USO DE EFLUENTES DE CULTIVO DE PEIXES E MACROALGAS MARINHAS EM SISTEMAS DE AQUICULTURA MULTITROFICA INTEGRADA (IMTA).

USO DE EFLUENTES DE CULTIVOS DE PECES Y MACROALGAS MARINAS EN SISTEMAS INTEGRADOS DE ACUICULTURA MULTITRÓFICA (IMTA).

Raquel Viana Porto[1]
Maria Arcângela Rodrigues Ferreiira[2]
André Luiz de Oliveira Bastos[3]
Eduardo Galvão Tryers[4]
José Ribamar da Cruz Freitas Junior[5]
Javier Cremades Urgate[6]

Área Temática 6: Recursos Pesqueiros
Modalidade: Artigo Científico

Resumo
Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del IGaFA (Instituto Gallego de Formación en Acuicultura) experimentos de marzo de 2013 a diciembre de 2014, con un sistema de cultivo de macroalgas (*Saccharina latissima*) en tanques dispuestos en serie, buscando conocer la respuesta de la concentración de nutrientes en el desarrollo de *S. latissima* y su respuesta al estrés durante el cultivo en diferentes condiciones ambientales como aumento de la temperatura, la intensidad de la luz y el fotoperíodo a medida que se acerca el final de la temporada de crecimiento. Nuestros experimentos "*indoor*" demuestran ser *S. latissima* una excelente alternativa como filtro biológico en sistemas AMTI terrestres por su potencial de crecimiento y alto valor agregado de la producción obtenida. La capacidad de absorción de nutrientes de *S. latissima* en este tipo de disposición de tanques en serie es muy alta en términos de NO_3^- y PO_4^-. Aunque, en relación con NH_4^+ y NO_2^- los valores no fueron concluyentes, la capacidad de *S. latissima* para soportar condiciones ambientales estresantes recomendamos el uso de esa espécie como filtro biológico en AMTI interiores en Galicia y otras regiones templadas frías especialmente durante los meses de invierno. En escenarios de cambio climático, es probable que el estrés potencial en la acuicultura aumente con el exceso de luz y aumento de temperatura, y será necesario el uso de biofiltro, como *S. latissima*, para equilibrar la absorción de nutrientes, especialmente en regiones como el noroeste de la Península Ibérica, donde está desarrollado su cultivo.

Palavras-Chave: Sistemas AMTI, región templada fría, biofiltro, absorción de nutrientes, isótopos estables

Abstract

This research was carried out at the IGaFA (Galician Aquaculture Training Institute) facilities, experiments from March 2013 to December 2014, with a macroalgae culture system (*Saccharina latissima*) in tanks arranged in series, seeking to know the answer of the nutrient concentration in the development of S. latissima and its response to stress during cultivation under different environmental conditions such as increased temperature, light intensity and photoperiod as the end of the growing season approaches . Our "indoor" experiments show that S. latisima is an excellent alternative as a biological filter in terrestrial IMTA systems due to its growth potential and high added value of the production obtained. The nutrient absorption capacity of S. latissima in this type of series tank arrangement is very high in terms of NO_3^- and PO_4^-. Although, in relation to NH_4^+ and NO_2^- the values were not conclusive, the capacity of S. latissima to withstand stressful environmental conditions, we recommend the use of this species as a biological filter in indoor IMTAs in Galicia and other cold temperate regions, especially during the months of winter. In climate change scenarios, potential stress in aquaculture is likely to increase with excess light and increased temperature, and the use of a biofilter, such as S. latissima, will be necessary to balance nutrient uptake, especially in regions such as the northwest of the Iberian Peninsula, where its cultivation is developed.

Key words: IMTA systems, cold temperate región, biofilter, nutrient absorption, stable isotopes

1. Introdução

La industria de la acuicultura tiene un papel importante y creciente en la provisión de alimentos y medios de vida para nuestra sociedad (FAO, 2018). La acuicultura es un sector de producción de alimentos que está en constante crecimiento en el mundo, pero enfrenta muchos problemas, como la auto contaminación en relación con la sostenibilidad (Troell et al., 2009; Alexander & Hughes, 2017; Zhang et al., 2019). Los efluentes producidos en la acuicultura tradicional deterioran la calidad del agua de los ecosistemas adyacentes y ponen en peligro a los animales que viven en el área (Zhang et al., 2019). Los peces utilizan menos del 30% de los nutrientes de los piensos para su crecimiento y la cantidad restante de materia orgánica particulada y nutrientes inorgánicos están disponibles en el agua, lo que provoca eutrofización, floración de

algas nocivas y desoxigenación del agua del fondo (Irisarri et al., 2015; Martínez-Espiñeira et al., 2015, Zhang et al., 2019).

Con miras a reducir los impactos negativos causados por la acuicultura tradicional. Las laminariales son consideradas uno de los grupos de algas marinas de mayor importancia económica y ecológica en el mundo, con diversas aplicaciones comerciales, como piensos para la acuicultura y ganadería, fertilizantes agrícolas, materia prima para la producción de biocombustibles y uso medicinal (Bartsch, 2008). Una de estas algas, la Saccharina latissima es muy adaptable a amplios gradientes de latitud y profundidad. Las poblaciones de esta especie soportan condiciones ambientales muy diferentes y muestran una diferenciación ecotípica entre sus límites de distribución norte y sur en el Atlántico norte con respecto a la luz y la temperatura (Olischläger et al., 2014; Heinrich et al. 2012; Gerard, 1988).

El cultivo de algas marinas ha generado gran interés con aplicaciones potenciales en la Acuicultura Multitrófica Integrada (AMTI) (Handå et al., 2013). Muchos países están dirigidos a experimentar la integración de cultivos de peces com los de algas, moluscos, crustáceos y otros invertebrados marinos (Barrington et al., 2009). Este sistema hace que el desarrollo de la acuicultura sea sostenible al reciclar los desechos de la acuicultura como recurso alimentario a través del co-cultivo de especies en diferentes niveles tróficos (Chopin et al., 2013; Neori et al., 2017).

Peteiro et al. (2016) recomiendan el cultivo de S. latissima en la costa norte de España desde un punto de vista ambiental, y se debe promover fuertemente el cultivo de esta especie nativa. Saccharina latissima es el alga marina más comúnmente cultivada en Europa y América del Norte influenciada por las condiciones ambientales y la estacionalidad que fomentan la productividad de las algas y la calidad de la biomasa (Handå et al., 2013; Peteiro y Freire, 2013; Marinho et al., 2015; Vilg et al., 2015; Rugiu et al., 2021; Azevedo et al., 2016; Bruhn et al., 2016; Breton et al., 2018; Hasselström et al., 2018; Kim et al., 2019). La temperatura del agua de mar y la concentración de nitrógeno en el agua de mar son los principales determinantes del inicio y finalización de este cultivo en el mar. Entre los tipos de cultivo de estas algas, el cultivo

tipo cuerda colgante es más adecuado en áreas protegidas, mientras que el cultivo de cuerda horizontal es más adecuado para sitios expuestos (Peteiro et al., 2016).

Las experiencias de cultivo de Saccharina latissima en tanques en serie utilizando el efluente de un cultivo de peces, desarrollada en esta investigación se centraron en avanzar en el conocimiento de la densidad óptima de cultivo, de la influencia de la talla de las plantas sobre su tasa de crecimiento y de la capacidad de biofiltración de NH4+, NO2-, NO3- y PO4-, así como estudiar las variaciones de pH y de reserva alcalina del agua a lo largo del sistema. Por otra parte, con este sistema de tanques dispuestos en serie se pretende conocer la respuesta de la concentración de nutrientes en el desarrollo de S. latissima y su influencia sobre la respuesta al estrés que pueda sufrir la especie durante las experiencias de cultivo con respecto al efecto sinérgico del incremento de temperatura, al acercarse el final de la época de cultivo.

2. Metodologia

Emplazamiento e instalaciones, estas experiencias se encuadraron en la acción de investigación de la Consellería do Medio Rural e do Mar (Xunta de Galicia) denominada “Acción Multitróficos” y que se desarrolló desde marzo de 2013 hasta diciembre de 2014. Fueron realizadas en las instalaciones del IGaFA (Instituto Galego de Formación en Acuicultura) que se encuentra ubicado en el noroeste de la Illa de Arousa (Pontevedra), y es un centro especializado en la formación profesional dirigida al ámbito de la acuicultura y buceo profesional. El cultivo de algas se realizó en cuatro tanques tronco-cónicos dispuestos en serie y con burbujeo en el vértice del cono necesario para el necesario movimiento de las algas en suspensión. Los tanques son de 1300 cm de altura y 90 cm de diámetro y su volumen aproximado es de 250 litros (Figura 2). Son de fibra de vidrio y poseen una válvula de PVC en la base para regular y equilibrar el flujo de aire que fue suministrado por un compresor de pistón seco con un caudal de 120 l/min suficiente para alimentar los cuatro tanques mediante un anillo formado por un tubo de silicona. Esta dispensación en anillo facilita el equilibrio de burbujeo en los distintos tanques.



Figura 1. Acotaciones de los tanques de cultivo.

Los cuatro tanques se colocaron al aire libre en un lateral de la planta de cultivo de peces de las instalaciones experimentales del IGaFA de cuyo efluente se extrajo el suministro de agua para las algas.

En la salida de cada tanque se instalaron distintos tipos de filtros en los rebosaderos, todos ellos de superficie y tamaño de poro adecuado para evitar su taponamiento. En la parte final de la serie de tanques de cultivo se colocó un depósito de agua con el fin de monitorizar la sedimentación producida por el cultivo y redirigir el efluente final hacia los exteriores de las instalaciones.

El agua utilizada es el efluente de renovación del circuito semi-cerrado en que está siendo cultivado lenguado senegalés (Solea senegalensis). Dicha agua se toma antes de su paso por la serie de filtros que dispone el circuito, pero éste, al ser semi-cerrado, imposibilita recolectarla sin antes haber pasado en mayor o menor medida por los filtros de arena, “skimers” y ozonizadores con los que cuenta la instalación. El agua del efluente se almacenaba en dos bidones de 100 litros interconectados (Figura 2) y tiene un flujo muy variable y que depende de los valores registrados por las diversas sondas de CO2, pH y T situadas en la instalación. En uno de estos bidones se colocó una bomba regulada por temporizador que permite un flujo a intervalos para evitar que funcione en vacío. Esta bomba descargaba regularmente el agua del efluente contenida en los bidones en el tanque exterior de regulación de flujo situado sobre el nivel de los tanques de cultivo y con el que se conseguía racionar el agua entre los intervalos de bombeo y obtener así un flujo de alimentación del sistema prácticamente continuo y regulable en función de las necesidades.

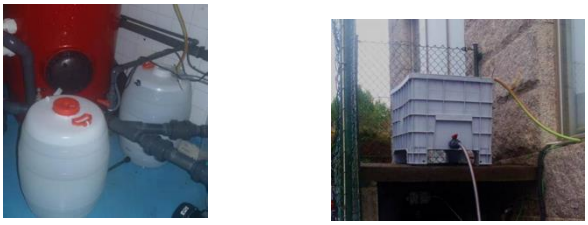


Figura 2. Depósitos almacenaje de agua dentro de las instalaciones y depósito externo antes del suministro al tanque de cabecera del circuito en serie.

A continuación, en la Figura 4 se muestra un modelo esquematizado del conjunto de las instalaciones de la experiencia. En él se aprecian todos los elementos necesarios para llevarla a cabo. Por un lado, se observan en el interior las instalaciones de cultivo de peces (1) de las que se extraía el agua del efluente mediante una bomba y que se conducía mediante una manguera (2) a los exteriores. Allí se almacenaba en el depósito (3) situado por encima del nivel de los tanques. Desde el depósito y regulada a través de una válvula se hacía circular el agua desde el tanque de cabeza mediante otra manguera (4). A continuación, se observan los tanques de cultivos colocados en serie y sus canalizaciones para el rebosamiento (5). En la parte inferior de cada uno se observa el circuito circular de aire (6) alimentado por el compresor que estaba al resguardo en la caseta (7).

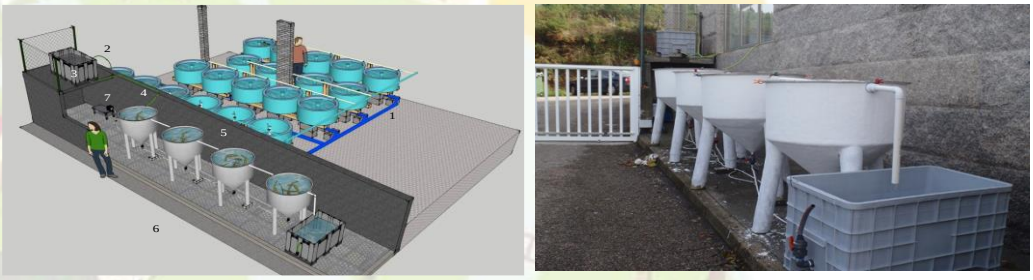


Figura 3. Esquema de la instalación y aspecto real de los tanques en serie.

El cultivo interno de peces está constituido por un sistema de 9 tanques en batería con cuatro sistemas de filtrado básicos de los cuales dos influyen en la riqueza química de los efluentes. Por un lado, están los espumadores o "skimers" que se encargan de retirar compuestos anfóteros del agua de cultivo, como son las proteínas, aminoácidos y otros compuestos de alto contenido en sustancias nutritivas para organismos vegetales. Por otro lado, tiene dos reactores de lecho

fluido con gran cantidad de bacterias nitrificantes que reducen el amonio a nitrato. También dispone de un filtro ultravioleta que, junto con el aporte de ozono, trabaja para minimización de los organismos patógenos. El sistema dispone igualmente de un filtro de tambor para la retirada de solidos del agua de entrada.

Parámetros ambientales, durante las experiencias se realizó el seguimiento de diversos parámetros ambientales en los tanques. Uno de los más importantes es el porcentaje de insolación recibido durante el día por el cultivo, parámetro que no se monitorizó in situ pero que se estimó en la segunda experiencia con los datos de la estación meteorológica próxima de Corón, a pocos kilómetros de la planta. Las variaciones de temperatura fueron monitorizadas cada 15 minutos con la ayuda de termógrafos digitales sumergibles HOBO® Pendant (Onset Computer Corporation, USA) con "data-logger" dispuestos en los tanques extremos. El pH se monitorizó a intervalos de 15 minutos en algunos períodos de tiempo de las distintas experiencias mediante el empleo de un pHmetro de campo con "data-logger" modelo Delta HD 2105.2. También se realizaron en la segunda experiencia medidas de la reserva alcalina del agua para saber o descartar si una de la causa de las disminuciones de tasa de crecimiento que se pudieran encontrar a lo largo de la misma pudieran ser debidas a la falta del nutriente esencial de todas las plantas, el CO2, o en este caso, para ser más exactos, el C inorgánico total del agua; puesto que a medida que las algas retiran CO2 del medio, el tampón carbonato lo equilibra consumiéndose así paulatinamente la reserva alcalina. Para ello se medía mediante una sonda Oxyguard la ppm de CO2 liberado en cada muestra de agua después de su acidificación. Para conocer la tasa de absorción de nutrientes las muestras del agua del efluente de los peces y del efluente del cuarto tanque de cultivo de algas fueron enviadas al Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR, Xunta de Galicia) donde con un analizador QUAATRO fueron estimadas las concentraciones de compuestos nitrogenados y sílice y con un analizador AA3 los niveles de fósforo total.

Estudios biométricos, en las distintas experiencias los muestreos fueron realizados con una cadencia más o menos semanal, cuando las plántulas eran aún muy pequeñas la estima de

densidad de planta se realizaba mediante cinco conteos aleatorios de las plantas contenidas en los dos litros de agua de una garra que era llenada por inmersión en cada tanque, teniendo en cuenta que las plántulas se encuentran homogéneamente suspendidas en el agua gracias a su constante movimiento debido al sistema de aireación central. Se recolectaba finalmente una muestra aleatoria de 30 ejemplares que servía en el laboratorio para obtener una estimación del peso total de las algas del tanque, así como de sus parámetros biométricos, obtenidos a partir de un pliego de herbario realizado con las mismas. Dichos pliegos fueron tratados con el programa Image-Pro-Plus para realizar las distintas mediciones: ancho, largo y área total de los distintos ejemplares. Una vez que las plantas adquirieron un tamaño que permitía su extracción, escurrido y cálculo de peso total, se tomaba una muestra aleatoria de un 5% del peso total para los análisis biométricos en el laboratorio. Este porcentaje en peso era igual para que el número de ejemplares retirados en cada tanque y muestreo fuera siempre equivalente.

Para la estima de la tasa de crecimiento relativo en cada tanque se utilizó la ecuación de Hunt (1982) ya señalada en capítulos anteriores. La metodología de muestreo fue distintas en las dos experiencias realizadas. En la experiencia de 2013 se diseñó principalmente para la obtención de datos significativos de la tasa de crecimiento más que para obtener valores de producción neta; por lo que, para evitar los problemas derivados de trabajar con distintas densidades de plantas, tras cada muestreo, se igualaba la biomasa de todos los tanques en función de la mínima obtenida en uno de ellos. En la experiencia de 2014, con la idea de poder conocer la máxima capacidad de carga del sistema y densidad óptima de producción, en los muestreos se procedía a retirar de cada tanque un 5% en peso de las plantas para la realización de los estudios biométricos para no influir en las densidades que se iban obteniendo en cada tanque. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico StatGraphics ®Centurion XV. Se realizó análisis del contenido en N y de la relación $\delta 15N$ de algunas de las muestras, que para ello fueron lavadas y posteriormente deshidratadas a temperatura ambiente. Estos análisis fueron realizados en el S.A.I (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña, mediante combustión en un analizador elemental EA1108 unido a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas MAT253. Esto permite valorar las concentraciones de N (con lo que se puede obtener una estima fiable del contenido proteico multiplicando por el factor 6,25

(MAFF, 1975) y la relación δ15N que nos indica la posible fuente de donde Saccharina latissima pudo obtenerlo. Valores negativos indican una fuente de síntesis química (el abono usado en el laboratorio para la producción de plántulas) y valores muy positivos indican nitrógeno de proveniencia orgánica de altos niveles tróficos

3. Resultados/Discussões

La Primera experiencia los resultados obtenidos se pueden tratar desde tres puntos de vista: las biometrías de cada uno de los grupos de plantas a intervalos de tiempo de cultivo de 7 días, el seguimiento de la evolución de la biomasa en cada tanque en esos mismos períodos y, finalmente, el estudio isotópico del nitrógeno a la par que del contenido total en N que nos permitirá conocer el grado de integración y el % proteico de los individuos. Estudio biométrico y tasas de crecimiento en las Figuras de 5 a 7 se muestran los ejemplares de la 3ª semana de cultivo, los de la última antes de la inversión (5ª semana) y los del final de la experiencia (8ª semana):

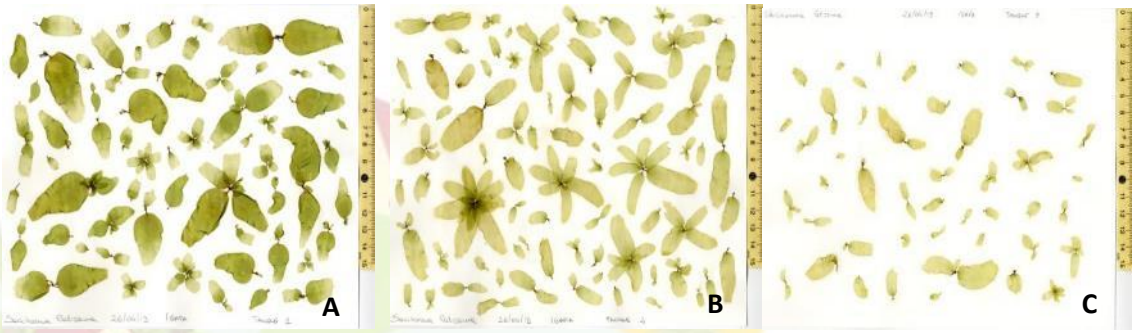


Figura 4. Aspecto de las algas del tanque 1 (A), 2 (B) y 3 (C) tras 21 días de cultivo (26/04/13).



Figura 5. Aspecto de las algas del tanque 1 (A), 2 (B) y 3 (C) tras 42 días de cultivo (17/05/13).

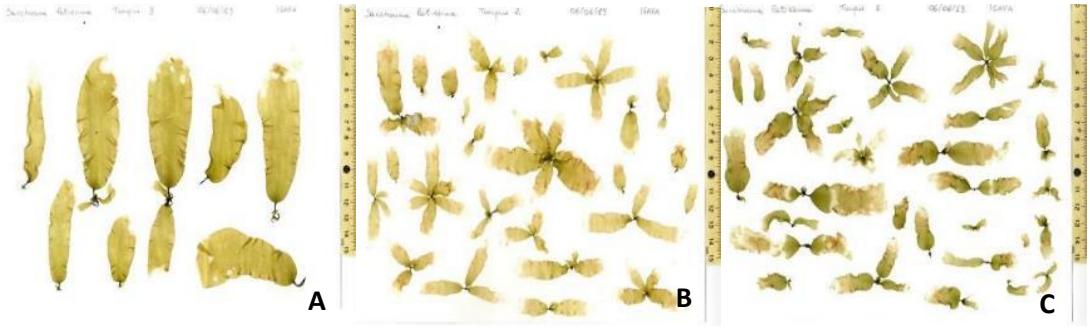


Figura 6. Aspecto de las algas del tanque 1 (A), 2 (B) y 3 (C) tras 42 días de cultivo (17/05/13).

Se puede observar en la Tabla 1 y en la Figura 8, al igual que se refleja en las imágenes anteriores, el mayor crecimiento fue en las algas del T1, sin duda por el aporte directo de nutrientes procedentes de los peces que se les ofrece a las mismas, nutrientes que parece ser secuestrados casi en su totalidad en dicho tanque visto el desarrollo de los ejemplares de los tanques consecutivos. Se observa también lo ocurrido en la inversión del T1 al T3 y viceversa a partir del 17/05/13, con un claro remonte de las algas del T3 en su nueva ubicación, lote que, como se observa al final de la experiencia, consigue retomar el crecimiento pese a las altas temperaturas.

FECHA	Tanque 1		Tanque 2		Tanque 3	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
05/04/13	14,9	5,4	14,9	5,4	14,9	5,4
19/04/13	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
26/04/13	34,4	17,9	27,5	11	19,5	9,4
03/05/13	45,3	20	30,3	12,8	27,5	10,8
10/05/13	46,1	20,8	33,2	13	28,5	12,6
17/05/13	61,1	24	30,1	12,4	29,3	11,6
Inversión algas Tanque 1 a Tanque 3 y viceversa						
24/05/13	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
30/05/13	45,1	19,3	37,8	14,2	36,2	12,5
06/06/13	63,3	22,8	29,5	11	32,8	11,7

Tabla 1. Datos biométricos medios de los 30 ejemplares mayores de cada tanque en cada fecha de muestreo. A partir del 17/05/13 las algas del tanque 3 se pusieron en el tanque 1 y viceversa.

En primera instancia se percibe una graduación en las tasas de crecimiento de las algas de los tres tanques, teniendo siempre las del T1 tasas positivas, las del T2 cercanas a cero y las del T3

siempre negativas. Estas tasas de crecimiento tan bajas o negativas son consecuencia directa de un exceso de luz y temperatura, dado que *Saccharina latissima* es en nuestras latitudes una especie de desarrollo principalmente invernal sometida a días cortos y temperaturas de unos 14º C, siendo normalmente letales temperaturas superiores a los 17º C y más con estrés lumínico (Gerard et al, 1987).

A pesar de las malas condiciones del cultivo por lo tardío de la época y las condiciones estresantes de exceso de luz y altas temperaturas es sorprendente cómo en el T1 las tasas de crecimiento se mantuvieron razonablemente altas, y esto sólo se puede explicar por el efecto compensador del estrés que, debido a los nutrientes de fácil asimilación, efecto ya señalado anteriormente por Gerard (1997). Por otra parte, estudios recientes de transcriptómica llevados a cabo en *S. latissima* reflejan la capacidad que tiene esta especie para mitigar los daños de la aceleración de metabolismo que produce el efecto sinérgico entre luz y temperatura reduciendo o aumentando ciertas rutas metabólicas encaminadas al aprovechamiento de los nutrientes existentes en el medio (Heinrich *et al.*, 2012). Este efecto compensador queda claramente de manifiesto al analizar el comportamiento de las algas del T1 y T3 al intercambiarlos de posición. Tras esta inversión, que coincidió con un fuerte aumento de la temperatura, las algas procedentes del T3, al pasar al tanque de cabecera, incrementaron su tasa de crecimiento, mientras que las algas del T1 al pasar al tanque de cola disminuyeron fuertemente su tasa de crecimiento llegando incluso a valores negativos, posteriormente ambos grupos de plantas recuperaron o mantuvieron su crecimiento por una bajada temporal de la temperatura para finalmente volver a decaer por el aumento de la misma, momento en que concluyó el experimento.

Composición química de las algas (análisis isotópico). Se realizó también un análisis del contenido en proteínas y de la relación $\delta^{15}N$ de las muestras obtenidas cada dos semanas. En las muestra la evolución de estos parámetros. Como cabría esperar las muestras del T1 son la que sin ninguna duda están captando la mayor parte de las moléculas ricas en nitrógeno y convirtiéndolo en proteínas, esto explica que tengan a la vez un mayor contenido proteico y valor de la $\delta^{15}N$. Esta hipótesis se corrobora al ver las consecuencias de la inversión de las algas de los tanques T1 y T3 el 17/05.

En el segund experimento, evolución de los parámetros ambientales, como se puede observar en la Figura 8 las mejores condiciones para el cultivo se dieron en el primer ensayo, hasta la quinta semana, más adelante se observan numerosos picos de altas temperaturas e insolación, picos que sin duda hicieron mella en el crecimiento de las algas como se verá en los resultados del segundo ensayo. Las temperaturas altas siempre van asociadas a picos altos de insolación, pero los picos bajos de insolación no tienen por qué ir asociados a bajas temperaturas.

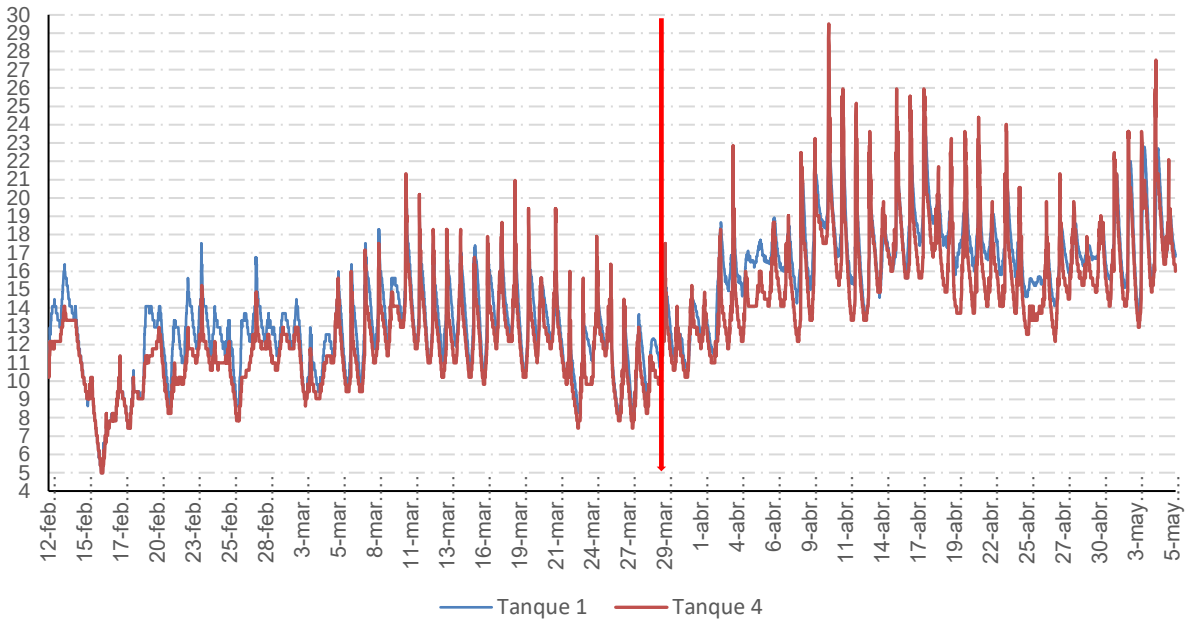


Figura 7. Evolución de la temperatura (º C) en los tanques T1 y T4 durante la segunda experiencia. La línea roja vertical indica el comienzo del segundo ensayo.

Como se puede observar en la Figura 8 en el primer ensayo apenas se aprecian diferencias entre las temperaturas del T1 y T4. En líneas generales la temperatura en este primer ensayo se mantuvo por debajo de los 17º C, temperatura crítica para el desarrollo de esta especie. Sin embargo, se observa claramente cómo durante el segundo ensayo las temperaturas fueron considerablemente más altas, llegando incluso puntualmente a valores muy cercanos a los 30º C. Junto con la intensidad lumínica y la temperatura otras variables ambientales que pueden influir en el desarrollo de las algas en los tanques son las variaciones en dos parámetros del agua muy relacionados: el pH y la reserva alcalina.

La reserva alcalina se empezó a registrar también a partir de las últimas semanas del primer

ensayo, y siempre presentó valores muy similares tanto en el efluente como en los cuatro tanques, indicando que el C inorgánico disponible por las plantas (principalmente CO_3H^-) en ningún momento fue un factor limitante para su crecimiento. La avería puntual de la bomba de suministro durante cuatro días sirvió también para la testar el funcionamiento de la medición de esta reserva, al comprobar que en esas fechas los valores de CO_2 liberados en el laboratorio por las muestras de agua de los tanques estuvieron 23 ppm por debajo de los del efluente. En el resto de la experiencia la diferencia obtenida en la concentración de CO_2 en los tanques respecto al efluente nunca supero las 8 ppm y la diferencia media se encuentra aproximadamente en 3 ppm.

Evolución de la biomasa y de los parámetros biométricos, como primer parámetro se ofrece en las biomasa total acumulada semana tras semana en los tanques durante ambos ensayos. En el primer ensayo se aprecia un rápido despunte de la biomasa del T1, lo que significa la retención en ese tanque de gran parte de los nutrientes aportados al sistema. El T2 aún presenta un moderado crecimiento sobre todo las primeras semanas, mientras que los tanques T3 y T4 claramente son deficitarios en nutrientes prácticamente desde el comienzo del ensayo. Por lo que respecta al segundo ensayo, en el que el flujo de agua fue significativamente mayor, se aprecia que los crecimientos son más parejos, quedando claramente descolgado de los demás el T4. Curiosamente en las primeras semanas de este segundo ensayo tuvieron mejor comportamiento los tanques T2 y T3 que el T1, lo que se podría explicar por el mayor estrés térmico sufrido por las algas del T1 debido a la alta temperatura del efluente y el considerable aumento de flujo que se le ha impuesto pasándolo a un total de 1800 l/día, ya que el agua que procede de la planta de peces en general tiene una temperatura cercana a los 20º C. Finalmente, llegando al límite de carga, que corresponde en esta experiencia a unos 3000 g/tanque, unos 12 kg/m^3, y sin duda por la aparición de los primeros síntomas de déficit de nutrientes, la tasa de crecimiento de las algas del T1 es la máxima, recuperando el terreno perdido.

Otra forma de estudiar la evolución del cultivo es mediante el análisis del crecimiento neto semanal y la tasa de crecimiento día. El primero es la producción semanal de biomasa neta (cosecha) y la segunda el porcentaje de incremento de biomasa del cultivo en 24 horas. Se ofrece la evolución de ambas variables en los distintos tanques a lo largo de los dos ensayos.

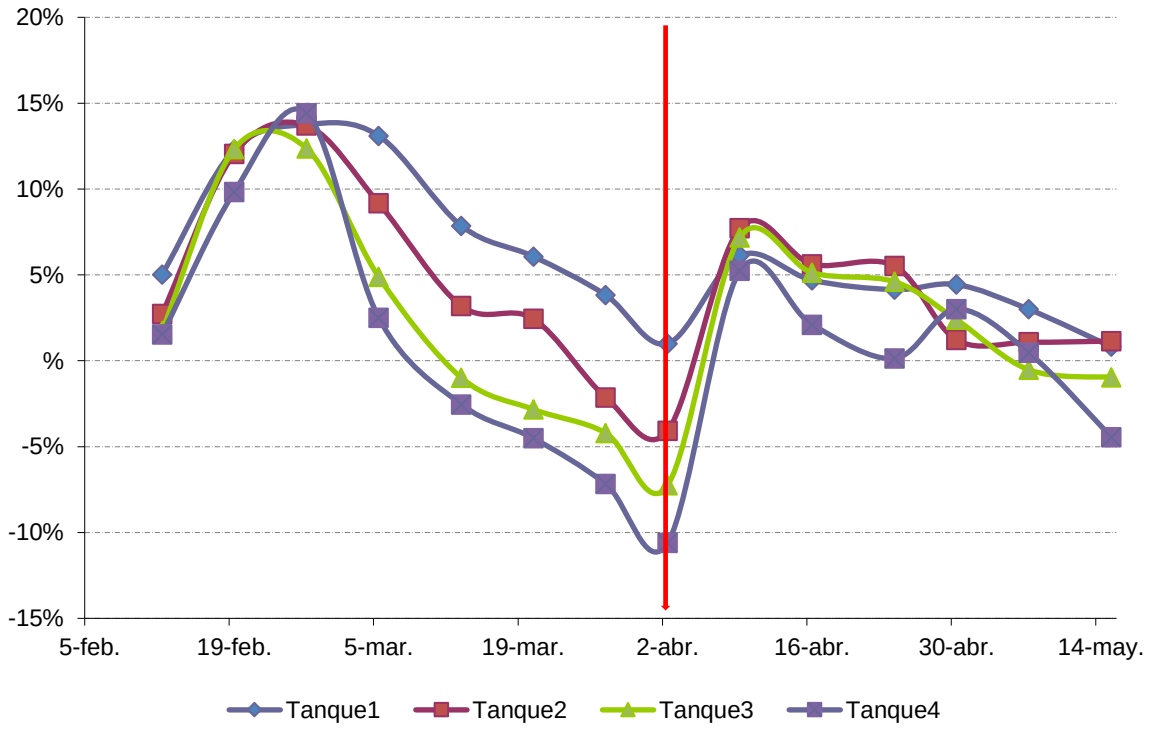


Figura 8. Evolución de la tasa de crecimiento de las algas (% día) en los tanques a lo largo de los dos ensayos. La flecha roja indica el comienzo del segundo ensayo.

Este tipo de representaciones son muy útiles para analizar la densidad óptima de cultivo en vistas a obtener el máximo de producción. Se podría así mantener la densidad de máxima producción de biomasa, que no tiene por qué coincidir con la máxima densidad de cultivo o de tasa de crecimiento. Obsérvese por ejemplo que el pico de tasa máxima de crecimiento (14,5%) para el primer ensayo se da en el T1 el 26 de febrero (Figura 20), con una densidad inicial (la semana previa) de 133,5 g y producción semanal de 214 g; mientras que el pico de máxima biomasa producida semanalmente (820 g) se da el 19 de marzo también en el T1 con una tasa de crecimiento del 6% y una densidad inicial (la semana previa) de 1.581 g, lo que viene a decir que la densidad óptima de cultivo desde el punto de vista productivo es de unos 6 kg/m^3.

En los dos ensayos juntos para apreciar mejor el nuevo arranque que se obtiene en crecimiento al repartir al comienzo del segundo ensayo los 3.000 g de *Saccharina latissima* del

T1 entre los 4 tanques. Pasando en una semana de un crecimiento del 1% al final del primer ensayo a un pico de casi un 7% en todos los tanques, crecimiento que poco a poco se van normalizando hasta llegar de nuevo a tasas cercanas al 1% cuando la biomasa vuelve a alcanzar cifras cercanas a los 3.000 g/tanque. Es de destacar que las tasas de crecimiento en condiciones óptimas están en función del tamaño de las plántulas. Mientras que las del primer ensayo (14,9 x 5,2 mm) llegan a unas tasas de crecimiento óptimo cercanas al 15%, las del segundo (133 mm x 65 mm) no superan el 7%. Este hecho no es extraño debido a que la complejidad de los tejidos va en aumento y, por ello, la relación superficie/volumen de las plantas, o lo que es lo mismo, la proporción de tejidos fotosintéticos va disminuyendo paulatinamente. Este hecho es de vital importancia a la hora de una futura programación u optimización del cultivo en función de las necesidades de biofiltración o de la utilización de la biomasa obtenida.

En cuanto a los parámetros biométricos de las plántulas se representan en diagramas de cajas agrupados los valores de los pesos de las plántulas respecto a tanque y fecha en el primer ensayo. Se observa que como pasaba con las tasas de crecimiento hay una gran diferencia de peso de las plantas del T1 respecto a la de los siguientes. Se aprecia también cómo los mayores pesos de los ejemplares se obtuvieron en los distintos tanques más tempranamente a medida que se avanza del T1 al T4, o lo que es lo mismo, que los ejemplares empezaron a degradarse antes cuanto más lejos están en la serie del tanque de cabecera. Esto indica, además, que aun aumentando la biomasa de algunos tanques los tamaños medios de las plantas descienden, hecho que se puede explicar por el aumento de la amplitud de los rangos de pesos. A medida que madura el cultivo los ejemplares presentan pesos más dispares y son los más grandes los que contribuyen en mayor medida a la biomasa total del tanque, con lo que se siguen obteniendo tasas de crecimiento positivas, aunque la media de los ejemplares disminuya. Un comportamiento similar se encuentra en el demás parámetro biométricos como el área, largo y ancho de las láminas.

Aunque aquí no se muestra los estudios de regresión lineal relacionando peso con las otras variables biométricas indican que la más representativa, con una *r* cercana al 0,95, es la variable área. Este dato es interesante de cara a futuros estudios morfológicos de plantas en cultivo,

puesto que la relación peso superficie nos puede servir también como un indicador de su estado fisiológico.

En la cajas agrupados los valores de los pesos de las plántulas respecto a tanque y fecha en el segundo ensayo. En esta gráfica se observa principalmente la ausencia de heterogeneidad en las poblaciones de los 4 tanques, apareciendo según los estadísticos solo en la parte final de la experiencia, donde el peso de las plantas del T4 es significativamente menor que en los otros tres. Estas menores diferencias entre tanques sin duda son debidas a una suma de causas. Por un lado, el mayor flujo de agua y menor tasa general de crecimiento de las plantas por su mayor tamaño y, por otro, el mayor estrés general debido a las altas temperaturas. La escala de la experiencia no permitió llevar a cabo un cultivo más longevo en el que se fueran acrecentando las diferencias entre tanques ya que en la 5ª semana de cultivo ya se sobrepasó el límite de carga de 12 kg/m^3, límite que se pudo establecer en la experiencia anterior. Composición química de las algas, el análisis de la composición en nitrógeno de las algas permite explicar mejor algunas de las variaciones biométricas observadas en las distintas experiencias y ayudan a conocer el proceso de la biofiltración y el valor comercial de la biomasa obtenida, sobre todo en lo que se refiere a su contenido proteico (Figura 23), valor que se obtiene de forma indirecta multiplicando el contenido en nitrógeno por 6,25 (Sharma et al. 2018; MAFF, 1975). Las fechas escogidas para realizar los análisis fueron a las 3 semanas de empezar el primer ensayo (en el momento de mayor tasa de crecimiento), al final de esta; al comienzo del segundo ensayo (también en el momento de mayor tasa) y en su final.

Se aprecia una vez más el despunte de las algas del primer tanque respecto a las de los siguientes. Estas algas tienen un contenido proteico inicial de cerca del 26%, lo que prácticamente triplica los datos que para esta especie se pueden encontrar en la bibliografía. Dicha diferencia, aunque con valores menos abultados, se sigue dando en todo el desarrollo del cultivo. Un dato interesante es el obtenido tras el desdoblamiento de la biomasa previo al comienzo del segundo ensayo (flecha roja); en tan solo una semana su 17% de proteínas, por el simple hecho de traslocarlos a los restantes tanques, empiezan a perderlo paulatinamente en el T3 y T4. En tan solo 5 semanas el contenido proteico de los ejemplares del T4 desciende a menos de la mitad.

Las variaciones de la relación isotópica $\delta^{15}N$ en esta segunda experiencia son difíciles de explicar ya que curiosamente, y en líneas generales, aumentan en el sentido inverso al esperado, siendo mayor en los tanques T3 y T4 que en los T1 y T2, que son los que reciben más directamente el efluente (Tabla 2). Este inexplicable efecto, que no ocurrió en la primera experiencia (quizá por el pequeño caudal de entrada de efluente) ya fue señalado anteriormente en experiencias "outdoor" en las que, paradójicamente, el aumento de la relación $\delta^{15}N$ en las algas bañadas por el efluente de una planta de cultivo de peces en tierra sólo se hace evidente a cierta distancia del punto de vertido (Carballeira et al., 2013), estos autores discuten que quizá la explicación del fenómenos sea la influencia del bajo pH de los efluentes de peces o a fenómenos de oxidación del NH_3^- a NO_3^- debidos a las bacterias. Otra posible explicación sería la naturaleza del nitrógeno del pienso utilizado para alimentar a los peces, pero lamentablemente no se tuvo la previsión de realizar su analítica.

Fecha	*Tanque1*	*Tanque2*	*Tanque3*	*Tanque4*
05/03/14	4,6	5,1	6,0	7,2
02/04/14	5,4	6,5	7,1	7,4
09/04/14	3,6	3,8	4,6	5,8
15/05/14	4,1	5,4	6,8	7,5

Tabla 2. Valores de la relación $\delta^{15}N$ obtenidos en los diferentes tanques (‰).

Química del agua, otro de los objetivos de esta segunda experiencia fue el estudio de la evolución de los nutrientes fundamentales (nitratos y fosfatos) y la capacidad de biofiltración de los mismos por parte de las algas. El seguimiento de nutrientes entrantes solo se pudo analizar en el primer ensayo. Cabe destacar que tan solo 250 g de plantas repartidas en los 4 tanques casi agotan las 3,5 ppm de NO_3^- del efluente. Los niveles de PO_4^-, aunque mucho más bajos que los de nitrato en el efluente, también son mitigados casi en su totalidad en todos los muestreos realizados. De la biofiltración de nitrito y amonio no se pudo obtener resultados concluyentes debido a su presencia prácticamente residual; esto es debido es debido a los potentes filtros de lecho fluido cargados con bacterias desnitrificantes del sistema que optimizan las condiciones de cultivo de los peces en el circuito semi-cerrado del interior de la

planta.

4. Considerações Finais ou Conclusão

Estas nuevas experiencias "indoor" realizadas con *Saccharina latissima* vuelven a demostrar que esta especie puede ser una alternativa usada como filtro biológico en sistemas de AMTI en tierra por su potencial tasa de crecimiento y valor añadido medio-alto de la producción obtenida.La tasa de crecimiento de *S. latisima* está en relación inversa al tamaño de las plantas. Esta tasa se ve, además, muy influenciada por las altas temperaturas y el aumento del fotoperiodo, aunque gracias a las grandes variaciones noche-día de la temperatura del agua en los tanques y la posibilidad de sombreado, este tipo de cultivos se pueden prolongar más en el tiempo que los de mar abierto.

5. Referências Bibliográficas

Alexander, K. A. & Hughes, A. D. (2017). A problem shared: technology transfer and development in European integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Aquaculture*, 473, 13-19.

Azevedo, I. C., Duarte, P. M., Marinho, G. S., Neumann, F., & Sousa-Pinto, I. (2019). Growth of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) cultivated offshore under exposed conditions, *Phycologia*, 58, 504–515.

Barrington, K., Chopin, T., & Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In D. Soto (Ed.) Integrated mariculture: a global review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529. Rome, FAO, pp 7–46.

Bartsch, I., Wiencke, C., Bischof, K., Buchholz, C. M., & Buck, B. H., Eggert, A. et al. (2008). The genus Laminaria sensu lato: recent insights and developments, *Eur. J. Phycol.*, 43, 1–86.

Breton, T. S., Nettleton, J. C., O'Connell, B., Bertocci, M. (2018). Fine-scale population genetic structure of sugar kelp, (Laminariales, Phaeophyceae), in eastern Maine, USA. *Phycologia*, 57(1), 32–40.

Bruhn, A., Tørring, D. B., Thomsen, M., Canal-Vergés, P., Nielsen, M. M., Rasmussen, M. B., Eybye, K. L., Larsen, M. M., Balsby, T. J. S., & Petersen, J. K. (2016). Impact of environmental conditions on biomass yield, quality, and bio-mitigation capacity of Saccharina latissima. *Aquac Environ Interact*, 8, 619–636.

Chopin, T., MacDonald, B., Robinson, S., Cross, S., Pearce, C., Knowler, D. & Hutchinson, M. (2013). The Canadian integrated multitrophic aquaculture network

(CIMTAN) - A network for a new era of ecosystem responsible aquaculture. *Fisheries*, 38, 297-308.

Freitas, J. R. C., Salinas Morrondo, J. M. & Cremades Ugarte, J. (2016). *Saccharina latissima* (Laminariales, Ochrophyta) farming in an industrial IMTA system in Galicia (Spain). *J Appl Phycol*, 28, 377–385. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0526-4.

Gerard, V. A. (1988). Ecotypic differentiation in light-related traits of the kelp Laminaria saccharina, *Mar. Biol.*, 97, 25–36.

Gerard, V. A. (1997). The role of nitrogen nutrition in high-temperature tolerance of the kelp, *Laminaria saccharina* (Chromophyta). *Journal of Phycology*, 33, 800-810.

Handå, A., Forbord, S., Wang, X., Broch, O. J., Dahle, S. W., Størseth, T. R., Reitan, K. I., Olsen, Y., & Skjermo, J. (2013). Seasonal- and depth-dependent growth of cultivated kelp (Saccharina latissima) in close proximity to salmon (Salmo salar) aquaculture in Norway, Aquaculture 414-415 (2013) 191–201.

Kim, J. K., Kraemer, G., & Yarish, C. (2019). Evaluation of the metal content of farm grown *Gracilaria tikvahiae* and *Saccharina latissima* from Long Island Sound and New York Estuaries. *Algal Res*, 40,101484

Hasselström, L., Visch, W., Gröndahl, F., Nylund, G. M., & Pavia, H. (2018). The impact of seaweed cultivation on ecosystem services - a case study from the west coast of Sweden. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 53-64. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.005.

Heinrich, S., Valentin, K., Frickenhaus, S., John, U., & Wiencke, C. (2012). Transcriptomic analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae), *PLoS One*, 7, e44342.

Hunt, R. (1982); Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. London: E. Arnold, pp. 248. Cambridge University Press; Revised ed, (1 jan 1991) MAFF. (1975). *Energy allowances and feeding systems for ruminants.* Technical Bulletin 33. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. HMSO, London.

Marinho, G. S., Holdt, S. L., Jacobsen, C., & Angelidaki, I. (2015). Lipids and composition of fatty acids of *Saccharina latissima* cultivated year-round in integrated multi-trophic aquaculture, *Mar Drugs*, 13, 4357–4374.
Monteiro, J. P., Melo, T., Skjermo, J., Forbord, S., Broch. O. J., Domingues, P., Calado, R., & Domingues, M. R. (2021). Effect of harvesting month and proximity to fish farm sea cages on the lipid profile of cultivated *Saccharina latissimi. Algal Research*, 54, 102201. DOI: https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102201

Neori, A., Shpigel, M., Guttman, L., & Israel, A. (2017). Development of polyculture and integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Israel: a review. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 69, 1-19.

Olischläger, M., Iñiguez, C., Gordillo, F. J. L., & Wiencke, C. (2014). Biochemical composition of temperate and Arctic populations of *Saccharina latissima* after exposure to increased pCO_2 and temperature reveals ecotypic variation. *Planta*, 240, 1213–1224.

Peteiro, ´C. & Freire, O. (2013). Biomass yield and morphological features of the seaweed *Saccharina latissima* cultivated at two different sites in a coastal bay in the Atlantic coast of Spain, *J. Appl. Phycol.*, 25, 205–213.

Peteiro, C., Sanchez, N., & Martínez, B. (2016). Mariculture of the Asian kelp Undaria pinnatifida and the native kelp *Saccharina latissima* along the Atlantic coast of southern Europe: an overview. *Algal Res.*, 15, 9–23.

Sharma, S., Neves, L., Funderud, J., Mydland, L. T., Øverland, M., & Horn, S. J. (2018). Seasonal and depth variations in the chemical composition of cultivated *Saccharina latissimi*. *Algal Res*, 32, 107–112.

Rugiu, L., Hargrave, M, S., Enge, S., Sterner, M., Nylund, G. M., & Pavia. H. (2021). Kelp in IMTAs: small variations in inorganic nitrogen concentrations drive different physiological responses of *Saccharina latissima*. *Journal of Applied Phycology*, 33, 1021–1034. DOI: https://doi.org/10.1007/s10811-020-02333-8

Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., & Fang, J. G. (2009). Ecological engineering in aquaculture-potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297, 1-9.

Vilg, J.V., Nylund, G. M., Werner, T., Qvirist, L., Mayers, J. J., Pavia, H., Undeland, I., & Albers, E. (2015). Seasonal and spatial variation in biochemical composition of *Saccharina latissima* during a potential harvesting season for Western Sweden. *Bot Mar*, 58, 435–447