:

¿?- Hervir algunos geles de alginato en agua durante 5 min. ¿Cual es la diferencia entre el alginato y los geles de agar/carragenato?

3.3.- Inmovilización con alginatos

- Preparar una solución de alginato de *Laminaria* (300 mg en 10 ml de agua destilada). Asegurarse que el polisacárido está bien disuelto.
- Mezclar a partes iguales con medio conteniendo células algales (*Spirulina*, *Chlorella* o *Dunaliella*)
- Añadir un volumen en la cámara del "bead-maker", ajustar la presión de nitrógeno para obtener perlas con talla uniforme (1-2 mm).
- Observar las perlas que se van formando al caer las gotas de alginato en una solución 0.1M de CaCl₂, mientras se agita lentamente.

¿?- Que aplicaciones se te ocurren para este tipo de inmovilización.