

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y CRECIMIENTO DE *Ulva sp.* ANTE LA VARIACIÓN EN LAS CONDICIONES DE SU CULTIVO EN ESTANQUES COMERCIALES”

TESIS

QUE PARA OBTENER PARCIALMETE LOS REQUISISTOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

STEPHANIE REVILLA LOVANO

Ensenada, Baja California, México
Agosto, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

MAESTRÍA EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y CRECIMIENTO DE *Ulvasp.* ANTE LA VARIACIÓN EN LAS
CONDICIONES DE SU CULTIVO EN ESTANQUES COMERCIALES

TESIS

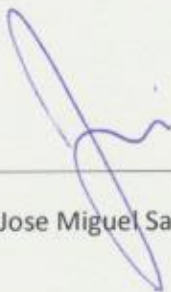
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

STEPHANIE REVILLA LOVANO

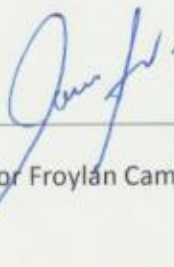
Aprobada por



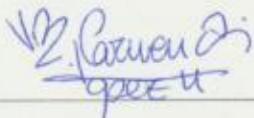
Dr. Jose Miguel Sandoval Gil



Dr. José Antonio Zertuche González



Dr. Víctor Froylán Camacho Ibar



Dra. María del Carmen Ávila López

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y CRECIMIENTO DE *Ulva* sp. ANTE LA VARIACIÓN EN LAS CONDICIONES DE SU CULTIVO EN ESTANQUES COMERCIALES

Resumen

El cultivo de *Ulva* sp. en estanques se ha desarrollado como alternativa a la explotación de mantos naturales. Esto debido a que en el océano las algas están sujetas a distintos factores que limitan su crecimiento y, por tanto, el cultivo tierra adentro puede significar un aumento en la productividad. Sin embargo, los cambios en las condiciones del cultivo (i.e. incrementos en biomasa; cambios de temperatura) podrían desviar la producción del alga de su óptimo deseado. Entender cómo influyen estos cambios de las condiciones del cultivo en la fisiología y el crecimiento de *Ulva* sp. puede ayudar a desarrollar estrategias de optimización del sistema de cultivo y mejorar la productividad. El objetivo principal de este estudio fue evaluar las respuestas fisiológicas y la plasticidad fisiológica de *Ulva* sp. bajo condiciones cambiantes dentro de estanques de 40 m³, durante un ciclo de cultivo (4 semanas; a una siembra de 1kg PF m⁻³), con la finalidad de generar información necesaria para incrementar la productividad y optimizar el sistema de cultivo. Durante el periodo experimental se realizaron medidas de crecimiento, fotosíntesis, respiración, fluorescencia de la clorofila *a*, capacidad antioxidante, pigmentos y composición proximal. Simultáneamente se monitorearon la irradiancia, la temperatura, el pH y la concentración del fertilizante usado (i.e. nitrógeno inorgánico disuelto (NID)). Adicionalmente, se realizaron experimentos cortos en laboratorio para evaluar los efectos del incremento de la temperatura y el pH, por separado, en la fisiología de *Ulva* sp. (fotosíntesis, incorporación de N), simulado ciclos diarios. También se determinaron las cinéticas de incorporación de NID (amonio y nitrato) con el fin de evaluar a capacidad de *Ulva* sp. para incorporar el fertilizante añadido durante el cultivo. Los resultados mostraron que la disminución de la luz disponible dentro de los estanques como el incremento en pH (i.e., reducción del CID disponible para fotosíntesis), en conjunto con las variaciones de la temperatura y el NID, provocaron cambios graduales en las respuestas fisiológicas de *Ulva* sp., sin embargo, estos cambios fueron significativos en la tercera semana de cultivo (S3). de cultivo. En general, *Ulva* sp. redujo sus tasas fotosintéticas de manera significativa durante el ciclo de cultivo, lo que pudo estar relacionado con una disminución en el contenido de nitrógeno y carbohidratos. El decremento en la productividad se reflejó en una disminución de ~ 50% en el rendimiento del cultivo a partir de S3. *Ulva* sp. mostró procesos de fotoaclimatación ante el estrés en la disminución de luz aumentando la concentración de sus pigmentos fotosintéticos. Esta plasticidad fisiológica pudo provocar que *Ulva* sp. tuviera buenas tasas de crecimiento durante todo el ciclo de cultivo, a pesar de la reducción en su rendimiento. Por otro lado, *Ulva* cambio su capacidad antioxidante durante el ciclo de cultivo, principalmente como consecuencia de los cambios en la irradiancia. Respecto a la concentración de NID en los estanques, fue evidente la preferencia de *Ulva* sp. por la incorporación del amonio sobre el nitrato; la incorporación de nitrato también se vio afectada por la presencia de amonio. En los experimentos de laboratorio los aumentos de PH y temperatura en ciclos cortos disminuyeron las tasas fotosintéticas y la incorporación de nitrato. Los resultados de este estudio aportaron información para la optimización del cultivo. Se eligió un periodo de cosecha en la S3 para regresar a las condiciones iniciales del cultivo, cuando la productividad es mayor. También se implementaron mejoras en la fertilización con nitrato, que debe ser en ausencia de amonio y durante las mañanas, cuando la temperatura y el pH son más bajos.

PHYSIOLOGICAL RESPONSES AND GROWTH OF *Ulva* sp. UNDER CHANGING CULTIVATION CONDITIONS IN PILOT LAND-BASED PONDS

Abstract

Ulva cultivation in commercial land-based ponds has been developed as an alternative to the natural mantles exploitation. In the ocean, the seaweeds are subject to different factors that limit their growth, for that reason, land-based ponds cultivation can increase productivity. However, changes in culture conditions (i.e. increases in biomass; temperature changes) could divert algae production from its desired optimum. How these changes in culture conditions influence the physiology and growth of *Ulva* can help develop culture system optimization strategies and improve productivity. The main objective of this study was to evaluate the physiological responses and physiological plasticity of *Ulva* sp. under changing conditions within 40 m³ ponds, during a culture cycle (4 weeks; stocking at 1kg PF m⁻³), to generate information to increase productivity and optimize the cultivation system. During the experimental period, growth, photosynthesis, respiration, chlorophyll a fluorescence, antioxidant capacity, pigment and proximal composition measurements were made. Simultaneously the irradiance, temperature, pH and concentration of the fertilizer used (i.e. dissolved inorganic nitrogen (NID)) were monitored. Additionally, short laboratory experiments were performed to assess the effects of temperature and pH increase, separately, on the physiology of *Ulva* sp. (photosynthesis, incorporation of N), simulated daily cycles. Uptake kinetics of NID (ammonium and nitrate) were also determined to evaluate the capacity of *Ulva* sp. to incorporate the fertilizer used during cultivation. The results showed that the decrease in available light within the ponds such as the increase in pH (i.e. reduction of the available CID for photosynthesis), together with the variations in both temperature and NID, caused gradual changes in the physiological responses of *Ulva* sp., However, these changes were significant in the third week of culture (W3) of cultivation. In general, *Ulva* sp. reduced its photosynthetic rates significantly during the culture cycle, which could be related to a decrease in the content of nitrogen and carbohydrates. The reduction in productivity was reflected in a ~ 50% decrease in yield from W3. *Ulva* sp. showed photoacclimation processes due to the decrease of light, increased the concentration of all its pigments for more light absorption. This physiological plasticity could cause *Ulva* sp. to had good growth rates throughout the crop cycle, despite the reduction in yield. On the other hand, *Ulva* changed its antioxidant capacity during the culture cycle, mainly as a result of changes in irradiance. Regarding the concentration of NID in the ponds, *Ulva* sp. had a preference for ammonium acquisition over to nitrate; nitrate incorporation was also affected by the presence of ammonium. In laboratory experiments, increases in pH and temperature in short cycles decreased photosynthetic rates and the uptake of nitrate. The results of this study provided information for crop optimization. A harvest period in W3 was chosen to return to the initial conditions of the culture when productivity is higher. Improvements were also implemented in nitrate fertilization, which should be in the absence of ammonium and during the mornings when the temperature and pH are lower.

Dedicatoria

“A veces me siento como una hoja en un torrente: puede girar, entrar en un torbellino o voltearse, pero siempre va hacia adelante”
(Jaques Paulin. *Volkswagen Blues*)

A mi abuela-madre **Paula**, tú que me enseñaste el poder del amor a la familia y a ser una mujer fuerte. Vivirás por siempre en el infinito amor, las enseñanzas y la sabiduría que nos brindaste.

Agradecimientos

Cumplir metas implica esfuerzo, determinación, disciplina y sobre todo amor por tus sueños. Sin embargo, gran parte del impulso de seguir adelante viene del apoyo y motivación de aquellos que te rodean. Durante toda mi carrera profesional he tenido la fortuna de rodearme de grandes seres humanos, todos contribuyendo de manera especial a mi crecimiento. Es por eso que no puedo hacer más que expresarles a todos y cada uno mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia. A mis padres, Raúl y Mónica, que siempre me han alentado a perseguir mis metas y, sin titubear, me han apoyado hasta el final. Quiero que sepan que haga lo que haga, jamás podré compensarles todo lo que me han dado. Este logro es tan mío como de ustedes, los amo con todo el corazón. También agradezco infinitamente a mis hermanos Raúl, Erick y Paulina que, a pesar de la lejanía, siempre me apoyaron y me motivaron. A mis sobrinos Ximena, Constanza, Sofía y Raúl, que son mi gran motor para ser siempre el mejor ejemplo a seguir y, sobre todo, guiarlos para que siempre luchen por sus sueños. También quiero agradecer a mi hermana de otra madre, Fernanda, que me ha apoyado durante diez años, siempre alentándome a ser la mejor versión de mí; Fer, gracias por enseñarme el valor de la amistad, de la humildad y de siempre seguir mis sueños. A mi familia adoptiva de Guadalajara: Sra. Marina, Sr. Marco, Eva y Marina, gracias por adoptarme y ser un gran ejemplo de vida. Y a ti Roberto, que me has ayudado a mantenerme positiva en momentos difíciles, gracias por acompañarme en esta recta final, brindándome tu amor y tu apoyo.

Hay personas a las que es difícil agradecer, ya que han hecho de guías, amigos y compañeros de trabajo. Primero está mi director de tesis Jose Sandoval. Jose, siempre estaré agradecida por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto, gracias por haber estado ahí de principio a fin, por la paciencia, por haber sido guía y maestro, por todo el conocimiento, pero sobre todo gracias por impulsarme a ser mejor, me ayudaste a enfrentarme a uno de mis miedos más grandes: estar frente al público; lo que empezó como un seminario de posgrado, terminó en un congreso en Corea. También quiero agradecer al Dr. Zertuche, que me ha acogido en su equipo de trabajo desde hace ya cuatro años, lo que me ha permitido dedicarme a la fisiología y el cultivo de macroalgas, uno de mis más grandes sueños. Doctor, muchas gracias por todas las oportunidades que me ha brindado, estaré eternamente agradecida. Y también quiero agradecer de todo corazón a Laura y Mar, mil gracias por sus consejos, por su

compañerismo, por sus regaños, por su enorme apoyo en el laboratorio, pero sobre todo infinitas gracias por su amistad, mi vida no sería la misma si no las hubiera conocido.

La culminación de este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo de un gran equipo de trabajo, por eso agradezco de todo corazón a todos mis compañeros del Laboratorio de Botánica Marina. A mis alumnas de servicio social, Andrea y Sandra, que me apoyaron con el arduo trabajo de procesamiento de muestras en el laboratorio. Pero, sin lugar a dudas, quiero hacer un agradecimiento especial a Isaac Sosa e Isaac Gálvez, por su trabajo en pozas y por sacrificar sus tardes para apoyarme en mi proyecto de tesis, infinitas gracias. También quiero agradecer a Jaime y a Maridol por las aportaciones a mi proyecto de tesis y la calidez de su compañía, disfruté mucho trabajar con ustedes. Y por supuesto al resto de mi comité: el Dr. Camacho y la Dra. Mary Carmen, muchas gracias por su apoyo y contribución a mi trabajo.

Los amigos son la sal de la vida, sin ellos éste camino no hubiera sido el mismo. Primero que nada, quiero agradecer a “los Misfits”: Adrián, Chris y Jere, por todas esas reuniones y diversión que les añadieron a estos dos años de maestría. También a mi compañera de maestría, pero sobre todo entrañable amiga, Alejandra, muchas gracias por la amistad y el apoyo que me has brindado. A mis amigos que siempre han permanecido a mi lado a pesar de la distancia. A Tere, amiga, en las ocasiones en las que sentía que era demasiado, pensaba en ti, siempre me enseñaste el valor del trabajo y la perseverancia. A Ángel, mi mejor amigo, mi hermano, gracias por tu infinita amistad. A Gus, gracias por todo el apoyo, por las llamadas, por siempre escucharme, tú sabes lo mucho que te quiero. A Jony, a pesar de las pocas veces que hablamos, siempre sentí tu apoyo y amistad. Y, por último, pero no menos importante, a mis hermanitos de Ensenada Elías, Mariela, José, Homar e Iván, gracias por ser mi familia por estos cinco años.

No me queda más que agradecer a la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme realizar mis estudios de maestría y permitirme la oportunidad de conocer grandes investigadores y valiosos estudiantes que contribuyen a diario con mi crecimiento personal y profesional.

Este proyecto fue posible por la aportación económica de los siguientes proyectos e instituciones:

Muchas gracias a CONACyT por la beca brindada por estos dos años de maestría

Muchas gracias a la empresa PROMAC y la empresa *Blue evolution* por su apoyo económico y equipo proporcionado

Muchas gracias a Proyecto PROMEP-NPTC del Dr. Jose Sandoval por el apoyo económico brindado

Y, por último, un agradecimiento especial al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), directivos, secretarias e investigadores, por todo su apoyo, amabilidad y humildad. Gracias también por el apoyo económico para la asistencia al congreso IX Simposio Internacional del Carbono en México 2018 en Álamos, Sonora y al International Seaweed Symposium 2019 en Jeju, Corea.

Contenido

Resumen	iii
Abstract	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.2 Hipótesis	6
1.4 Objetivos	6
1.4.1 Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1. Evaluación <i>in situ</i> de las respuestas fisiológicas y crecimiento de <i>Ulva</i> sp. durante su cultivo en estanques piloto comerciales (<i>Exp. 1</i>).....	8
2.1.1. Descripción de los estanques piloto.....	8
2.1.2. Diseño experimental.....	9
2.1.3. Variables fisicoquímicas.....	9
2.1.4. Fotosíntesis y Respiración	10
2.1.5. Pigmentos.....	11
2.1.6. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	11
2.1.7. Composición proximal.....	14
2.1.8. Capacidad Antioxidante	15
2.1.9. Crecimiento.....	16
2.1.10. Cinéticas de incorporación de NID.....	17
2.2. Efectos en <i>Ulva</i> sp. de incrementos de temperatura y pH bajo condiciones controladas de laboratorio (<i>Exp. 2</i>).....	19
2.3. Análisis estadísticos.....	20
Capítulo 3. Resultados.....	22
3.1. Evaluación <i>in situ</i> de las respuestas fisiológicas y crecimiento de <i>Ulva</i> sp. durante su cultivo en estanques piloto comerciales (<i>Exp. 1</i>).....	22
3.2. Efectos en <i>Ulva</i> sp. de incrementos de T y pH bajo condiciones controladas de laboratorio (<i>Exp. 2</i>).....	35
Capítulo 4. Discusión.....	37
4.1 Respuestas fisiológicas y de crecimiento de <i>Ulva</i> sp. bajo las condiciones de su cultivo.....	37

4.2 Cinéticas de incorporación de NID en <i>Ulva</i> sp.....	48
Capítulo 5. Conclusiones	51
5.2 Consideraciones para el cultivo de <i>Ulva</i> sp.	52
Literatura citada	53
ANEXOS.....	62
Anexo 1. ANOVAS ANIDADOS DE UNA VÍA.....	62
Anexo 2. REGRESIONES LINEALES	63

Lista de figuras

Figura 1 Unidad Acuícola Piloto Comercial (UAPC).....	5
Figura 2. Parámetros físico-químicos medidos en las estanques de cultivo de <i>Ulva</i> sp.	¡Error!
Marcador no definido.	
Figura 3. Gráfico resultante de la ordenación MDS.....	25
Figura 4. Variación de Fotosíntesis, respiración y pigmentos de <i>Ulva</i> sp.....	28
Figura 5. Variación de los parámetros fotoquímicos de <i>Ulva</i> sp.....	29
Figura 6. Variación de contenido proximal de <i>Ulva</i> sp.....	30
Figura 7. Variación de la capacidad antioxidante de <i>Ulva</i> sp.	31
Figura 8. Variación del crecimiento específico y el rendimiento de <i>Ulva</i> sp	32
Figura 9. Cinéticas de incorporación de NO_3^- y NH_4^+	33
Figura 10. V_{amb} , Consumo, y concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- por <i>Ulva</i> sp.....	34
Figura 11. Variación de fotosíntesis, respiración e incorporación de NO_3^- por <i>Ulva</i> sp. ante incrementos de pH y temperatura	35

Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros físico-químicos medidos en las estanques de cultivo de referencia.....	23
Tabla 2. Resultados del análisis PERMANOVA anidado	26
Tabla 3 . Resultados del análisis DISTLM.....	26
Tabla 4. Variación de los descriptores de fotoquímica y concentración de pigmentos de <i>Ulva</i> sp. en respuesta a incrementos de pH y temperatura.....	36
Tabla 5. Comparación entre TCE (% PF d ⁻¹), Rendimiento (g PF m ⁻² d ⁻¹) de <i>Ulva</i> sp. en diferentes estudios.....	47

Capítulo 1. Introducción

El uso comercial de *Ulva* es una realidad en muchas partes del mundo (Buschmann *et al.* 2017). El interés comercial por *Ulva* sp. está estimulado principalmente por su potencial como alimento humano, ya que actualmente existen diversos estudios donde se demuestra ser una rica fuente de nutrientes esenciales (Maehre *et al.* 2014; Yaich *et al.* 2011; Santos *et al.* 2015; Rohani-Ghadikolaei *et al.* 2012), de una gran cantidad de metabolitos bioactivos de la familia de los carotenoides (Vázquez-Rodríguez y Amaya-Guerra 2016), de aminoácidos (Fleurence *et al.* 1995; Ortiz *et al.* 2006) y ácidos grasos (Ivanova *et al.* 2013; El Maghraby y Fakhry 2015; Kendel *et al.* 2015); además contienen un tipo particular de polisacáridos sulfatados (i.e., Ulván) a los que se atribuyen una notable actividad anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana (Robic *et al.* 2009; Lahaye y Robic 2007; Hernández-Garibay, Zertuche-González, y Pacheco-Ruíz 2011).

Se ha constatado que el aprovechamiento de las poblaciones naturales presenta importantes limitaciones. En el océano, las macroalgas se encuentran sometidas a cambios en las condiciones ambientales. Estas variaciones pueden ser tanto estacionales como resultantes de eventos climáticos como el Niño (Pacheco-Ruíz *et al.* 2003) e incluso por el cambio climático global (Harley *et al.* 2012). El efecto de estos cambios puede provocar una disminución, desplazamiento o la completa desaparición de las poblaciones naturales. Otro factor limitante es la ausencia de estabilidad en la calidad nutricional de los tejidos, ya que viene determinada por la concentración de nutrientes en el medio, la biología estacional del alga, la presencia de epibiontes, o la presión por herbivoría, entre otros factores (Chapman 1990; Zertuche-González *et al.* 2009; Harris y Jones 2005; da Gama *et al.* 2008). Es por esto que la industria basada únicamente en la explotación directa de mantos de esta especie no parece conveniente.

Como alternativa a la extracción de las poblaciones naturales, se encuentra el cultivo intensivo en tanques tierra adentro que, a diferencia del mar abierto, permite un mayor control de factores clave como la calidad de agua y la disponibilidad de nutrientes; además, los estanques de cultivo permiten una mayor protección frente a depredadores y evitan la competencia con otras especies de macroalgas oportunistas (Hafting *et al.* 2012). De esta forma, estos sistemas son capaces de mejorar la productividad, la calidad del tejido, e incluso estabilidad en los componentes celulares con aplicaciones biotecnológicas (Mendoza *et al.* 2018; Lapointe y Ryther 1979; Capo *et al.* 1999; Mhatre *et al.* 2018; Abreu *et al.* 2011; Bolton *et al.* 2009; Mata *et al.* 2016; Lapointe y Tenore 1981). Los sistemas ampliamente utilizados en el género *Ulva* sp. son los que consisten en circulación de agua semi-cerrada (Lapointe y Tenore 1981, Duke *et al.* 1989, Vandermeulen 1989, Msuya y Neori 2008, Al-Hafedh *et al.* 2015). En estos sistemas las algas están en suspensión continua por efecto de aireación desde el fondo, por lo que también son conocidos como “cultivos por volteo” (DeBusk y Ryther 1984, Bidwell *et al.* 1985). La alta productividad de esta especie en este tipo de cultivo es debida a que, por su morfología, el sistema permite que las macroalgas pasen continuamente del fondo a la superficie y de este modo puedan aprovechar la mayor cantidad de luz incidente en la superficie; el movimiento también ayuda a evitar gradientes y que los nutrientes y la temperatura se distribuyan de manera homogénea a través de la poza (Bidwell *et al.* 1985). A pesar del mayor control de las condiciones de cultivo que se puede tener en sistemas semi-cerrados, estos también pueden suponer distintos aspectos negativos. Por ejemplo, el crecimiento de la biomasa de *Ulva* sp. a lo largo de un ciclo de cultivo puede producir auto-sombreamiento, lo que limita al alga de irradiancia suficiente para una fotosíntesis óptima; el aumento de biomasa dentro de los estanques también puede resultar en una condición de limitación del carbono inorgánico disuelto (CID) disponible para procesos fotosintéticos y

determinante para su productividad (Al-Hafedh, Alam, y Buschmann 2015; Cohen y Neori 1991; Mendoza *et al.* 2018). En sistemas semicerrados tierra adentro, la temperatura es otro factor difícil de controlar, y que puede tener impactos nocivos a nivel del metabolismo del alga (i.e., fotosíntesis, respiración, incorporación de nutrientes) (Koch *et al.* 2013; Duke, Litaker, y Ramus 1989).

La evaluación de las respuestas fisiológicas de plantas terrestres frente a condiciones cambiantes ambientales ha sido, durante décadas, una herramienta básica para incrementar la productividad de especies en cultivo (Pessaraki 2001, Abbas *et al.* 2018). Son clásicos los ejemplos de las respuestas en fotosíntesis, osmoaclimatación, crecimiento y rendimiento ante cambios de temperatura (Baker 2008, Bibi *et al.* 2008, Murchie *et al.* 2009), disponibilidad de nutrientes (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010; Römheld y Kirkby 2010; Makino 2011), o estrés hídrico (Osakabe *et al.* 2014; Galmés, Medrano, y Flexas 2007; Bohnert y Jensen 1996), entre otros. Para el caso del cultivo del cultivo de macroalgas éste es un tema que, si bien ha sido explorado desde hace años, la información generada es aún escasa, por lo que precisa de un mayor esfuerzo de investigación (Buschmann *et al.* 2017).

Estudios han evaluado tanto las limitantes como el potencial de *Ulva* sp. en distintos sistemas de cultivo semi-cerrados. En ellos se ha evaluado el efecto del diseño del sistema, los cambios de temperatura, las tasas de renovación o la concentración de nutrientes en el crecimiento, fotobiología y composición química del alga (Duke *et al.* 1989, Neori *et al.* 1991, Msuya y Neori 2008, Al-Hafedh *et al.* 2015, Mendoza *et al.* 2018).

Sin embargo, estos estudios solo se enfocan en unos cuantos aspectos fisiológicos ante algunos cambios ambientales específicos. Dentro del sistema de cultivo, distintos cambios físicos y

químicos ocurren al mismo tiempo e interactúan entre sí, esto tiene un efecto en distintos aspectos de la fisiología y la productividad del alga. Por tanto, es necesario realizar estudios que integren diversas respuestas fisiológicas clave ante cambios graduales en las condiciones ambientales dentro de los sistemas. La información generada puede ayudarnos a entender cómo interactúan estos cambios en las condiciones del cultivo y cómo, en conjunto, afectan la fisiología, la plasticidad fisiológica y el crecimiento del alga; además, puede ayudarnos a comprender cuáles de estas variables tienen un mayor efecto en la productividad. Este conocimiento puede ser usado a favor de los acuicultores para optimización del cultivo. Evaluar el comportamiento de *Ulva* sp. aislando variables como temperatura, pH y concentración de nutrientes por separado, en periodos cortos de tiempo, también puede ayudarnos a entender cómo el alga responde a cambios en ciclos diarios dentro de los estanques de cultivo.

La Universidad Autónoma de Baja California (UABC) cuenta con una Unidad Acuícola Piloto Comercial (UAPC) que consta de 8 estanques piloto comerciales (Fig. 1). En ellos el grupo de Botánica, en conjunto con la empresa PROMAC (Productos Marinos de Las Californias S de R. L de C.V), llevan a cabo el llamado "Proyecto *Ulva*". Dicho proyecto tiene como objetivo la producción comercial de *Ulva* sp. con la finalidad de incorporarla a alimentos de consumo regular.



Figura 1 Unidad Acuícola Piloto Comercial (UAPC) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, Baja California, México. En la parte superior se observan 4 estanques de cultivo de 100 m³. En la parte inferior se encuentran 4 estanques de cultivo de 40 m³ (Unidades experimentales).

El cultivo de *Ulva* sp. se ha desarrollado desde hace cuatro años hasta la fecha; diversos ensayos en el sistema de cultivo permitieron implementar un ciclo de cultivo de 4 semanas, que consiste en una siembra a una cantidad inicial de 1 kg PF m⁻³ llevada a 7 – 8 kg m⁻³; sin embargo, aún no se tiene el conocimiento del comportamiento fisiológico del alga durante estos ciclos, así como cuáles son los factores estresantes y las estrategias del alga para sobrellevar las condiciones cambiantes dentro de los estanques

El principal objetivo del presente trabajo es el de evaluar la plasticidad fisiológica de *Ulva* sp. a partir del estudio de diversas respuestas fisiológicas (i.e. fotosíntesis, crecimiento, capacidad antioxidante, composición próxima, concentración de pigmentos, incorporación de NID) bajo condiciones cambiantes de su cultivo (i.e. luz, CID, temperatura) en estanques piloto comercial durante un ciclo de cultivo de cuatro semanas con el propósito de generar conocimiento que

permita implementar estrategias de optimización de la productividad del cultivo. Además, se realizaron experimentos en laboratorio con la finalidad de identificar las respuestas fisiológicas de *Ulva* sp. frente a cambios de temperatura y pH en periodos cortos (horas), simulando su variación en ciclos diarios dentro de los estanques de cultivo. Los resultados de este estudio permitirán conocer las condiciones óptimas del cultivo de *Ulva* sp. en el periodo y la densidad de siembra durante este estudio (marzo 2017; siembra 1 kg m^{-2}); sin embargo, este tipo de trabajo es aplicable para la optimización del manejo y las condiciones de cultivo en diferentes estaciones del año, con otras especies e incluso con otros sistemas. Además, ayudarán a entender el comportamiento de esta especie bajo situaciones similares que ocurren de forma natural en sistemas costeros de aguas confinadas (Sandoval-Gil *et al.* 2016).

1.2 Hipótesis

El incremento de densidad que provocan disminución de irradiancia y CID, así como los cambios en temperatura durante un periodo de cultivo de *Ulva* en estanques (1-4 semanas) provocarán variaciones en el crecimiento del alga y productividad del sistema. La evaluación de las respuestas fisiológicas y de plasticidad de *Ulva* sp. durante el periodo de cultivo en función de los cambios en luz, nutrientes, CID y temperatura, proporcionará la información necesaria para optimizar su productividad y el manejo del sistema.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar cómo influyen las condiciones cambiantes de un ciclo de cultivo en la plasticidad fisiológica y crecimiento de *Ulva* sp. mediante la evaluación de sus respuestas fisiológicas ante cambios en concentración de nutrientes, incrementos de temperatura y la limitación de la

irradiancia y carbono inorgánico disuelto en cultivo experimental en estanques en tierra. Con el conocimiento generado se pretende conocer las condiciones óptimas de productividad del sistema de cultivo.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las respuestas fotobiológicas, la composición química, la capacidad antioxidante y el crecimiento de *Ulva* sp., ante cambios en las condiciones de su cultivo, durante un ciclo de cuatro semanas en los estanques de cultivo.
2. Conocer la capacidad de incorporación de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) por *Ulva* sp. y, por tanto, su eficiencia para incorporar fertilizante basado en nitrógeno inorgánico.
3. Evaluar las respuestas fisiológicas y la incorporación de $^{15}\text{NO}_3^-$ de *Ulva* sp. ante incrementos de pH y temperatura por separado, en experimentos cortos de laboratorio (horas) que simulen los cambios de dichos factores en los estanques en un ciclo diario.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Evaluación *in situ* de las respuestas fisiológicas y crecimiento de *Ulva* sp. durante su cultivo en estanques piloto comerciales (Exp.1)

Se llevó a cabo un experimento en los estanques de cultivo de la UAPC, evaluando las respuestas fisiológicas y de crecimiento de *Ulva* sp. ante la variación de los parámetros fisicoquímicos durante cuatro semanas de cultivo:

2.1.1. Descripción de los estanques piloto.

El sistema de cultivo utilizado en este estudio se encuentra ubicado en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Ensenada, Baja California, México. Consiste en estanques rectangulares de tierra compactada revestidos por policloruro de vinilo plastificado (PVC-P) de color blanco y paredes con ligero ángulo hacia el interior que, en conjunto, ayudan al aprovechamiento de la luz incidente. Los estanques de cultivo (4 m de ancho, 10 m de largo y 1 m de profundidad) abarcan un área de 40 m² y cuentan con una capacidad de 40 000 litros. La circulación de agua de los estanques es del tipo semi-cerrada, ya que se llevan a cabo recambios del agua (80% del volumen) tres veces por semana. El sistema cuenta con aireación desde el fondo con 4 aireadores trifásicos (220 V) que hacen llegar el aire a un tubo PVC de 4" perforado y colocado de forma longitudinal en el fondo de cada poza. Este sistema conocido como cultivo por "volteo" (Zertuche-González 1987, Vandermeulen 1989), genera un movimiento convectivo que permite que las algas aprovechen mayor cantidad de luz incidente al pasar del fondo a la superficie y viceversa; el movimiento también evita que se formen gradientes tanto del CID como de los nutrientes disueltos, y de esta manera, puedan distribuirse de forma homogénea a través de toda la poza. El cultivo es abastecido con agua de mar, previamente filtrada a través de un sistema mecánico

que consiste en cuatro filtros de bolsa en serie, que van de 50 μm a 1 μm , y una esterilización química adicional con UV. El cultivo de *Ulva* sp. es fertilizado por pulsos, es decir, se añade una concentración de 500 μM de NH_4NO_3 50 μM de PO_4^- en un día y se realiza un recambio de agua al día siguiente; este proceso se repite tres veces por semana. La fertilización por pulsos se ha desarrollado como una técnica para el control de epífitos en sistemas de cultivo abierto, y en algunos casos, se ha reportado como una técnica que favorece el crecimiento específico de macroalgas (Friedlander *et al.* 1991).

2.1.2. Diseño experimental.

El estudio se llevó cabo en marzo de 2017, durante un ciclo de cultivo que consiste en cuatro semanas consecutivas. Se sembraron tres estanques de cultivo (i.e. poza=unidad experimental; $n = 3$) con 1 kg m^{-3} PF (PF=peso fresco) de *Ulva* sp.; como referencia se dejó un estanque solo con agua de mar filtrada con el objetivo de comparar las condiciones fisicoquímicas del agua del estanque sin algas, con aquellas de los estanques sembradas. Como se indica en las secciones siguientes, los muestreos de las variables fisicoquímicas y biológicas se realizaron en dos días consecutivos por semana: un día de fertilización (F) y un día de recambio (R) de agua al día siguiente. Para el caso de las variables fisicoquímicas, además, se realizaron medidas a lo largo de cada día. Los tipos de variables, así como sus métodos de muestreo, se indican a continuación.

2.1.3. Variables fisicoquímicas

Se realizaron mediciones de irradiancia, pH, temperatura, nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y oxígeno disuelto (OD), tres veces al día (7:00, 12:00 y 17:00 h). La salinidad dentro de los estanques se mantuvo constante (31–33 UPS)

La irradiancia se determinó con un medidor LI-250A (LI-COR®) a través de un sensor cuántico esférico 4π subacuático LI-193 (LI-COR®). La irradiancia se midió a dos profundidades dentro de la poza de cultivo: a 30 cm de profundidad (E_{30} ; donde se realizaron las medidas de fotosíntesis, fluorescencia de la clorofila a y crecimiento), y al fondo de la poza (E_f) a 1 m de profundidad. Los parámetros de pH, temperatura, OD y salinidad fueron medidos con una sonda multiparamétrica YSI® professional plus. Se realizaron tres mediciones por poza de cada uno de los parámetros (pseudoréplicas) y se promediaron para establecer la réplica verdadera ($n = 3$)

2.1.4. Fotosíntesis y Respiración

Para las medidas de fotosíntesis y respiración se usaron cámaras de incubación de policarbonato transparentes con una capacidad de 500 ml. Durante las incubaciones las cámaras se mantuvieron en flotación a 30 cm bajo la superficie con el fin de obtener las condiciones medias de irradiancia de la poza de cultivo. Previamente a la realización de las incubaciones experimentales, se realizaron distintas pruebas para optimizar el ratio 'biomasa del alga/volumen de cámara' y tiempos de incubación para minimizar el efecto de limitación por CID (Olivé *et al.* 2016). Finalmente se seleccionó una biomasa de 0.4 - 0.8 g PS L⁻¹ e incubaciones cortas de 20 minutos para asegurar mediciones precisas, evitando potenciales subestimaciones de fotosíntesis. Entre incubaciones, el agua de la cámara se renovaba por completo con el agua de la poza. Se realizaron tres incubaciones por poza de cultivo (pseudoréplicas) una vez al día (cerca del cenit, 12:00 h), que fueron promediadas para obtener la réplica verdadera ($n=3$). Las tasas de fotosíntesis o respiración se calcularon a partir de la producción/consumo de OD desde el inicio al fin de las incubaciones. Las tasas de fotosíntesis bruta (gross-P) de *Ulva* sp. (expresadas en $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$; PS= peso seco) se calcularon sumando la tasa de respiración a la tasa de fotosíntesis neta. Las tasas de respiración se realizaron en completa oscuridad al cubrir las cámaras de incubación con

bolsas plásticas negras. Las tasas de respiración (R) ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, $n = 3$) se calcularon mediante el consumo de OD dentro de las cámaras de incubación durante periodos de 60 minutos. El OD fue medido con una sonda multiparamétrica con un sensor polarográfico (YSI® professional plus). La precisión del sensor se probó contra las mediciones de OD obtenidas por el método de titulación de Winkler en ensayos anteriores. Los valores de OD obtenidos con los diferentes métodos fueron similares, con una varianza de datos de alrededor de 0.05%.

2.1.5. Pigmentos

Se colectaron tres muestras de tejido por poza de cultivo (pseudoréplicas) una vez al día (12:00 pm) y se lavaron cuidadosamente con agua destilada. Las muestras fueron promediadas para obtener la réplica verdadera ($n=3$); este procedimiento se realizó para la determinación de pigmentos, composición proximal y capacidad antioxidante.

Para la determinación de pigmentos, las frondas fueron conservadas en congelación ($\sim -18^\circ\text{C}$) hasta el momento de los análisis. El alga fresca ($\sim 0.1 \text{ g PF}$) fue homogeneizada en mortero con acetona al 80% (v/v); para una completa extracción de los pigmentos, el tejido transfirió a un tubo de ensayo y se dejó en oscuridad durante 24 h a -4°C . Posteriormente, los extractos fueron centrifugados en frío (-4°C) a 1000 rpm por 5 minutos. La concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides fue determinada por espectrofotometría (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu®) a partir de la absorbancia de los extractos a las longitudes de onda (y ecuaciones) indicadas en Lichtenthaler and Wellburn (1983)

2.1.6. Fluorescencia de la clorofila *a*

La fluorescencia de la clorofila *a* del PSII fue medida con un fluorómetro portable de pulso de amplitud modulada (DIVING PAM, Walz, Germany). La fluorescencia mínima (F_0) fue establecida

después de mantener las frondas de *Ulva* sp. durante toda la noche en un incubador VWR® Signature™ 2015 a 16 °C. Posteriormente, un pulso de luz saturante (5000 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s) fue inducido en el tejido para obtener la fluorescencia máxima (F_m) en los tejidos adaptados a la oscuridad. Se determinó la fluorescencia variable (F_v) como la diferencia entre F_m y F_0 , y el rendimiento cuántico máximo como F_v/F_m (Schreiber 1994). Posteriormente, se fijaron las frondas de *Ulva* sp. en adaptadores de clip (Dark Leaf Clip DIVING-LC) sobre placas planas de plástico mantenidas a la misma profundidad que las cámaras flotantes para fotosíntesis (i.e. 30 cm). Se realizaron curvas rápidas de luz (RLC, por su nomenclatura en inglés; Rapid Light Curves) exponiendo las frondas de *Ulva* sp. a ocho niveles de luz actínica (18, 34, 52, 82, 147, 233, 363 y 554 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en intervalos de 20 s. Las medidas fueron realizadas al medio día (12:00 h). Se realizaron tres mediciones por poza de cultivo una vez al día (pseudoréplicas), y fueron promediadas para obtener la réplica verdadera ($n=3$). Con los datos obtenidos se calculó el Φ_{PSII} (Φ_{PSII} = rendimiento cuántico efectivo) para cada una de las irradiancias de acuerdo con Schreiber and Neubauer (1990):

$$(Ec. 2) \quad (\Phi_{\text{PSII}}) = F'_m - F / F'_m$$

Donde F'_m es la fluorescencia máxima inducida por un pulso de luz saturante (5000 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s) aplicado a un tejido adaptado a la luz actínica, y F es el estado basal de la fluorescencia del tejido adaptado a la luz. La ETR (ETR = tasa de transferencia de electrones, por sus siglas en inglés *Electron transport rates*) expresada como $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue estimada de acuerdo con (Beer *et al.* 2014):

$$(Ec. 3) \quad \text{ETR} = \Delta F / F'_m \times E \times A \times 0.5$$

Donde E es la irradiancia, A es la absorptancia del tejido y 0.5 es el factor que explica la división de energía entre PSI y PSII.

La absorptancia en organismos fotosintéticos denota la cantidad relativa de energía solar que tiene el potencial de ser usada en la fotosíntesis para la fijación de carbono orgánico, por lo que la luz absorbida por los componentes no fotosintéticos debe ser sustraída (ver en: Vásquez-Elizondo *et al.* 2017), para lo cual se usa la siguiente ecuación:

$$(Ec. 4) A = 1 - T - R$$

Donde la transmitancia (T) es la fracción de la luz transmitida a través del tejido, y la reflectancia (R) es la cantidad de la luz reflejada por retrodispersión. La reflectancia en macroalgas verdes es casi indetectable. Es por ello que, para *Ulva* sp., la absorptancia se calcula como un valor promedio de $A = 1 - T$.

Por esta razón, la absorptancia (A) para *Ulva* sp. se calculó conforme a los procedimientos indicados en Vásquez-Elizondo *et al.* (2017). Se mantuvieron frondas de *Ulva* sp. bajo una lámpara de halógeno (modelo KL 1500 LCD, 150 W, Schott) fijadas en adaptadores de clip (Dark Leaf Clip DIVING-LC). En la parte inferior se colocó el irradiómetro 2π (Diving-F1, Walz, Germany) del fluorómetro sumergible (DIVING PAM, Walz, Germany) con el fin de detectar la cantidad de luz transmitida a través del tejido de *Ulva* sp (L_T). Las mediciones se realizaron siempre a la misma altura. Para corregir la absorción no fotosintética del tejido y las pérdidas por dispersión de la luz. Se realizó un blanqueamiento del tejido de *Ulva* sp. al sumergirlo en agua de mar con 4% de cloro comercial (CLORALEX®). Posteriormente se fijaron las frondas, y se realizó el procedimiento anteriormente señalado para detectar la luz transmitida a través del tejido blanqueado (L_0). El procedimiento se llevó a cabo cada día de muestreo de frondas obtenidas de los estanques de

cultivo; se realizaron tres mediciones por poza de cultivo (pseudoréplicas) una vez al día, que fueron promediadas para obtener la réplica verdadera (n=3). La transmitancia a través de la muestra se calculó como la relación: $T = L_T / L_0$. Finalmente, la absorptancia del tejido de *Ulva* sp. se calculó como un valor promedio de:

$$(Ec. 5) A = 1 - (L_T/L_0)$$

La disipación térmica de energía del PSII, NPQ (NPQ; Non-Photochemical Quenching), fue determinada de acuerdo con Bilger and Björkman (1990):

$$(Ec. 6) NPQ = (F_m - F'_m) / F_m$$

2.1.7. Composición proximal

Después de su colecta, las muestras de tejido de *Ulva* sp. se secaron en estufa a 60°C, y se calculó el contenido de humedad según el método oficial de la AOAC (Horwitz 1990)

El contenido de nitrógeno (% PS) se determinó por el método microkjendahl según el método oficial de la AOAC (Horwitz 1990). Complementariamente, se calculó el porcentaje de proteína al multiplicar por el factor 5 (Angell *et al.* 2016).

El contenido de lípidos totales (% PS) se determinó por extracción en cloruro de metileno: metanol (2:1 v/v) por el método descrito por Folch *et al.* (1957).

Para el contenido de carbohidratos (%PS) se usó el método modificado de Hernández-Garibay *et al.* (2010). Se realizó una hidrólisis en muestras de tejido seco pulverizado en baño maría durante 2 h a 60 °C, en 2 mL (1:100p/v) de HCl 0.2 N. El contenido de carbohidratos solubles de la muestra hidrolizada en ácido se determinó espectrofotométricamente por el método colorimétrico del fenol sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando Ramnosa como estándar.

Para el contenido de cenizas (% PS), se calcinó tejido seco y pulverizado en una mufla a 450 °C por 4 h. El contenido de cenizas se calculó por el método oficial de la AOAC (Horwitz 1990)

$$(Ec. 7) \% \text{ Cenizas} = (W_2 * 100) / W_1$$

Donde W_1 es el peso del tejido seco antes de la calcinación y W_2 es el peso del tejido posterior a la calcinación.

2.1.8. Capacidad Antioxidante

Para la obtención de los extractos crudos para determinar la capacidad antioxidante de *Ulva* sp., las muestras de tejido se secaron en estufa a 60°C. Se realizaron extractos de 20 mg de tejido seco en metanol (80%), manteniéndolos en agitación constante y oscuridad por 24 h. La muestra se centrifugó a 1000 rpm por 10 min y, posteriormente, se decantó el extracto crudo.

Para el determinar el contenido fenólico se usó el método fotocolorimétrico Folin-Ciocalteu (Folin, O. y Ciocalteu 1927). A 25 µL del extracto crudo se le añadió 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y, posteriormente, 300 µL de Na₂CO₃ (20%) y se agitó. Después se incubaron por 30 min a 40°C. Los extractos se leyeron a 765 nm con un espectrofotómetro (Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific). Se usó ácido gálico (C₇H₆O₅) como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por g de PS.

Para determinar la actividad antioxidante se aplicó el método de reducción del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) (Blois 1958). Se añadieron 100 µL de extracto crudo, 1 ml de DPPH 60 mM y se agitó. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos. Las sustancias antioxidantes que reaccionaron con el DPPH y la reducción del reactivo fue monitoreada midiendo la disminución de la absorbancia a 517nm con el espectrofotómetro

(Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific). Se usó ácido ascórbico como estándar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido ascórbico por g de PS.

2.1.9. Crecimiento

Las medidas de crecimiento se realizaron en cámaras de incubación de policarbonato transparentes con una capacidad de 500 mL que se mantuvieron en flotación a la misma profundidad donde se realizaron las medidas de fotosíntesis y fotoquímica (i.e. 30 cm). Dentro de cada cámara de incubación se colocaron frondes de *Ulva* sp. con un peso aproximado de 0.5 g PF; la cámara estaba abierta por su parte superior para permitir el intercambio continuo del agua de su interior con la de la poza; una malla recubría esta abertura para mantener las frondas en la cámara. Se realizaron incubaciones semanales, sin embargo, el tejido se pesaba tres veces por semana. Se colocaron tres cámaras de incubación en cada una de los estanques (pseudoréplicas), y se promediaron para obtener la réplica verdadera (n=3). Al final de cada semana el tejido se secó a 60°C para obtener el peso seco.

Se calculó la tasa de crecimiento específico con la siguiente fórmula (Israel 1995):

$$(Ec. 8) TCE = 100 \times [(\ln W_t - \ln W_0) / t]$$

Donde W_0 es el peso de *Ulva* sp. al comienzo del periodo considerado dentro de las cámaras de incubación, W_t es el peso de *Ulva* sp. al final del periodo considerado y t es el periodo considerado el cual se realizaron los pesajes W_0 y W_t .

El rendimiento fue determinado con la siguiente fórmula:

$$(Ec. 9) Y \text{ (g PF m}^{-2} \text{ día}^{-1}) = W_0 + (TCE / 100)$$

Donde W_0 es el peso inicial de *Ulva* sp. por m^{-2} al comienzo del periodo considerado, y TCE es el crecimiento específico.

2.1.10. Cinéticas de incorporación de NID

Para las incubaciones de cinéticas de incorporación de NID, se eligió un peso aproximado de *Ulva* sp. de 0.2 – 0.3 g PS y se colocó en cámaras de incubación de policarbonato con una capacidad de 500 mL durante 1; esto con la finalidad de evitar una reducción sustancial del nutriente en el agua durante la incubación y evitar subestimaciones de incorporación de N. Se expuso el tejido a concentraciones crecientes (0, 25, 50, 100, 200, 400 y 600 μM) de trazadores de NH_4^+ ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ at. %=99, Cambridge Isotope Laboratories) y NO_3^- ($^{15}\text{KNO}_3$ at. %=99, Cambridge Isotope Laboratories). Las cámaras fueron agitadas constantemente para reducir el efecto de la capa limitante en la adquisición de nutrientes y la formación de gradientes (Sandoval-Gil *et al.* 2015). Tras la incubación, los tejidos fueron enjuagados con agua desionizada para remover los nutrientes de su superficie y secados a 60 °C por 48 horas. Finalmente, las muestras fueron pulverizadas y encapsuladas en cápsulas de estaño. Las determinaciones isotópicas se llevaron a cabo en UC-Davis Stable Isotope Facility con un analizador elemental (EA) conectado a un espectrómetro de masas de razones isotópicas de flujo continuo (IRMS).

Las tasas de incorporación de amonio y nitrato (V , expresada como $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$) se calcularon con la siguiente fórmula:

$$(Ec. 10) V = [({}^{15}N_{exp} - {}^{15}N_{back}) \times N_C] / (M_N \times t)$$

Donde la diferencia (${}^{15}N_{exp} - {}^{15}N_{back}$, como %) es el enriquecimiento de ^{15}N relativo al ^{15}N natural en *Ulva* sp., N_C es el contenido de nitrógeno ($\text{g N g}^{-1} \text{PS}$), M_N es la masa molar del nitrógeno en los trazadores (15 g mol^{-1}) y t es la duración de la incubación (1 h). Las tasas de incorporación (V)

fueron graficadas contra la concentración del sustrato (S , μM) y los parámetros de las tasas de incorporación fueron calculados con el modelo Michaelis–Menten:

$$(Ec. 11) V = (V_{max} \times S) / (K_m + S)$$

Donde V_{max} es la tasa de incorporación máxima ($\mu\text{mol N g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$) y K_m es a contante de la saturación (μM); V_{max} y K_m fueron estimadas por análisis de gráfico en el programa SigmaPlot 11 (Systat Software Inc). La constante de afinidad α fue calculada como V_{max} / K_m .

Las tasas de incorporación de amonio y nitrato a sus concentraciones en los estanques (V_{amb}) fueron determinadas con una modificación de la ecuación anterior:

$$(Ec. 12) V_{amb} = (V_{max} \times S_{amb}) / (K_m + S_{amb})$$

Donde S_{amb} es la concentración de NH_4^+ y NO_3^- en los estanques de cultivo de *Ulva* sp durante el ciclo de cultivo.

Para los análisis de nutrientes se colectaron muestras de agua filtrada (GF/F Whatman), tres veces al día (7:15, 12:00 y 17:00 h), a excepción de los días de fertilización, donde se realizó una colecta adicional antes de fertilizar (7:00 h). La determinación de nutrientes se realizó por distintos métodos colorimétricos; el amonio se midió por el método de azul de indofenol (Solorzáno 1969).

En el caso de nitrato se usó el método de UV selectivo (American Public Health Association, American Water Works Federation, Water Pollution Control 1989).

Se calculó la tasa de remoción de amonio y nitrato en los días de fertilización de acuerdo con la fórmula modificada de Cohen and Neori (1991):

$$(Ec. 13) V = v (S_i - S_f)$$

Donde $V =$ es la tasa de remoción ($\mu\text{moles N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), $v =$ volumen de la poza (L), S_i es la concentración inicial de N ($250 \mu\text{M}$ de NH_4^+ ; $250 \mu\text{M}$ de NO_3^-) y S_f es la concentración de N al final del día.

2.2. Efectos en *Ulva* sp. de incrementos de temperatura y pH bajo condiciones controladas de laboratorio (Exp. 2)

Se llevaron a cabo experimentos en laboratorio con la finalidad de identificar las respuestas fisiológicas de *Ulva* sp. frente a cambios de temperatura y pH en periodos cortos (horas), simulando su variación en ciclos diarios dentro de los estanques de cultivo.

Para estos experimentos en condiciones controladas, se colectó tejido de *Ulva* sp. de los estanques de cultivo y se limpió cuidadosamente. Posteriormente, se colocó 1 g PF dentro de cámaras de incubación de policarbonato con una capacidad de 500 mL. Con el propósito de homogenizar las condiciones fisiológicas iniciales de las frondas *Ulva* sp., estas se mantuvieron en un Incubador VWR® Signature™ 2015 a una temperatura de 16°C y una irradiancia de $\sim 300 \mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lámparas led modelo LAM-030, 18 W, Kleiman) durante tres días, realizando recambios de agua diariamente. Las algas se mantuvieron sin nutrientes, esto con la finalidad de que los cambios fisiológicos de *Ulva* sp. estuvieran directamente influenciados por los cambios en pH o temperatura y no por los cambios en la concentración de nutrientes. Para los experimentos se eligieron los tratamientos de temperatura y pH basados en las mediciones de dichos parámetros en los estanques de cultivo durante un ciclo diario. Se expuso tejido de *Ulva* sp. a cuatro tratamientos distintos de temperatura: 16°C , 19°C , 22°C y 25°C , con la misma dosis lumínica mencionada anteriormente. Por otra parte, se sometió a *Ulva* sp. a cuatro tratamientos de pH: 8.15, 8.78, 9.5 y 9.82, con las mismas condiciones de temperatura e irradiancia de la aclimatación. Para elevar el pH del agua de incubación se usó NaOH al 40 % (Invers *et al.* 1997).

Se eligió un tiempo de incubación de 30 min, con el fin de simular la rápida variación que existe de estos dos parámetros durante el día. Posteriormente al tiempo de incubación en cada uno de los tratamientos, se midieron las tasas de fotosíntesis y respiración por evolución de oxígeno (Sección 2.1.4), las tasas de incorporación de NO_3^- a una concentración de $10 \mu\text{M}$ (Sección 2.1.10), la concentración de pigmentos (Sección 2.1.5) y la fluorescencia de la clorofila *a* (Sección 2.1.6).

2.3. Análisis estadísticos.

La evaluación del efecto de las semanas de cultivo en el conjunto de variables respuesta del experimento 1 (*in situ*) y su relación con las variables ambientales, se realizó mediante análisis multivariados con el programa PRIMER 6 & PERMANOVA+ v.1.0.2 (Anderson *et al.* 2008). Para ello, los datos biológicos y ambientales fueron normalizados y se generaron dos matrices de distancias en base a Distancias Euclidianas. Con la matriz de datos biológicos se realizó una ordenación multivariada (MDS) y un análisis de varianza multivariado basado en permutaciones (PERMANOVA, 9999 permutaciones) de dos factores con diseño anidado, donde el factor día de F y R (aleatorio) estaba anidado en el factor semana (fijo). Se aplicó el test de Monte Carlo para detectar diferencias significativas entre muestras, cuando no se alcanzaron las 9999 permutaciones. El porcentaje de similitud (medido en distancia media) del estado fisiológico de las poblaciones entre semanas se obtuvo mediante un análisis SIMPER. Para determinar las relaciones significativas entre cambios de las variables ambientales no controladas durante el cultivo en estanques (Intensidad de luz, temperatura y pH) y los cambios fisiológicos de *Ulva* sp. se utilizaron modelos lineales basados en distancias (DistLM).

Para la implementación de los análisis univariantes, la normalidad de datos se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk (1965); la homogeneidad de varianzas se corroboró con el test

de Levene, éstas pruebas fueron realizadas con el programa SigmaPlot 11 (Systat Software Inc); de ser necesario, se realizó transformación de los datos. Se aplicó el ANOVA anidado de una vía en el experimento 1 (*in situ*), donde la variación de los descriptores dentro de los días F y R de muestreo (aleatorio) fueron anidadas en las semanas (fijo). Se realizó una prueba *post-hoc* (Student–Newman–Keuls, SNK) de comparación de medias entre semanas, con la finalidad de identificar la semana (s) específica causante del efecto significativo (ANEXO 1); el análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS v.20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Por otra parte, en el caso de las variables donde no se encontraron diferencias significativas con El ANOVA anidado, se realizaron regresiones lineales para saber si había una relación con paso de las semanas y el cambio en las variables fotobiológicas y bioquímicas (ANEXO 2). La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis fue realizada en caso de que los datos no cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las variables para realizar las pruebas ANOVA. Para determinar el efecto del paso de las semanas en el crecimiento y rendimiento de la biomasa en los estanques de cultivo se realizó un ANOVA de medidas repetidas con el crecimiento y el rendimiento como variables independientes y el tiempo (semanas) como factor. Se realizó una prueba *post-hoc* (Student–Newman–Keuls, SNK) con la finalidad de identificar diferencias entre semanas. Los efectos en las variables fotobiológicas, composición de pigmentos e incorporación de NO_3^- en *Ulva* sp. ante la variación de los factores de temperatura y pH en los experimentos cortos en el laboratorio fueron determinados con un ANOVA de una vía con el programa SPSS v.20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Se realizó una prueba *post-hoc* (Student–Newman–Keuls, SNK) con la finalidad de identificar diferencias entre tratamientos. Para todas las pruebas los efectos estadísticamente significativos fueron considerados a $p < 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Evaluación *in situ* de las respuestas fisiológicas y crecimiento de *Ulva* sp. durante su cultivo en estanques piloto comerciales (Exp.1)

En la S2 la irradiancia en los estanques se redujo en promedio ~67%. La reducción de la irradiancia en la S4 fue del ~92% a 30 cm de profundidad (Fig. 2A) y del ~100 % en el fondo de la poza (Fig. 2C). De forma general, la temperatura del agua de los estanques mostró variaciones de hasta 3 y 4 °C en ciclos diarios (Fig. 2B). Los valores más bajos de temperatura se registraron durante las dos primeras semanas de cultivo de cultivo (13 – 18 °C), mientras que los más altos fueron registrados en la S3 (17 – 21 °C) y S4 (16 – 20 °C). Los valores de pH de los estanques con *Ulva* sp. se mantuvieron siempre por encima de los valores en los estanques de referencia (Tabla 1). Dentro de los estanques de cultivo se detectaron cambios de pH durante los ciclos diarios, pasando de valores de ~ 8 en el amanecer, a superiores a 9 alrededor de las 17:00 h (Fig. 2D). Comparando entre semanas, el pH de S1 (8.5) fue menor en comparación con el resto de las semanas de cultivo, y fue durante la S3 que se detectó pH más alto, llegando a valores de ~10 durante el atardecer.

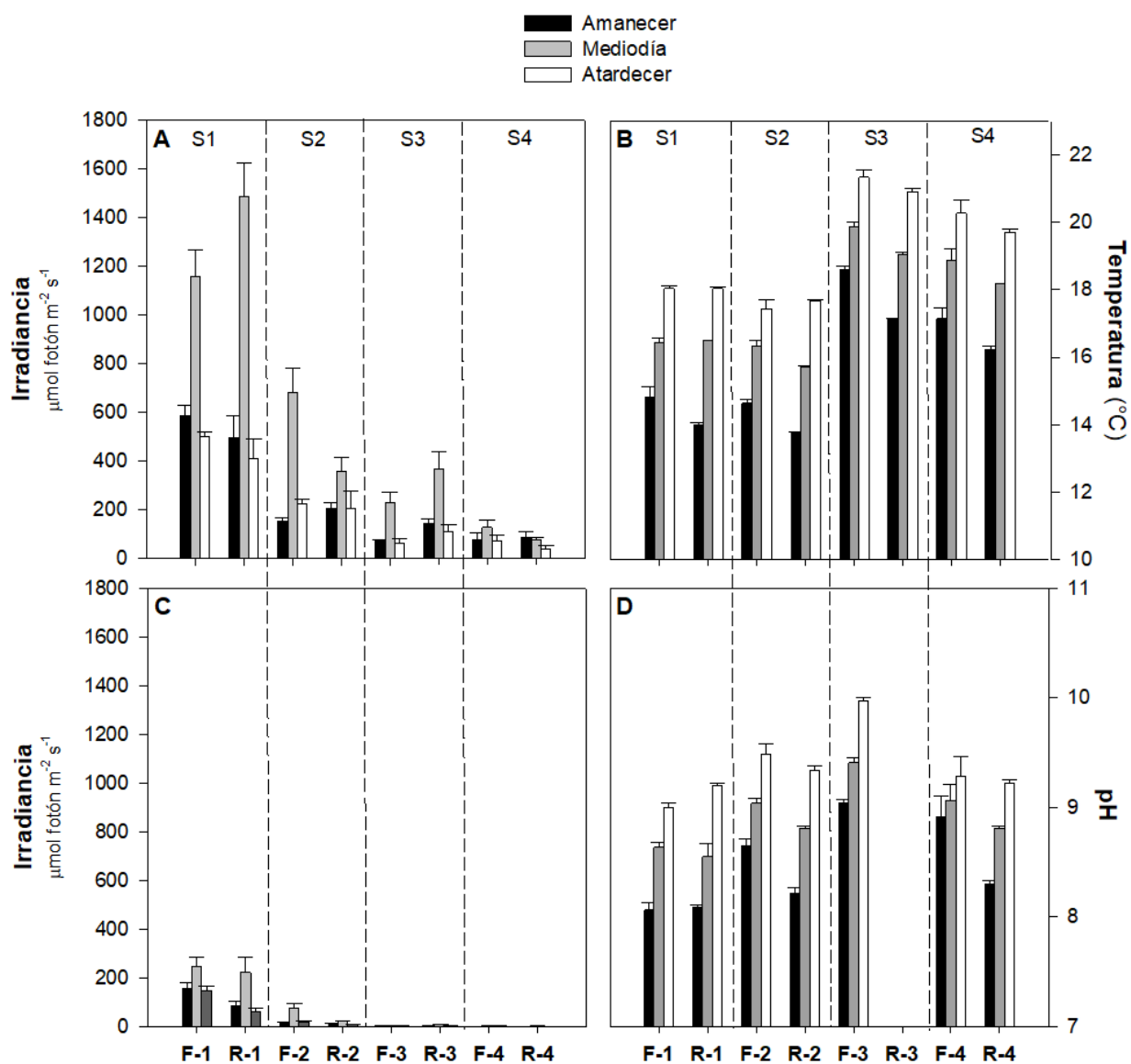


Figura 2. Parámetros físicos y químicos medidos en los estanques de cultivo de *Ulva* sp. Los valores son las medidas realizadas al amanecer (negro), mediodía (gris) y atardecer (blanco) de los parámetros de E_{30} (A), Temperatura (B), E_f (C) y pH (D). Los valores son los promedios ($n=3$) y el error estándar.

Tabla 1. Parámetros físicos y químicos medidos en los estanques de cultivo de referencia (sin macroalga). Los valores son los máximos y mínimos medidos durante los días de muestreo de fertilización (F) y recambio de agua (R) durante las semanas de cultivo (1-4).

Semana	Día	pH	E_{30} ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E_F ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T (°C)
S1	F	7.81 – 7.93	1303.7 – 3610.1	770 – 2743	15.3 – 18.3
	R	8.03 – 8.12	1502.9 – 3252.5	1176.4 – 2884.5	14.1 – 18
S2	F	8.22 – 8.43	967.1 – 2988	621.7 – 1093.1	14 – 17.1
	R	8.11 – 8.24	984.7 – 3104.5	552.9 – 2460	13.7 – 17.6
S3	F	8.08 – 8.18	839.3 – 3342.5	790.8 – 1352.5	18 – 20
	R		1177.8 – 4098.5	1150.8 – 2656.5	16.8 – 20.5
S4	F	8.15 – 8.16	1439.5 – 4065.5	915.7 – 1938.1	17 – 19.9
	R	8.12 – 8.15	1086.9 – 3903	882.9 – 3260	16.4 – 19.8

El análisis de ordenación MDS (Fig. 3) muestra un cambio gradual del estado fisiológico de *Ulva* sp durante las cuatro semanas de cultivo en los estanques. El porcentaje de disimilaridad del estado fisiológico de las algas cultivadas la primera semana aumentó gradualmente con el tiempo, cambiando de 42% (S1 vs S2) a 49% (S1 vs S3) y 70% (S1 vs S4) durante las 4 semanas de cultivo. El porcentaje de disimilaridad entre las semanas consecutivas S2 vs S3 (28%), y S3 vs S4 (12%) fue menor que el observado entre S1 y S2.

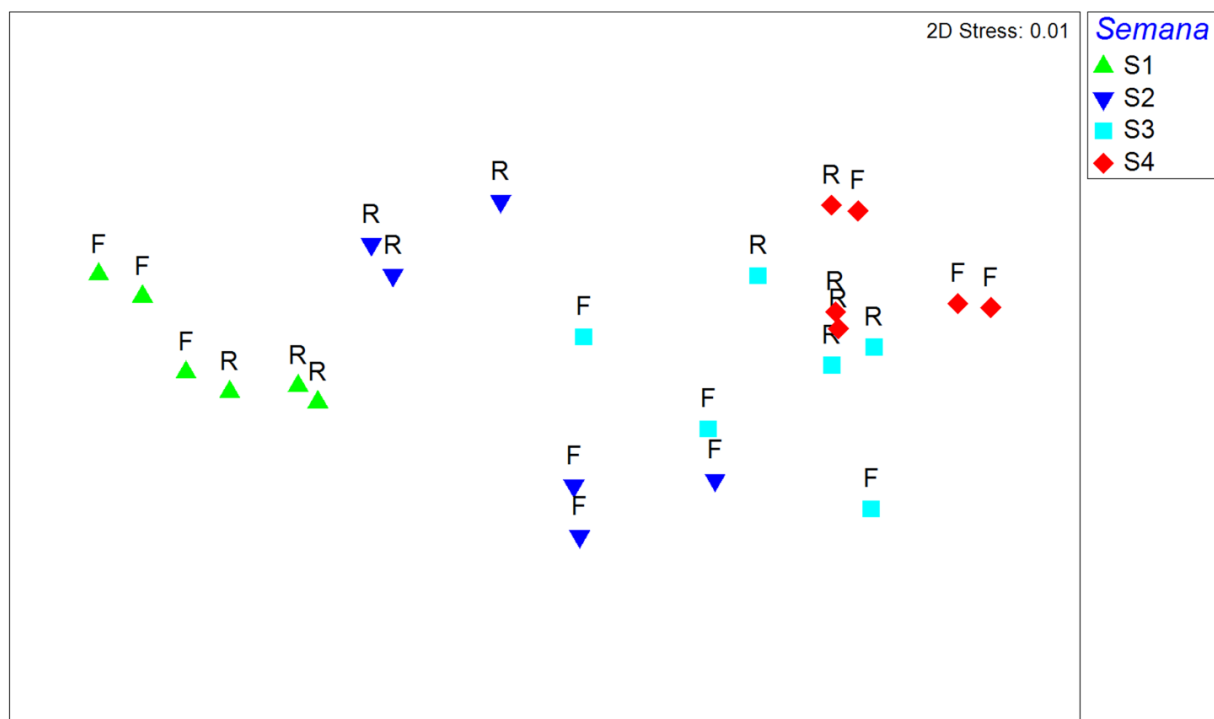


Figura 2. Gráfico resultante de la ordenación MDS con la distribución espacial de las muestras de *Ulva sp* basadas en sus características fisiológicas durante las cuatro semanas de cultivo (S1, S2, S3 y S4) y los días de recambio de agua (F: fertilización, R: recambio).

El análisis multivariante PERMANOVA mostró cambios significativos en el estado fisiológico del alga a partir de la segunda semana de cultivo, ya que no se observaron diferencias estadísticas entre las dos primeras semanas, pero sí en la semana 3 y 4 (S3 y S4) en comparación con el estado inicial de la S1 (Tabla 2, *pair wise a*). También se observaron variaciones significativas debidas al recambio del agua durante S1, S2 y S3, pero no en la última semana de cultivo (Tabla 2, *pair wise b*).

Tabla 2. Resultados del análisis PERMANOVA anidado mostrando los efectos significativos de las semanas de cultivo (S1, S2, S3, S4) y los días de recambio de agua (F: fertilización, R: recambio) en el estado fisiológico de *Ulva sp* durante el experimento 1 in situ. Las letras en negrita indican diferencias significativas.

Main test	SS	MS	Pseudo-F	P (perm)
Semana*	259.29	86.431	5.0553	0.0021
Día (Semana)	68.389	17.097	4.3203	0.0001

Pair-wise a	t	P(MC)
S1 x S2	1.7112	0.1012
S1 x S3	2.7969	0.0207
S1 x S4	4.0488	0.0085
S2 x S3	1.4061	0.1738
S2 x S4	2.0593	0.0567
S3 x S4	1.4214	0.164

Pair-wise b	t	P(MC)
F x R (S1)	2.2207	0.023
F x R (S2)	2.3345	0.0222
F x R (S3)	0.1013	0.0356
F x R (S4)	0.0998	0.1972

* P(MC) 105 permutaciones

El modelo DISTLM (Tabla 3) indicó que los tres factores que resultan de difícil control en este tipo de cultivo (irradiancia, temperatura y pH), tuvieron efectos significativos en las variaciones del estado fisiológico de *Ulva sp.* durante las cuatro semanas de cultivo. Basado en el porcentaje de varianza explicado por cada variable de forma individual, la irradiancia resultó ser el factor más importante, seguido de la temperatura y el pH. Los tres factores contribuyeron al 57% del total de la varianza explicada en el modelo seleccionado.

Tabla 3 . Resultados del análisis DISTLM incluyendo todas las variables respuesta frente a los tres predictores relevantes ¿e incontrolables? en cultivos en estanques durante las 4 semanas, en el experimento 1 in situ.

Predictor	Pseudo-F	P	% varianza explicada
Irradiancia	15.509	0.0001	0.41347
Temperatura	10.017	0.0002	0.31286
pH	4.8324	0.0051	0.1801

Los valores de fotosíntesis bruta (Fig. 4A) se redujeron significativamente a lo largo del ciclo de cultivo ($r^2 = -0.74$; $p < 0.001$), con una reducción de hasta un 63% en la S4 en comparación con la S1 de cultivo. Por otra parte, en la S2 y S3 se detectaron valores significativamente mayores (36 – 44 %; $p < 0.001$) de las tasas de fotosíntesis en los días de fertilización (F) respecto de los días de recambio del agua de la poza (R). Las tasas de respiración se mantuvieron constantes a lo largo del ciclo de cultivo, a excepción de un incremento en el día de F de la S2 ($H = 11.44$; $p = 0.010$) (Fig. 4B). Hubo un incremento significativo en el contenido de clorofila *a* (107 %; $p = 0.026$), la clorofila *b* (139 %; $p = 0.014$) y los carotenoides (27 %; $p = 0.006$) en *Ulva* sp. de la S1 a la S4 (Fig.4C-E). También, se observó un incremento significativo (~10 %) en ratio clorofila *b/a* ($r^2 = 0.76$; $p = 0.002$) (Fig. 4F). Para el caso de la concentración de clorofilas y ratio molar clorofila *b/a*, también se observaron incrementos significativos en los días F respecto de R de la S2 y S4.

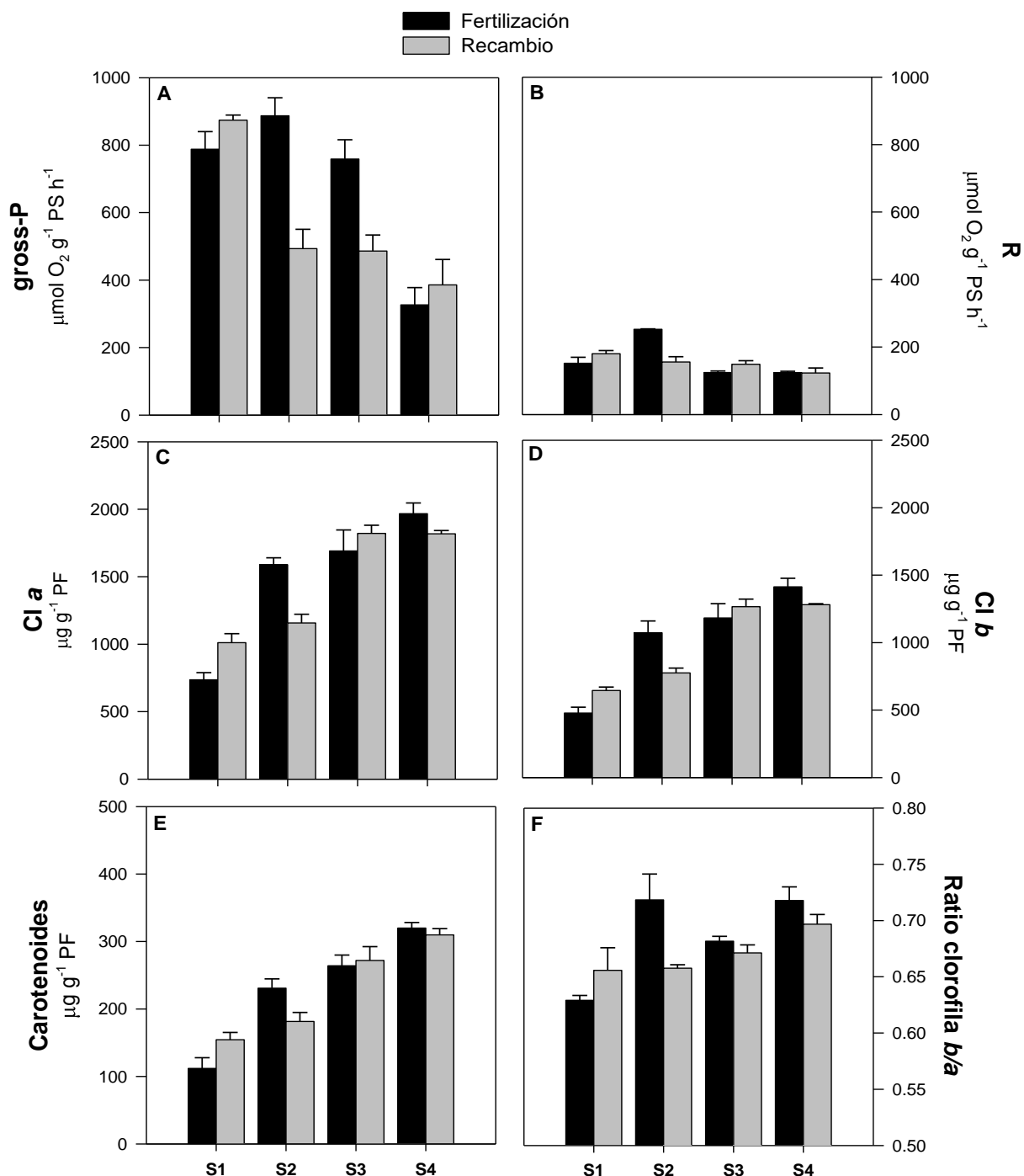


Figura 3. Variación de los valores de Fotosíntesis bruta (gross-P) (A), Respiración (B), Clorofila a (C) Clorofila b (D), Carotenoides (E) y ratio molar Clorofila b/a (F) de *Ulva* sp. durante las semanas de cultivo (S 1-4), en el día de fertilización (negro) y día de recambio (gris). Los valores son los promedios ($n=3$) y el error estándar.

La F_v/F_m partió de valores muy reducidos (~ 0.7) en el primer día experimental (F, S1); sin embargo, dichos valores se recuperaron y experimentaron un incremento del $\sim 10\%$ en el segundo día (R,

S1). En las siguientes semanas del ciclo de cultivo (S2 – S4), el F_v/F_m se redujo gradualmente de 0.77 a 0.73 ($r^2 = -0.79$; $p < 0.001$) (Fig. 5A). Los valores máximos de las ETR se encontraron a $\sim 300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en las RCL, por lo que se consideró esta irradiancia para reportar los resultados de ETR, Φ_{PSII} y NPQ. Se encontró una reducción significativa tanto en las ETR ($p = 0.015$) como en el Φ_{PSII} ($p = 0.003$) a lo largo de las semanas de cultivo, con una reducción máxima de ambos descriptores de $\sim 50\%$ al final del cultivo, en comparación con la S1 (Fig. 5B y D). En la S1 de cultivo se detectaron valores significativamente mayores de NPQ en comparación con el resto de las semanas de cultivo ($\sim 40\%$; $p = 0.041$) (Fig. 5C). Los valores de absorptancia se incrementaron de 0.41 a 0.52 a lo largo del ciclo de cultivo, sin embargo, dicho incremento no fue significativo.

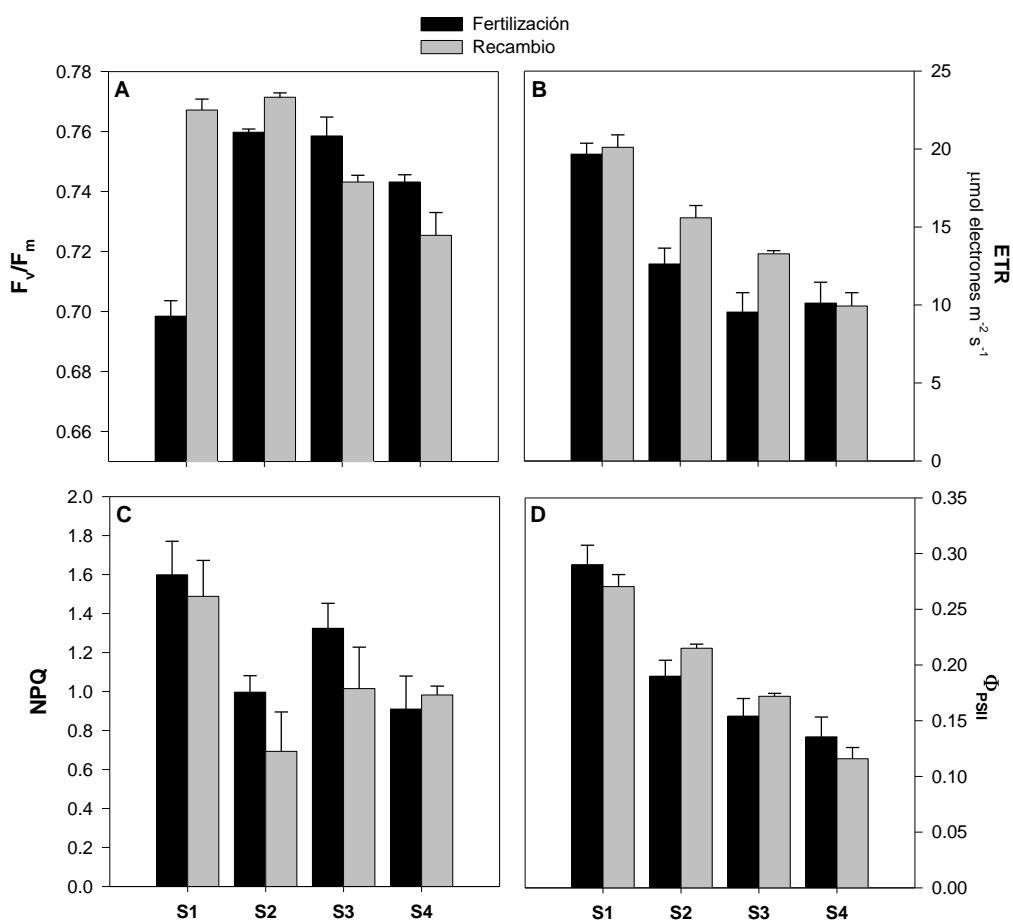


Figura 4. Variación de los parámetros fotoquímicos: Rendimiento cuántico máximo (A), (ETR) (B), NPQ (C) y Rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}) (D), de *Ulva sp.* durante las semanas de cultivo (S1-4), en el día de fertilización (negro) y día de recambio (gris). Los valores reportados son los correspondientes a la irradiancia de $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de las RLCs. Los valores son los promedios ($n=3$) y el error estándar

El contenido de carbohidratos se redujo significativamente de la S1 a la S4 ($r^2 = 0.82$; $p < 0.001$), llegando a una disminución total del 30 % (Fig. 6A). El contenido de nitrógeno y proteínas en el tejido de *Ulva* sp. durante el ciclo de cultivo tuvo una disminución significativa, con un decremento de ~20% de la S1 a la S4 ($r^2 = 0.080$; $p < 0.001$) (Fig. 6B). Por otra parte, se detectó un incremento significativo en el contenido de cenizas en la S3 y S4 en comparación con la S1 (~70%; $p = 0.005$) (Fig. 6C). En cuando al porcentaje de lípidos durante el ciclo de cultivo, durante la S2 se detectaron valores significativamente mayores (entre 10 – 20%; $p = 0.008$) en comparación con el resto de las semanas (Fig. 6D).

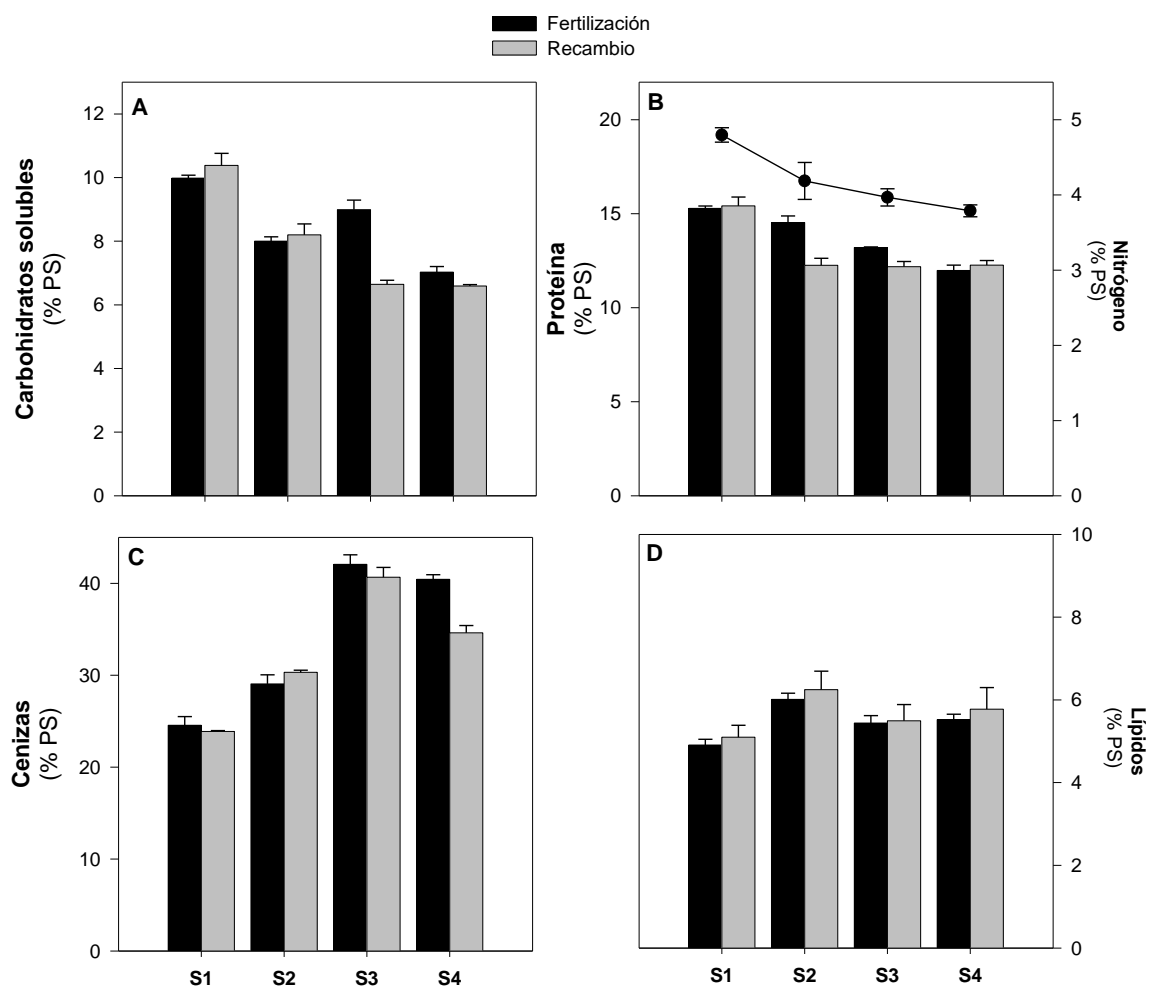


Figura 5. Variación de contenido proximal Carbohidratos solubles (A), Nitrógeno y Proteínas (B), Cenizas (C) y Lípidos (D), de *Ulva* sp. durante las semanas de cultivo (S 1-4), en los muestreos en el día de fertilización (negro) y día de recambio (gris). Los valores son los promedios ($n = 3$) y el error estándar

La capacidad antioxidante disminuyó significativamente de la S1 a la S4 ($\sim 30\%$; $p = 0.007$) (Fig. 7A). Aunque el contenido fenólico no presentó variaciones significativas, se detectó una disminución del $\sim 25\%$ en el día de recambio de la S4 con respecto a la S1 (Fig. 7B).

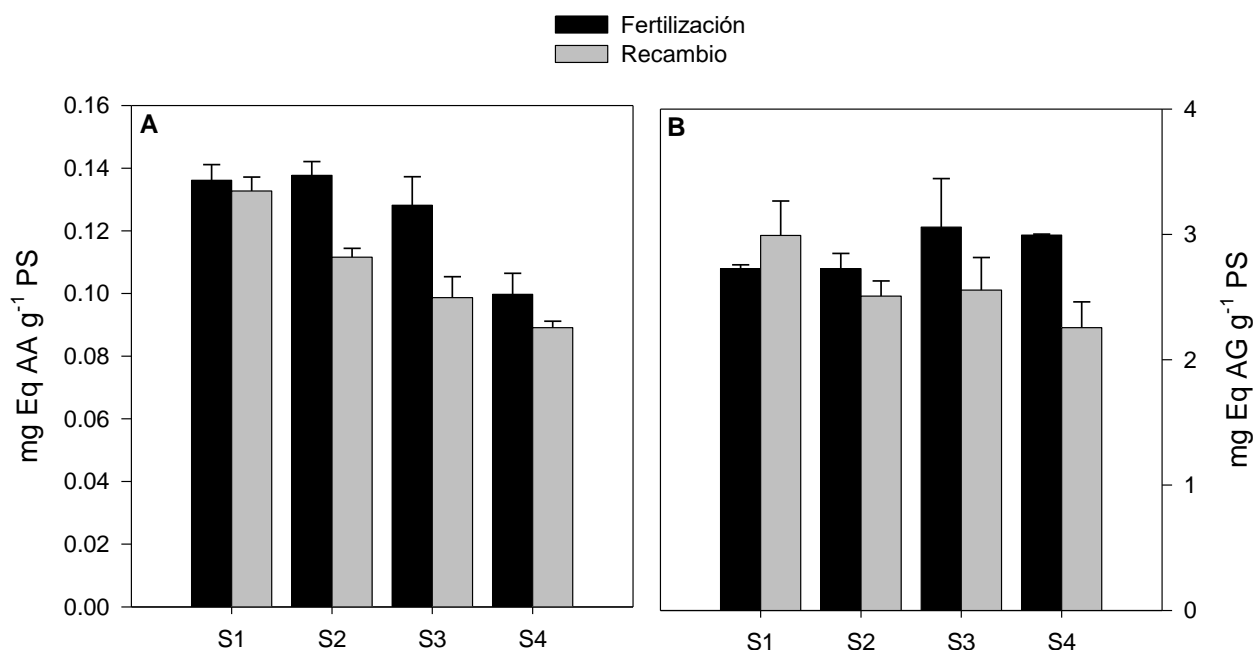


Figura 6. Variación de la capacidad antioxidante (A) y el contenido fenólico (B) de *Ulva sp.* durante las semanas de cultivo (S 1-4), en los muestreos en el día de fertilización (negro) y día de recambio (gris). Los valores son los promedios ($n = 3$) y el error estándar

La biomasa de *Ulva sp.* aumentó hasta ocho veces desde la primera hasta la última semana de cultivo ($1 \text{ kg PF m}^{-2} - \sim 8 \text{ kg PF m}^{-2}$) (resultado obtenido en la cosecha de cada uno de los estanques con *Ulva sp.* al final de las cuatro semanas de cultivo). Sin embargo, la eficiencia en productividad se redujo significativamente ($p < 0.001$) al disminuir su crecimiento específico hasta $\sim 80\%$ en las últimas dos semanas (Fig. 8A). El rendimiento se mantuvo en $\sim 300 \text{ g PF m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ la S1 y S2 de cultivo. Posteriormente disminuyó $\sim 50\%$ durante las últimas dos semanas (Fig. 8B).

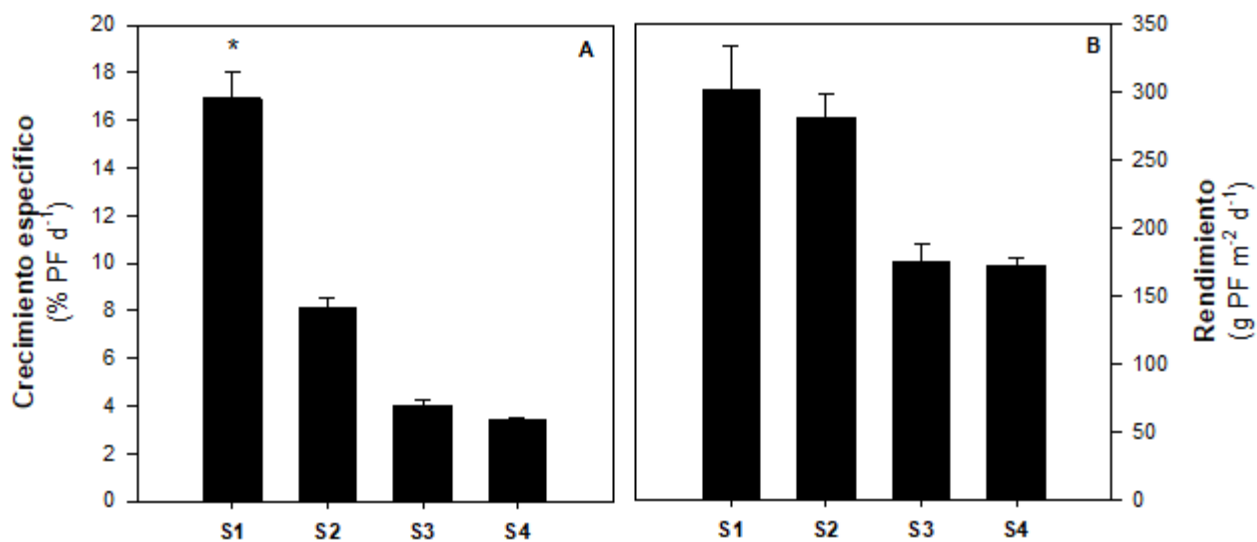


Figura 7. Variación del crecimiento específico (A) y el rendimiento (B) de *Ulva sp.* durante las semanas del ciclo de cultivo (S 1-4). Los valores son los promedios ($n = 3$) y el error estándar

Las cinéticas de incorporación de NH_4^+ y NO_3^- por *Ulva sp.* se ajustaron con precisión al modelo Michaelis–Menten ($R^2 > 0.94$) (Fig. 9). Las cinéticas de incorporación de NH_4^+ mostraron valores de V_{\max} y K_m muy superiores a los de las cinéticas de incorporación de NO_3^- . Por el contrario, los valores de α para la incorporación de NO_3^- fueron notablemente mayores que aquellos para la incorporación de NH_4^+ .

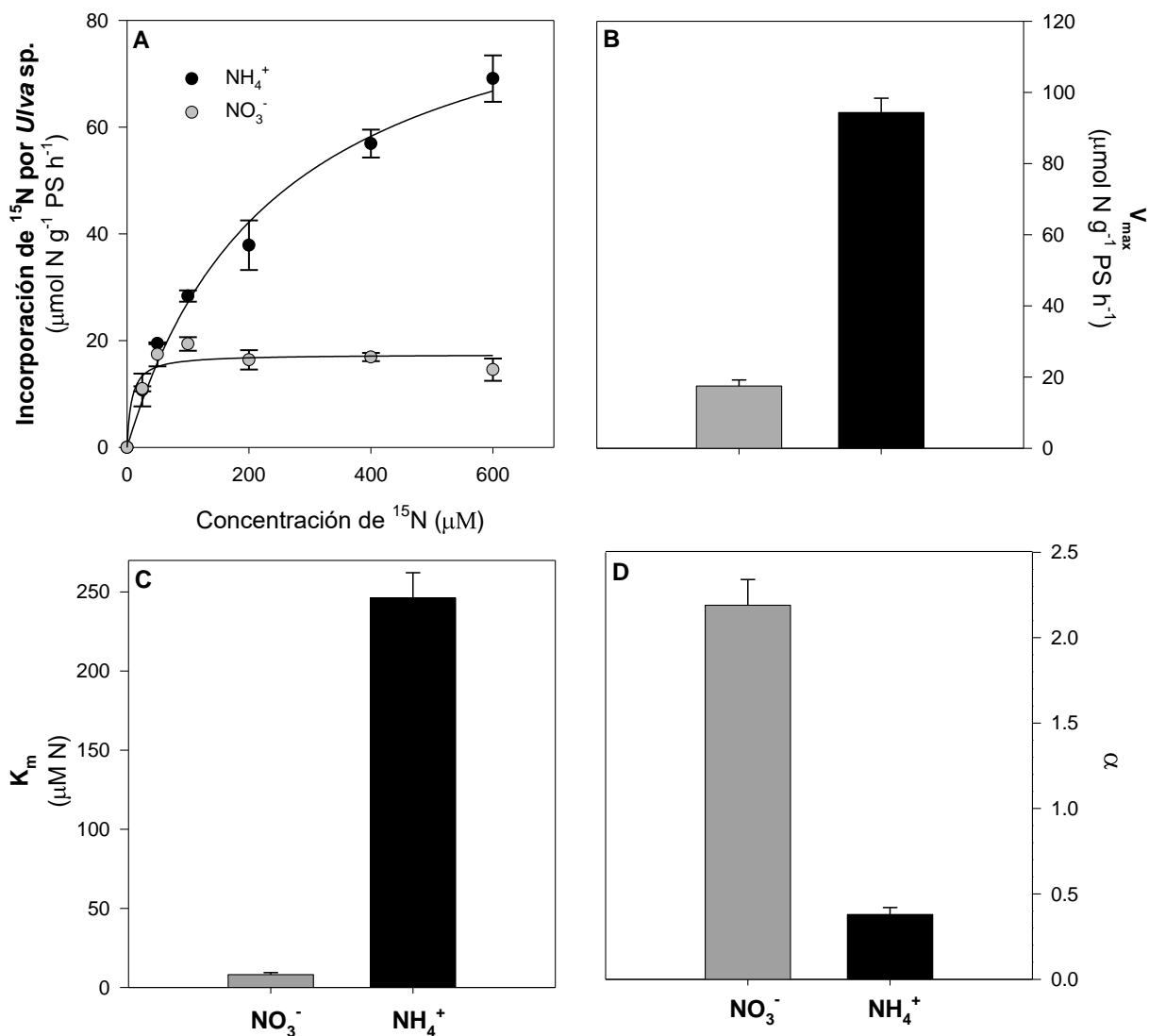


Figura 8. Cinéticas de incorporación de NO_3^- y NH_4^+ (A), tasas máximas de incorporación- V_{max} (B), K_m (C) y α (D) de *Ulva sp.* Los valores son los promedios ($n = 3$) y errores estándar.

Respecto de las tasas de incorporación de amonio y nitrato calculadas a partir de las concentraciones de ambos compuestos en el agua de los estanques (V_{amb}), se observó que las V_{amb} para nitrato se encuentran saturadas incluso a bajas concentraciones de este compuesto en la poza ($>40 \mu\text{M}$); por el contrario, todas las V_{amb} calculadas para amonio se encontraron en valores subsaturantes (Fig. 10A). La tasa de remoción de NH_4^+ durante el ciclo de cultivo en los días F fue aumentando al paso de las semanas de cultivo, con un consumo superior al 20% en la última semana en comparación a la primera (Fig. 10B). Por su parte, las tasas de remoción de NO_3^-

disminuyeron a partir de la S2 y en el resto del ciclo de cultivo, con una reducción total de ~40% (Fig. 10B). A lo largo de los días de F se observó un consumo rápido de amonio tras fertilizar a una concentración de 250 μM ; se observó un consumo total de amonio al final de los días F a partir de S3. (Fig. 10C). Para el caso del NO_3^- (Fig. 10D), el consumo tras la fertilización con una concentración de 290 μM , no fue tan efectivo en comparación con el amonio en los días F, ya que solo se consumió entre 100 – 150 μM durante el transcurso del día. Esto resultó en que, debido a que los recambios de agua no se realizaban al 100%, aún se detectaran concentraciones de nitrato entre 50 – 100 μM en los días R

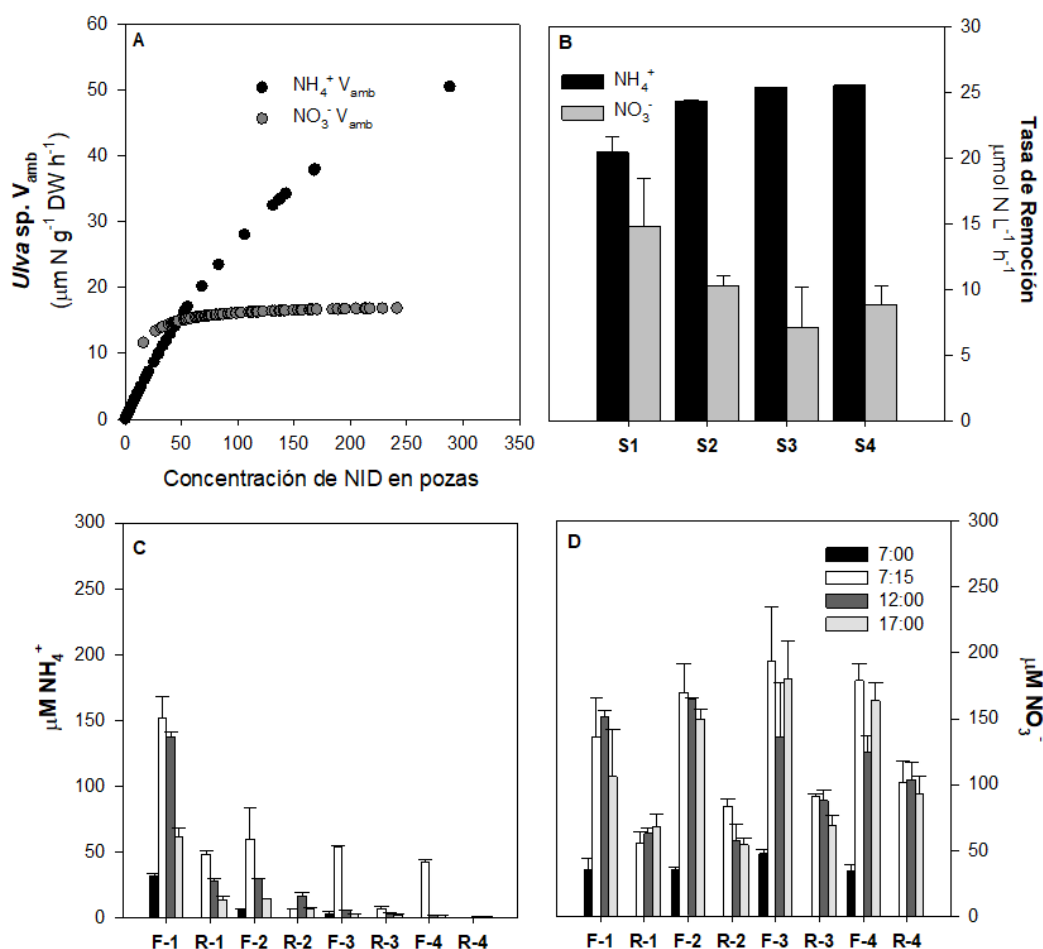


Figura 9. V_{amb} , Consumo, y concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- por *Ulva sp.* Tasas de incorporación de nitrato y amonio por *Ulva sp.* a las concentraciones reales de ambos compuestos en el agua de mar en poza de cultivo (A). Tasa de remoción de NH_4^+ y NO_3^- por *Ulva sp.* durante las cuatro semanas del ciclo de cultivo (B). Concentración de NH_4^+ (C) y NO_3^- (D) en el agua de mar de los estanques durante las semanas de cultivo (1-4), en los días de fertilización (F) y recambio de agua (R); las distintas barras indican la hora del día a la que se realizaron los muestreos.

3.2. Efectos en *Ulva* sp. de incrementos de T y pH bajo condiciones controladas de laboratorio (Exp. 2)

Las mayores tasas de fotosíntesis neta y bruta se observaron a 16°C y fueron significativamente menores a mayores temperaturas (~30%; $p = 0.012$) (Fig. 11A)

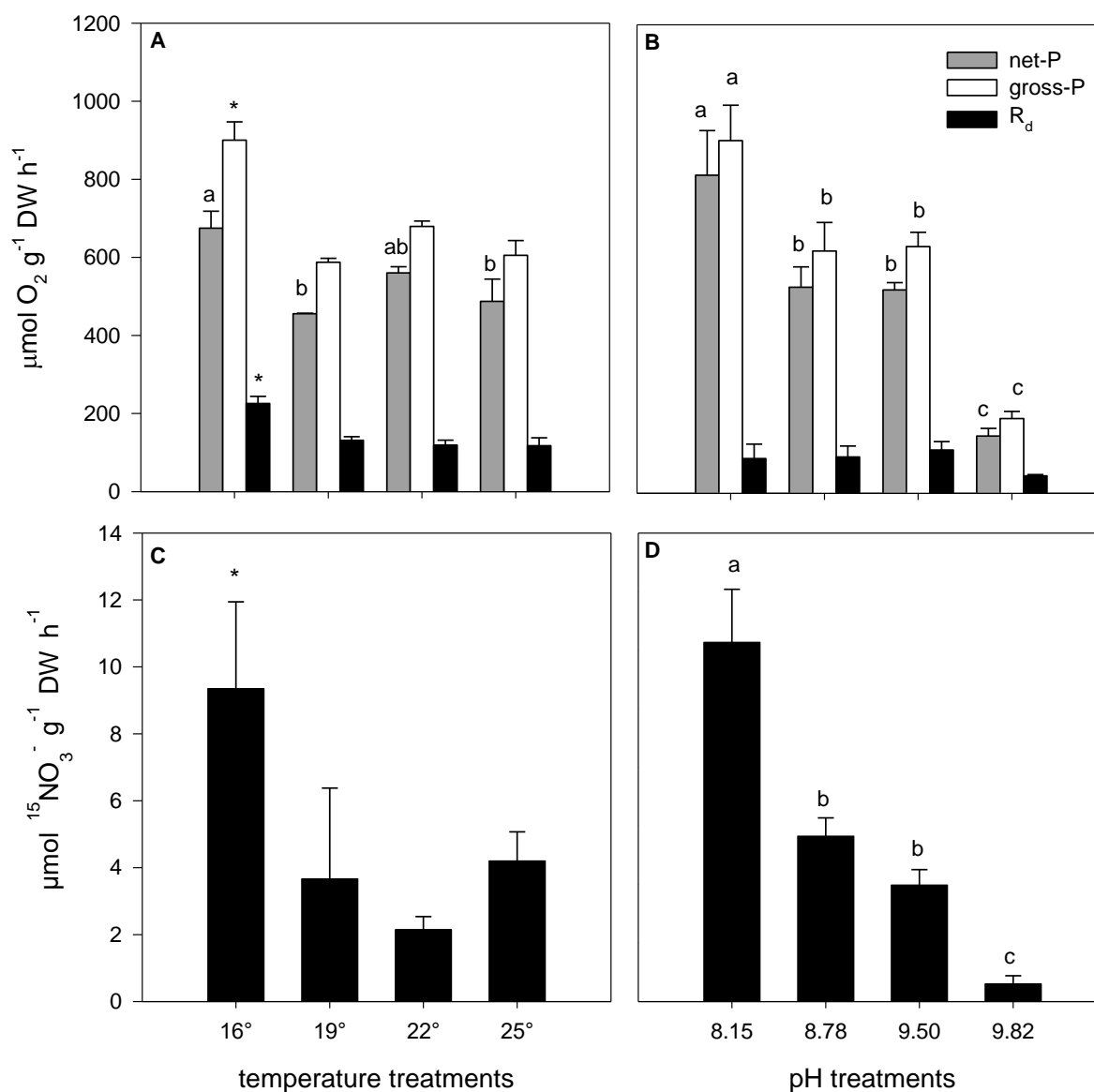


Figura 10. Variación de las tasas de Fotosíntesis neta (net-P), Fotosíntesis bruta (gross-P), respiración (A, B) y tasas de incorporación de NO_3^- (C, D) de *Ulva* sp en respuesta a incrementos de temperatura (paneles a la izquierda) y pH (paneles a la derecha). Los valores son promedios y error estándar. Las diferencias significativas (ANOVA una vía y post hoc SNK análisis) entre tratamientos son representadas con letras; cuando sólo un tratamiento es significativamente distinto se indica con un asterisco

Las tasas de respiración fueron significativamente mayores en el tratamiento de menor temperatura (16°C) ($p = 0.003$) (Fig. 11A). Las tasas de incorporación de $^{15}\text{NO}_3^-$ se redujeron significativamente (hasta $\sim 70\%$) con el aumento de la temperatura ($p = 0.027$) (Fig. 10C). Hubo una reducción significativa en las tasas fotosintéticas neta ($p < 0.001$) y bruta ($p < 0.001$) al incrementar los valores de pH (Fig. 11B). Del mismo modo, el incremento de pH redujo de manera significativa la incorporación de NO_3^- en *Ulva* sp., hasta el 95% en los tratamientos de pH más extremo (Fig. 11D). No se encontraron relaciones claras entre los tratamientos de temperatura/pH y los parámetros de fotoquímica y pigmentos, a excepción de una reducción significativa del NPQ con el incremento de T (Tabla 4).

Tabla 4. Variación de los descriptores de fotoquímica y concentración de pigmentos de *Ulva* sp. en respuesta a incrementos de pH y temperatura. Los valores presentados son los promedios ($n= 3$) y el error estándar. Las diferencias significativas (ANOVA una vía y post hoc SNK análisis) entre los distintos tratamientos de pH o temperatura son indicadas con asteriscos.

Descriptores		Tratamientos				F	p
		16	19	22	25		
		8.15	8.78	9.50	9.82		
ETR	T	30.67 ± 1.89	24.87 ± 0.70	30.17 ± 1.97	26.07 ± 1.30	3.628	0.064
	pH	30.30 ± 2.3	27.16 ± 1.28	30.30 ± 1.5	29.20 ± 0.05	0.924	0.472
Φ_{PSII}	T	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.005	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.001	3.6	0.065
	pH	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± <0.001	0.987	0.446
NPQ	T	0.89 ± 0.06 *	0.68 ± 0.04	0.62 ± 0.02	0.78 0.05	7.567	0.010
	pH	0.48 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.37 ± 0.06	2.905	0.101
Cl a	T	1542.72 ± 285.40	1718.64 ± 143.62	1623.55 ± 97.17	1587.91 ± 130.92	0.173	0.911
	pH	1493.43 ± 242.93	1586.79 ± 79.31	1209.32 ± 61.69	1781.19 ± 70.94	3.055	0.092
Cl b	T	1077.17 ± 190.37	1261.07 ± 96.33	1171.03 ± 83.18	1290.92 ± 74.12	0.643	0.609
	pH	1103.32 ± 175.92	1168.92 ± 76.08	905.34 ± 48.15	1266.08 ± 79.03	2.053	0.185
Carotenoides	T	184.76 ± 56.84	227.54 ± 13.03	214.93 ± 9.25	251.65 ± 33.92	0.669	0.595
	pH	245.56 ± 50.95	280.81 ± 9.61	179.39 ± 6.96	260.53 ± 1.74	6.487	0.090
Razón molar Clb/a	T	0.69 ± 0.03	0.72 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.80 ± 0.02 *	7.134	0.012
	pH	0.73 ± 0.002	0.72 ± 0.02	0.74 ± 0.003	0.70 ± 0.02	1.389	0.315

Capítulo 4. Discusión

4.1 Respuestas fisiológicas y crecimiento de *Ulva* sp. bajo las condiciones cambiantes de su cultivo.

Durante un periodo de cultivo (1 – 4 semanas), los incrementos de densidad, así como los cambios ambientales en los estanques con *Ulva* sp. provocaron variaciones en su crecimiento y fisiología, afectando la productividad del alga. La disminución tanto de la irradiancia como del CID, en conjunto con las variaciones de la temperatura, provocaron un cambio gradual durante las 4 semanas de cultivo, sin embargo, este cambio fue significativo hasta la S3 de cultivo. En nuestra ordenación MDS, se observa cómo existen cambios desde las S1 y S2, sin embargo, este cambio es aún más notorio hasta la S3 de cultivo. La disminución de la fotosíntesis y la reducción tanto de carbohidratos como del nitrógeno en el tejido, resultaron en un decremento de la productividad de ~ 50% al final de la misma semana. La variación en la fisiología experimentada por *Ulva* sp., así como la plasticidad que mostró durante el ciclo de cultivo, discutidos a continuación, proporcionaron información que puede ser aplicada a la optimización del sistema. *Ulva* sp. experimentó una reducción significativa en sus tasas de fotosíntesis bruta conforme avanza el ciclo de cultivo desde la primera hasta la última semana (reducción de hasta ~63% en la S4). Esta reducción resulta con la disminución de la luz dentro de los estanques; esto es de esperar, ya que la luz se encuentra entre los factores abióticos más importantes en la productividad de las algas, debido a que provee la energía para la fotosíntesis (Hurd *et al.* 2014). Kim *et al.* (2011) reportaron que hay una fuerte relación entre una alta productividad y alta disponibilidad de irradiancia en estadios tempranos de *Ulva liza* (especie laminar y de distribución intermareal), incluso cuando hay limitación por nutrientes, atribuyéndole a este parámetro mucho más peso que otros factores en el agua (i.e. concentración de nutrientes; temperatura) en

la proliferación de la macroalga. La mayor productividad de *Ulva* sp. dentro de los estanques de cultivo fue durante la S1, cuando las irradiancias eran más altas. Se ha reportado que diversas especies del género *Ulva* sp. tienen la capacidad de tolerar las altas irradiancias ($> 1500 \mu\text{mol foton}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sin afectar la productividad; estudios con *Ulva lactuca* (Cabello-Pasini *et al.* 2000) y con *Ulva prolifera* (Jie *et al.* 2016), atribuyen la tolerancia a altas dosis lumínicas a mecanismos fotoadaptativos y fotoreparadores, así como a la síntesis de compuestos fotoprotectores (carotenoides) y mecanismos de fotoinhibición (inhibición de proteínas) los cuales se discuten más adelante. Con el paso de las semanas y la disminución de la luz a través de la poza de cultivo, *Ulva* sp. disminuyó sus tasas fotosintéticas debido a un efecto de auto sombreado que disminuyó la cantidad de luz disponible para que el alga tuviera un proceso fotosintético óptimo. Xu *et al.* (2014) reportaron que en condiciones tanto limitantes como enriquecidas de N, y condiciones de altas y bajas irradiancias, *Ulva prolifera* tiene menores tasas de fotosíntesis cuando existe limitación por irradiancia, aunque se encuentre enriquecida con nutrientes. El incremento en la concentración de pigmentos de *Ulva* sp. parece consistente con esta potencial limitación por luz a lo largo del ciclo de cultivo. El aumento en la concentración de Cla, Clb, carotenoides y ratio Clb/Cla (i.e. tamaño de antena) se engloba dentro de los procesos clásicos de fotoaclimatación ante condiciones de limitación por luz en *Ulva* sp. y otras especies de macroalgas (Lapointe y Tenore 1981, Riechert y Dawes 1986, Xu y Gao 2008). La plasticidad fotosintética a nivel de pigmentos (y propiedades bio-ópticas) de *Ulva* sp. también se ha demostrado en comunidades intermareales de esta especie. Los procesos de fotoaclimatación de estas especies están condicionados por la disposición de las frondas a diferentes alturas dentro de los doseles; las frondas más expuestas reducen la cantidad de pigmentos para prevenir daños en el aparato fotosintético, mientras que aquellas protegidas dentro del dosel aumentan la cantidad de

pigmentos y por lo tanto, su capacidad de cosechar luz para fotosíntesis (Vergara *et al.* 1998; Longstaff *et al.* 2002). La aireación desde el fondo de la poza también ayudó a mitigar la limitación por luz al mantener las frondas en flotación y que el alga pudiera aprovechar la mayor cantidad de luz incidente en la superficie de la poza. Sin embargo, este movimiento también provocó que el alga se mantuviera en periodos de luz y oscuridad. Estos periodos intermitentes experimentados por *Ulva* sp. también pudieron provocar un aumento en la productividad del cultivo. En experimentos con *Chondrus crispus* los periodos cortos de luz y oscuridad a los que se encontraba sometida el alga, en un sistema por volteo, mejoraron su productividad hasta en un 50% (Bidwell *et al.* 1985). Luzi *et al.* (2019) proponen que la luz intermitente puede mejorar la productividad en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, esto debido al poco tiempo que se encuentra sometidas a altas dosis lumínicas, lo que disminuye la fotoinhibición y mejora la productividad. Msuya y Neori (2008) también proponen que la aireación en el tanque mejora la fotosíntesis debido a que el movimiento permite que los nutrientes, el CO₂ y el oxígeno, se distribuyan mejor a través de la capa limitante de la superficie del alga.

Si bien la irradiancia fue el parámetro ambiental más importante en la variación de la fotosíntesis de *Ulva* sp. durante el ciclo de cultivo (Tabla 3), otro factor que pudo contribuir a la disminución de las tasas fotosintéticas fue la temperatura. Dentro de los estanques, las temperaturas variaron notablemente, entre 13 – 18 °C en la S1 y S2, y aumentaron hasta 21°C en la S3 y a 20 °C en la S4. Además, en ciclos diarios las temperaturas incrementaron hasta 4 °C (Fig. 2). De acuerdo con nuestros resultados en laboratorio, a partir de los 19 °C las tasas fotosintéticas pueden sufrir drásticas disminuciones (Fig. 11), lo que indica que las temperaturas de los estanques en las últimas semanas contribuyeran también, además de la limitación por luz, a la disminución en la fotosíntesis. Los cambios en la fotosíntesis en organismos expuestos a cambios de temperatura,

ocurren cuando la planta quiere llegar al equilibrio entre la producción de energía fotosintética y el consumo de energía celular (Eggert 2012). Además, la limitación del crecimiento y las reducciones en tasas fotosintéticas por aumentos de temperatura, están relacionadas principalmente a la sensibilidad térmica de proteínas, enzimas y membranas a la temperatura (Eggert 2012); Este decremento de la fotosíntesis y la respiración en periodos cortos de tiempo también fue descrito para *Ulva rotundata* sometida a variaciones del nivel de marea durante el verano (Henley *et al.* 1992); sin embargo, en este estudio también se sugiere que el estrés causado por el aumento de la temperatura es más fuerte combinado con el estrés causado por la disminución en la irradiancia.

Además de los bajos niveles de irradiancia en la columna de agua de los estanques y los cambios en la temperatura, otro factor crítico que pudo estar relacionado con la reducción en las tasas fotosintéticas de *Ulva* sp. es la limitación por CID disponible para fotosíntesis (HCO_3^- , CO_2), reflejado en un aumento de pH. El pH del agua de mar refleja. El pH en el agua de mar, determina la concentración de las diferentes especies de CID; los procesos metabólicos como la fotosíntesis (consumo de CO_2 y HCO_3^-) tienen una gran influencia en su variación (Beer *et al.* 2014). Durante el ciclo de cultivo *Ulva* sp. fue capaz de elevar el pH hasta 10, donde agotó el CO_2 disponible para la fotosíntesis (Beer *et al.* 2014), y siguió adquiriendo CID mediante el consumo de HCO_3^- . Beer (1996) describió el proceso de incorporación de HCO_3^- por *Ulva* sp. principalmente por medio de dos estrategias o mecanismos de concentración de carbono: i) la anhidrasa carbónica (CA, por sus siglas en inglés; carbonic anhydrase) y ii) el transporte antiporte (AE, por sus siglas en inglés; anion exchanger). La CA actúa extra e intracelularmente. En el proceso extracelular la CA convierte HCO_3^- en CO_2 , que puede ser utilizado en dos vías: i) vuelve a convertir el CO_2 a HCO_3^- en la membrana plasmática para utilizar el CID en el proceso fotosintético intracelular; o bien, ii) puede

quedase en forma de CO_2 fuera de la membrana para mantener el pH extracelular. El proceso intracelular consiste en tomar HCO_3^- del citoplasma y convertirlo en CO_2 para que pueda ser utilizado por RUBISCO. El AE opera en la membrana, el HCO_3^- se une a un cotransportador que lo incorpora dentro de la célula y lo intercambia por un ion OH^- . Estos procesos son tan efectivos que son capaces de saturar la fotosíntesis del alga en ambientes marinos y proveerles ventajas sobre otras especies de algas en ambientes pobres en CO_2 (Giordano *et al.* 2005). Sin embargo, dentro de los estanques de cultivo, *Ulva* sp. fue capaz de elevar el pH hasta valores de 10; en sistemas cerrados de agua de mar con pH 10 el CID disponible para la fotosíntesis es nulo (Beer *et al.* 2014). Por tanto, el aumento del pH dentro de los estanques de cultivo también estuvo relacionado con la reducción de las tasas fotosintéticas en *Ulva* sp. a lo largo del ciclo de cultivo. Esta relación entre aumentos en pH y reducción en la fotosíntesis se ha reportado tanto para *Ulva* (Menéndez *et al.* 2001; Frost-Christensen y Sand-Jensen 1990) como para otros macrófitos sumergidos (Lignell y Pedersen 1989, Invers *et al.* 1997). A diferencia de los estanques de cultivo donde el pH aumentó debido al consumo de CID por procesos fotosintéticos, en los experimentos del laboratorio se modificó el pH añadiendo una base (NaOH al 40 %) que modificó la concentración de las formas iónicas de CID disponible para la fotosíntesis (HCO_3^-). Además, el aumento de pH en los experimentos del laboratorio también redujo significativamente las tasas fotosintéticas, coincidiendo con lo ocurrido en los estanques de cultivo.

En contraste con la reducción gradual de la fotosíntesis a lo largo del ciclo de cultivo, resulta interesante resaltar que en la S2 y S3 de cultivo se detectaron valores significativamente mayores de la fotosíntesis bruta en los días de fertilización con respecto a los días de recambio. El aumento en las tasas fotosintéticas después de la fertilización ha sido reportado para en algunos macrófitos sumergidos (Schaffelke y Klumpp 1998; Menéndez 2005; Sandoval-Gil *et al.* 2019). Sin embargo,

Longstaff *et al.* (2002) reportaron que a *Ulva lactuca* le bastó un periodo corto de tiempo (24 h) para aumentar sus tasas fotosintéticas. Zou (2014) demostró que la adición de N afecta de forma significativa en la fotobiología de *Ulva conglobata*, aumentaba la concentración de pigmentos y su capacidad fotosintética. Estudios en cultivos en tanques, han demostrado que una mayor disponibilidad de nutrientes, después de periodos de ausencia de los mismos, puede mejorar la fotosíntesis y el crecimiento de las macroalgas (Gómez-Pinchetti *et al.* 1998; Friedlander *et al.* 1991).

La biomasa de *Ulva* sp. utilizada en este estudio, fue tomada de estanques con una mayor densidad y menor irradiancia. Durante la primera semana de cultivo la irradiancia dentro de los estanques de cultivo llegó hasta $\sim 1500 \mu\text{mol fotón}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ debido a la poca densidad inicial del cultivo (1 kg m^{-3}), esto provocó estrés en el alga por sobre-exposición lumínica desencadenar fotoinhibición. Estos mecanismos de fotoaclimatación fueron detectados en las medidas de fluorescencia de la clorofila *a*. En primer lugar, *Ulva* sp. disminuyó su F_v/F_m para evitar daños en el PSII. Mhatre *et al.* (2018) también reportaron este efecto en *Ulva lactuca* cultivada en fotobiorreactores. Sin embargo, para el día dos de muestreo de la S1, el F_v/F_m incrementó de manera significativa, mostrando la elevada plasticidad y capacidad de recuperación de *Ulva* sp. bajo condiciones de estrés lumínico. Franklin *et al.* (1992) estudiaron los procesos de recuperación del F_v/F_m en *Ulva rotundata* expuesta a altas y bajas irradiancias; ellos reportaron que los procesos de photoinhibición y recuperación están relacionados con la irradiancia de cultivo. En algas que estaban aclimatadas a altas irradiancias los procesos de photoinhibición y recuperación estuvieron más relacionados con la destrucción y síntesis de la proteína D1; en algas adaptadas a irradiancias menores, los procesos de fotoaclimatación y recuperación estuvieron relacionados con el ciclo de las xantofilas, el cual se discutirá más adelante. Este mecanismo de

fotoinhibición y recuperación se ha reportado en diversos estudios en macroalgas del intermareal como *Fucus serratus* (Huppertz *et al.* 2007), *Chondrus crispus*, *Delesseria sanguinea*, *Porphyra sp.* (Hanelt *et al.* 1993), *Laminaria saccharina* (Gevaert *et al.* 2002) y *Ulva sp.* (Cabello-Pasini *et al.* 2000, Malta y de Nys 2016) a partir de medidas de fluorescencia de la clorofila *a* en simulaciones de marea en ciclos diarios de irradiancia. Estos estudios han demostrado que las especies del intermareal decrecen su F_v/F_m al medio día, donde la irradiancia es mayor, y tienen una completa recuperación al anochecer.

El NPQ de la primera semana fue mayor que en el resto del cultivo, esto probablemente debido a las altas irradiancias dentro del estanque. El aumento de NPQ es utilizado como mecanismo de autoprotección, al disipar el exceso de energía fotónica recibida por la planta en forma de calor mediante el ciclo de las xantofilas (Niyogi 2000).; una fuerte disminución de pH en el lumen, debido a la acumulación de H^+ relacionada con un mayor transporte electrónico por absorción excesiva de fotones, activa el ciclo de las xantofilas, provocando la acumulación de zeaxantina; esta acidificación del lumen también provoca una protonación en el Complejo Cosechador de Luz (LHC por sus siglas en inglés: *Light Harvesting Complex*). Ambos mecanismos provocan un cambio conformacional en el LHC, que resulta en un cambio de absorbancia del mismo (585 nm) esto produce que la energía que excita a la clorofila *a* se disipe de manera no fotoquímica y en forma de calor. Osmond *et al.* (1993) reportaron que, en frondes adaptados a altas irradiancias, *Ulva rotundata* es capaz de prevenir el daño en el aparato fotosintético de manera efectiva, aumentando el NPQ en irradiancias crecientes. En las siguientes semanas de cultivo, la disminución de la irradiancia dentro de la poza de cultivo provocó que *Ulva sp.* disminuyera su NPQ. Se ha demostrado que los mecanismos de fotoprotección pueden ser reversibles a corto plazo. Por ejemplo, Gevaert *et al.* (2002) midieron el NPQ en la especie intermareal *Laminaria saccharina* a

irradiancias crecientes y decrecientes, simulando un ciclo diario; estos autores observaron que el NPQ aumentaba a irradiancias crecientes, pero disminuía rápidamente a la vez que las irradiancias se atenuaban. En nuestro estudio, los valores de ETR y el Φ_{PSII} fueron significativamente mayores en la S1 y fueron disminuyendo con el paso de las semanas, llegando a una disminución del 50%. El aumento de biomasa dentro de los estanques de cultivo limitó la irradiancia disponible para *Ulva* sp., lo que provocó menos energía fotónica para la fotosíntesis. Rautenberger *et al.* (2015) también documentaron la estrecha relación que existe entre la poca disponibilidad de irradiancia y una disminución la ETR de *Ulva rigida*. Un estudio realizado en *Pyropia haitanensis* (Jiang *et al.* 2017) resultó en ETRs significativamente menores en altas densidades de siembra (5 g L^{-1}) en comparación a bajas densidades (1 g L^{-1}), debido a la poca disponibilidad de irradiancia.

Los carbohidratos solubles en *Ulva* sp. tuvieron una disminución gradual de la S1 a la S4, con una reducción total de $\sim 30\%$. Esta reducción en carbohidratos parece consistente con el decremento en las tasas fotosintéticas y las tasas de crecimiento de *Ulva* sp. Mohy El-Din (2018) observó que la mayor concentración de carbohidratos en *Ulva lactuca* se detectó en verano, relacionado con el periodo de máxima productividad, cuando las irradiancias eran mayores. Al igual que los carbohidratos, el nitrógeno y la proteína en el tejido de *Ulva* sp. tuvo una reducción gradual de la S1 a la S4, de valores cercanos a 4% PS en la S1, a valores de 3% PS en la S4. Esta reducción, al igual que la de los carbohidratos, pudo estar relacionada con la disminución de la fotosíntesis al paso de las semanas de cultivo. La disminución de fotosintatos para la formación de esqueletos de carbono y la obtención de energía metabólica reduce la capacidad de las macroalgas para la asimilación de N y, por lo tanto, la formación de aminoácidos y proteínas (Hurd *et al.* 2014). La disminución del contenido en el tejido de *Ulva* sp. también pudo estar relacionada con la

disponibilidad de nitrato en las últimas semanas de cultivo. Si bien en la S1 y S2 tanto el amonio como el nitrato eran suficientes para abastecer el cultivo, a partir de la S3 la biomasa dentro de la poza agotó rápidamente el amonio después de la fertilización, por lo que el nutriente disponible para *Ulva* sp. era el nitrato. En nuestros experimentos de laboratorio, tanto el aumento en pH como el aumento de temperatura disminuyeron significativamente la incorporación de NO_3^- , por lo que el aumento de estos parámetros, tanto en ciclos diarios como en la S3 y S4 de cultivo, pudieron provocar una limitación en su incorporación. Las consideraciones fisiológicas de este comportamiento se discuten con más detalle en la sección 4.2. Por otro lado, el contenido de cenizas durante el ciclo de cultivo de *Ulva* sp. fue significativamente menor en la S1 y S2, aumentando hasta un 70% durante la S3 y S4. Lapointe y Tenore (1981) reportaron que en el cultivo de *Ulva fasciata* hay una fuerte relación entre alta disponibilidad de irradiancia, cuando hay mayores tasas de fotosíntesis, una mayor acumulación de componentes orgánicos y mayores tasas de crecimiento, con un bajo porcentaje de cenizas en el tejido. Por otro lado, la concentración de lípidos en el tejido se mantuvo relativamente constante entre ~5 a 6 % PS. En diversos estudios se ha demostrado que el cambio en concentración de lípidos, es resultado de los cambios provocados por la temperatura en ácidos grasos o lípidos estructurales (Floreto *et al.* 1993). A pesar de que los cambios en temperatura fueron de hasta 4°C durante el día, es posible que el alga no se mantuviera el suficiente tiempo en un estrés térmico como para causar un cambio en la composición de lípidos totales.

La capacidad antioxidante de *Ulva* sp. fue significativamente más alta en la S1 y disminuyó gradualmente a lo largo del ciclo de cultivo. La elevada capacidad antioxidante durante la S1 puede interpretarse como una respuesta al exceso de irradiancia dentro de los estanques de cultivo. El exceso de irradiancia en las macroalgas puede resultar en procesos generadores de

especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tales como la reacción de Mehler (Bischof y Rautenberger 2012). Los ROS pueden ser capaces de desnaturalizar proteínas, ácidos nucleicos y peroxidar lípidos, lo que puede traducirse en un daño bioquímico severo y puede llegar a comprometer la supervivencia de la planta (Bischof y Rautenberger 2012). Es por esta razón que las plantas tienen diversos mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos para poder minimizar los efectos negativos de las ROS. Se ha reportado que especies de *Ulva* contienen metabolitos secundarios a los que se les atribuye actividad antioxidante tales como polisacáridos sulfatados (Peasura *et al.* 2015), β -caroteno, ácido linoleico, carotenoides (Abd El-Baky *et al.* 2008) y terpenos (Chakraborty y Paulraj 2010), entre otros. A pesar de que el contenido en fenoles se redujo sensiblemente a partir de S2 en los días de R, no se encontró una tendencia significativa general con respecto al avance del cultivo. Sin embargo, las mayores concentraciones de fenoles en la S1, pudo resultar en un mecanismo de protección ante las altas irradiancias dentro del estanque. Se ha reportado que existe una fuerte relación entre la capacidad antioxidante de las macroalgas y su contenido fenólico (Chakraborty *et al.* 2015; Zubia, Payri, y Deslandes 2008; Kim *et al.* 2005) ya que los fenoles actúan contra las ROS (Bischof y Rautenberger 2012). Los fenoles también se incluyen en diversos compuestos que se encuentran en gran concentración en las macroalgas, ya que tienen distintas funciones además de la capacidad antioxidante, como en la estimulación del crecimiento, la formación de las células, la reproducción, entre muchas otras (Freile-Pelegrín y Robledo 2013). Por esta razón, su presencia seguía siendo consistente en *Ulva* sp. a lo largo del ciclo de cultivo.

La tasa de crecimiento específica (TCE) disminuyó significativamente a partir de la segunda semana de cultivo de $\sim 18\%$ a $\sim 8\%$ PF d^{-1} . Como se mencionó anteriormente, en el transcurso de las semanas de cultivo hubo una disminución de la fotosíntesis, lo que limitó los esqueletos de

carbono para la formación de metabolitos primarios como carbohidratos y proteínas, afectando a *Ulva* sp. en su desarrollo y crecimiento. Estudios en *Ulva* y otras especies de macroalgas han reportado que, tanto la limitación por luz (Rautenberger *et al.* 2015; Lapointe y Tenore 1981; Jiang *et al.* 2017; Zou 2014), como la disminución de CID disponible para fotosíntesis (Lignell y Pedersen 1989; Gordillo *et al.* 2001) y el aumento de la temperatura (Fortes y Lüning 1980, Duke *et al.* 1989), afectan directamente las tasas de crecimiento específicas.

El rendimiento se vio afectado de manera significativa a partir de S3, disminuyendo ~40 % hasta valores de ~170 g PF m⁻² d⁻¹. En un estudio con *Ulva lactuca*, Al-Hafedh *et al.* (2015) reportaron que las altas densidades de siembra afectan de forma negativa a las TCE, pero no al rendimiento. Lapointe y Tenore (1981) obtuvieron resultados similares para *Ulva fasciata*; el rendimiento pudo mantenerse en valores máximos en densidades intermedias, donde procesos de fotoaclimatación (i.e. aumento de pigmentos) ayudaron a una mayor captación de luz, mejorando las tasas fotosintéticas y la productividad. A pesar de la reducción en el crecimiento en el transcurso de cuatro semanas de cultivo, *Ulva* sp. obtuvo TCE ~18 % d⁻¹ y un rendimiento máximo de ~390 g PF m⁻² d⁻¹ que, en comparación con otros sistemas de cultivo de *Ulva* sp., se encuentran por encima o en el rango de productividad (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación entre TCE (% PF d⁻¹), Rendimiento (g PF m⁻² d⁻¹) de *Ulva* sp. en diferentes estudios, por efecto de tiempo de cosecha (días), duración (días) y método de cultivo. *Sistemas acuícolas multitróficos integrados abreviado como IMTA (por sus siglas en inglés; Integrated Multitrophic Aquaculture)

Taxa	Sistema	Duración del cultivo (días)	Cosechas (días)	TCE máx. (%PF d-1)	Rendimiento (g PF m-2 d-1)	Referencia
<i>Ulva</i> sp.	Estanques	30	-	18	390	Este estudio
<i>U. lactuca</i>	Tanques (IMTA*)	21	7	16.8	320	Neori <i>et al.</i> 1991
<i>U. lactuca</i>	Tanques	90	7	18.7	433	Bruhn <i>et al.</i> 2011
<i>U. lactuca</i>	Tanques (IMTA*)	30	10	12	300	Al-Hafedh <i>et al.</i> 2015
<i>U. lactuca</i>	Paneles	30	2	25.8	303	Mhatre <i>et al.</i> 2018a

4.2 Cinéticas de incorporación de NID en *Ulva* sp.

Las tasas máximas de incorporación (V_{max}) y la constante de saturación (K_m) de NH_4^+ indican que *Ulva* sp. tiene una mayor capacidad de incorporación de este nutriente en comparación con NO_3^- . La preferencia de incorporar NH_4^+ sobre el NO_3^- ha sido reportada en otras especies de Ulváceas como *Ulva lactuca* (Döhler *et al.* 1995, Runcie *et al.* 2003, Ale *et al.* 2011) y *Ulva linza* (Luo *et al.* 2012), así como también para otras especies de macroalgas (Ahn *et al.* 1998; Abreu *et al.* 2011; Phillips y Hurd 2004; Nishihara *et al.* 2005) y pastos marinos (Sandoval-Gil *et al.* 2015). Esta preferencia está determinada principalmente por los diferentes mecanismos de incorporación de estos nutrientes; la insaturación de las tasas de incorporación de amonio en algunas especies de macroalgas (Lavery y McComb 1991; Phillips y Hurd 2004; Abreu *et al.* 2011) sugiere que el mecanismo de incorporación se realiza de forma pasiva, posiblemente vía canales iónicos (Lobban y Harrison 1994). Por su parte, la incorporación de nitrato parece estar mediada por transportadores activos y su asimilación a compuestos nitrogenados orgánicos requiere de más gasto metabólico, ya que debe reducirse a NH_4^+ para ser asimilado (Lobban y Harrison 1994; Phillips y Hurd 2004; Abreu *et al.* 2011). En contraste, *Ulva* sp. mostró una mayor afinidad (α) en la incorporación de nitrato. En general, estas diferencias en las cinéticas de incorporación también responden a la disponibilidad de ambos nutrientes en los hábitats que ocupa esta especie en Baja California y otros sistemas costeros. Por ejemplo, en lagunas costeras de fondos lodosos *Ulva* sp. tiene acceso a elevadas concentraciones de amonio ($>500 \mu M$) en sedimentos, así como a pulsos de este nutriente en la columna de agua debido a eventos de resuspensión; por tanto, elevadas V_{max} y K_m le permiten aprovechar eficientemente este recurso (Sandoval-Gil *et al.* 2016, 2019; Sandoval-Gil *et al.* (2015). Sin embargo, la disponibilidad de nitrato es mucho más escasa ($<2 \mu M$), y sus concentraciones máximas sólo alcanzan $\sim 20 \mu M$ durante eventos de

surgencias; la baja disponibilidad de este nutriente hace necesario que esta especie dependa de mayores eficiencias de incorporación de esta agua nitrogenada a bajas concentraciones. Zertuche-González *et al.* (2009) reportaron que la biomasa de *Ulva* sp. en una laguna costera de Baja California, aumenta en temporadas de surgencias (May-Jun). En estas condiciones, los mantos de macroalga localizados en la zona de la boca de la laguna mostraron mayor cantidad de N en sus tejidos, donde la disponibilidad de nitrato aumenta (7 – 12 μM) debido a una mayor influencia de las surgencias que en el resto de la laguna (1 – 6 μM). Diversos estudios han documentado que especies colonizadoras del intermareal como las *Ulvaceas*, con altas tasas de crecimiento, tienen una mayor capacidad de incorporar nitrato en bajas concentraciones, lo que les confiere una ventaja sobre otras especies (Pedersen y Borum 1996, Phillips y Hurd 2004, Luo *et al.* 2012). Angell *et al.* (2014) reportaron que *Ulva onohi* fue capaz de mantener sus mayores tasas de crecimiento con bajos flujos de nitrato y bajo contenido interno de N; esto debido a que los aminoácidos esenciales para la construcción de proteínas estructurales y metabólicas se forman a partir de un bajo contenido de N interno; cuando las concentraciones de N interno aumentan, por un exceso en el N externo, se forman aminoácidos libres (glutamina, ácido glutámico y arginina) que sirven de almacén para el alga, lo que limita el crecimiento de la misma. Esto puede ser un rasgo positivo al fertilizar con nitrato, ya que basta poca cantidad del nutriente para maximizar la productividad.

Las cinéticas de incorporación de amonio como del nitrato respaldan las variaciones en las concentraciones de estos compuestos usados como fertilizante en los estanques de cultivo. Específicamente, el amonio se consumió eficientemente tras los pulsos de fertilización (250 μM) y dicho consumo se incrementó conforme aumentó la biomasa del alga a lo largo del ciclo de cultivo, hasta su consumo total al final de los mismos días F. Además, las propiedades cinéticas

para la incorporación del amonio ($\text{Km} \sim 250 \mu\text{M}$) permiten la rápida incorporación de este nutriente a sus máximas concentraciones de fertilización, proceso que se conoce como “surge uptake”, y que se ha documentado en *Ulva lactuca* y pastos marinos durante pulsos de fertilización natural (p.e., resuspensión de sedimentos) (Fujita 1985; Sandoval-Gil *et al.* 2019, 2016). De forma contraria, el consumo de nitrato por parte del alga fue mucho menor, y las concentraciones en los estanques se mantuvieron $\geq 150 \mu\text{M}$, excepto en los días R, sin embargo, esos días las concentraciones se encontraban $> 20 \mu\text{M}$, debido a que el recambio de agua era del 80%, dejando un remanente de nitrato en el agua del estanque. Además, el consumo de nitrato no se incrementó conforme al aumento de biomasa desde S1 a S4, lo que sugiere un efecto antagónico entre el consumo de amonio y nitrato. Se ha demostrado que puede existir inhibición de incorporación de nitrato en presencia de amonio. Abreu, Pereira, Buschmann, *et al.* (2011) reportaron esta inhibición en *Gracilaria vermiculophylla*; ellos sugieren que una posible explicación para este comportamiento es que el alga fue capaz de llenar sus reservas internas de N con NH_4^+ , lo que posiblemente suprimió la absorción de NO_3^- . Esta misma respuesta se ha reportado en *Ulva lactuca* (Ale *et al.* 2011) y otras especies de algas (Hanisak y Harlin 1978, Dortch 1990). La incorporación de nitrato también pudo verse afectada por los cambios en temperatura y pH a lo largo del cultivo. En los experimentos realizados en laboratorio, exposiciones de corta duración (minutos) a incrementos de pH y temperatura afectaron de manera significativa la incorporación de nitrato de *Ulva* sp; esto sugiere que incluso los cambios diarios de dichas variables pueden afectar a la incorporación de este nutriente. Fan *et al.* (2014) reportaron que con el aumento de temperatura entre los 20 y 30 °C, *Ulva prolifera* disminuye la incorporación de nitrato en incubaciones de 6 h, demostrando que la macroalga responde de manera rápida a cambios en este parámetro; sin embargo, los estudios realizados en el laboratorio con *Ulva* sp.

para el presente estudio, indican que estas respuestas pueden ser en periodos aún más cortos. Liu y Zou (2015), reportaron este mismo comportamiento en *Ulva lactuca* al observar un decremento en la actividad de la enzima nitrato reductasa después de los 20°C, lo que puede explicar la baja incorporación del nitrato por *Ulva sp.* cerca de estas temperaturas.

Capítulo 5. Conclusiones

1. Los cambios en pH, irradiancia y temperatura durante un ciclo de cultivo (4 semanas 1-8 kg m⁻³) tuvieron un efecto significativo en el crecimiento y fisiología de *Ulva sp.* en la semana 3 de cultivo.
2. La disminución de la irradiancia combinada con el estrés por cambios de temperatura y agotamiento de CID redujeron las tasas fotosintéticas de manera significativa durante el ciclo de cultivo, causando que para la S4 estas tasas ya no se recuperaran.
3. El contenido de nitrógeno y carbohidratos disminuyó como resultado de la reducción de las tasas fotosintéticas, lo que se tradujo en un menor crecimiento.
4. *Ulva sp.* demostró gran plasticidad ante el exceso de irradiancia disminuyendo la Fv/Fm y aumentando la capacidad antioxidante, lo que le permitió evitar daños en el fotosistema durante la S1 de cultivo, cuando las irradiancias eran mayores.
5. *Ulva sp.* desarrolló estrategias de fotoaclimatación ante la disminución de la irradiancia aumentando la concentración de sus pigmentos para una mayor captación de luz disponible.
6. Las estrategias de aclimatación de *Ulva sp.* ayudaron a que el rendimiento se mantuviera por encima o en el rango de productividad de otros cultivos en sistemas semicerrados.

7. Es evidente la preferencia de *Ulva* sp. por la adquisición del amonio sobre el nitrato, sin embargo, la incorporación de nitrato también se vio afectada por la presencia de amonio, el aumento de pH y el aumento de temperatura

5.2 Consideraciones para el cultivo de *Ulva* sp.

1. En densidades de siembra de 1kg m^{-3} en periodos de invierno-primavera se recomienda, para la especie de *Ulva* sp. usada en este estudio, que durante la S3 de cultivo se realice una cosecha para regresar al cultivo a su densidad inicial. De este modo se podrá mantener al alga en una fase de máxima productividad.
2. La fertilización con nitrato se debe realizar en ausencia de amonio, además debe ser realizada en el amanecer, cuando el pH y la temperatura son más bajos.
3. Los estudios de las respuestas fisiológicas en macroalgas ante los cambios en la variación de los parámetros ambientales y densidades de siembra, puede proporcionar información que puede ayudar a mejorar la productividad del cultivo. Estos estudios pueden aplicarse tanto a otras especies, como de otros sistemas de cultivo.

Literatura citada

- Abbas, Z., Ajay, T. & Kumar, P. 2018. Emerging Trends of Plan Physiology for Sustainable Crop Production. 394 pp.
- Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K. & El-Baroty, G.S. 2008. Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 7:3353–67.
- Abreu, M.H., Pereira, R., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I. & Yarish, C. 2011a. Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 407:190–9.
- Abreu, M.H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A.H. & Sousa-Pinto, I. 2011b. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture.* 312:77–87.
- Ahn, O., Petrell, R.J. & Harrison, P.J. 1998. Ammonium and nitrate uptake by *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana* originating from a salmon sea cage farm. *J. Appl. Phycol.* 10:333–40.
- Al-Hafedh, Y.S., Alam, A. & Buschmann, A.H. 2015. Bioremediation potential, growth and biomass yield of the green seaweed, *Ulva lactuca* in an integrated marine aquaculture system at the Red Sea coast of Saudi Arabia at different stocking densities and effluent flow rates. *Rev. Aquac.* 7:161–71.
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. & Meyer, A.S. 2011. Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *J. Appl. Phycol.* 23:345–51.
- Anderson, M., Gorley, R. & Clarke, R. 2008. Permanova+ for primer: Guide to software and statistical methods. *Prim. Ltd.*
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R. & Paul, N.A. 2016. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *J. Appl. Phycol.* 28:511–24.
- Angell, A.R., Mata, L., Nys, R. De & Paul, N.A. 2014. Variation in amino acid content and its relationship to nitrogen content and growth rate in *Ulva onohi* (Chlorophyta). *Phycol. Soc. Am.* 50:216–26.
- Association, A.P.H., Association, A.W.W. & Federation, W.P.C. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th edition.
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant*

- Biol.* 59:89–113.
- Beer, S. 1996. Photosynthetic utilisation of inorganic carbon in *Ulva*. *Sci. Mar.* 60:125–8.
- Beer, S., Björk, M. & Beardall, J. 2014. Photosynthesis in the Marine Environment. 2nd editio. Wiley Blackwell, Oxford. 208 pp.
- Bibi, A.C., Oosterhuis, D.M. & Gonias, E.D. 2008. Molecular Biology and Physiology Photosynthesis, quantum yield of photosystem ii and membrane leakage as affected by high temperatures in cotton genotypes. *J. Cotton Sci.* 12:150–9.
- Bidwell, R.G.S., McLachlan, J. & Lloyd, N.D.H. 1985. Tank Cultivation of Irish Moss, *Chondrus crispus* Stackh. *Bot. Mar.* 28:87–98.
- Bilger, W. & Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25:173–85.
- Bischof, K. & Rautenberger, R. 2012. Seaweed Responses to Environmental Stress: Reactive Oxygen and Antioxidative Strategies. *En Seaweed Biology*. Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, pp. 109–32.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181:1199.
- Bohnert, H.J. & Jensen, R.G. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14:89–97.
- Bolton, J.J., Robertson-Andersson, D. V., Shuuluka, D. & Kandjengo, L. 2009. Growing *Ulva* (chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South africa: A swot analysis. *J. Appl. Phycol.* 21:575–83.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B. *et al.* 2011. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresour. Technol.* 102:2595–604.
- Buschmann, A.H., Camus, C., Infante, J., Neori, A., Israel, Á., Hernández-González, M.C., Pereda, S. V. *et al.* 2017. Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *Eur. J. Phycol.* 52:391–406.
- Cabello-Pasini, A., Aguirre-Von-Wobeser, E. & Figueroa, F.L. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor culture systems. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 57:169–78.
- Capo, T.R., Jaramillo, J.C., Boyd, A.E., Lapointe, B.E. & Serafy, J.E. 1999. Sustained high yields of *Gracilaria* (Rhodophyta) grown in intensive large-scale culture. *J. Appl. Phycol.* 11:143–7.
- Chakraborty, K., Joseph, D. & Praveen, N.K. 2015. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *J. Food Sci. Technol.* 52:1924–35.
- Chakraborty, K. & Paulraj, R. 2010. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties

- from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. *Food Chem.* 122:31–41.
- Chapman, A. 1990. Effects of grazing canopy cover and substratum type on the abundances of common species of seaweeds inhabiting littoral fringe tide pools. *Bot. Mar.* 33:319–26.
- Cohen, Y. & Neori, A. 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents. *Bot. Mar.* 34:475–82.
- da Gama, B.A.P., Santos, R.P. d. A. & Pereira, R.C. 2008. The effect of epibionts on the susceptibility of the red seaweed *Cryptonemia seminervis* to herbivory and fouling. *Biofouling.* 24:209–18.
- DeBusk, T.A. & Ryther, J.H. 1984. Effects of Seawater Exchange, pH and Carbon Supply on the Growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in Large-scale Cultures. *Bot. Mar.* 27:357–62.
- Döhler, G., Hagmeier, E. & David, C. 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ¹⁵N ammonium and ¹⁵N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 30:179–87.
- Dortch, Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61:183–201.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28:350–6.
- Duke, C.S., Litaker, W. & Ramus, J. 1989. Effect of temperature on nitrogen-limited growth rate and chemical composition of *Ulva curvata* (Ulvales: Chlorophyta). *Mar. Biol.* 100:143–50.
- Eggert, A. 2012. Seaweed Responses to temperature. *En Seaweed Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 47–66.
- El Maghraby, D.M. & Fakhry, E.M. 2015. Lipid content and fatty acid composition of Mediterranean macro-algae as dynamic factors for biodiesel production. *Oceanologia.* 57:86–92.
- Fan, X., Xu, D., Wang, Y., Zhang, X., Cao, S., Mou, S. & Ye, N. 2014. The effect of nutrient concentrations, nutrient ratios and temperature on photosynthesis and nutrient uptake by *Ulva prolifera*: implications for the explosion in green tides. *J. Appl. Phycol.* 26:537–44.
- Fleurence, J., Le Coeur, C., Mabeau, S., Maurice, M. & Landrein, A. 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *J. Appl. Phycol.* 7:577–82.
- Floreto, E. a. T., Hirata, H., Ando, S. & Yamasaki, S. 1993. Effects of Temperature, Light Intensity, Salinity and Source of Nitrogen on the Growth, Total Lipid and Fatty Acid Composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). *Bot. Mar.* 36:149–58.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. 1927. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* 627–650.

- Fortes, M.D. & Lüning, K. 1980. Growth rates of North Sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 34:15–29.
- Franklin, L.A., Levavasseur, G., Osmond, C.B., Henley, W.J. & Ramus, J. 1992. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta*. 186:399–408.
- Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. 2013. Bioactive Compounds from Marine Foods. *En* Hernández-Ledesma, B. & Herrero, M. [Eds.] *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Friedlander, M., Krom, M.D. & Ben-Amotz, A. 1991. The Effect of Light and Ammonium on Growth, Epiphytes and Chemical Constituents of *Gracilaria conferta* in Outdoor Cultures. *Bot. Mar.* 34:161–6.
- Frost-Christensen, H. & Sand-Jensen, K. 1990. Growth rate and carbon affinity of *Ulva lactuca* under controlled levels of carbon, pH and oxygen. *Marine*. 104:497–501.
- Fujita, R.M. 1985. The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 92:283–301.
- Galmés, J., Medrano, H. & Flexas, J. 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.* 175:81–93.
- Gevaert, F., Creach, A., Davout, D., Holl, A.C., Seuront, L. & Lemoine, Y. 2002. Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: Chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant, Cell Environ.* 25:859–72.
- Gómez-Pinchetti, J.L., del Campo-Fernández, E., Moreno-Díez, P. & Gracia-Reina, G. 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 10:383–9.
- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Goutx, M. & Niell, X. 2001. Effects of CO₂ and nitrogen supply on the biochemical composition of *Ulva rigida* with especial emphasis on lipid class analysis. *J. Plant Physiol.* 158:367–73.
- Hafting, J.T., Critchley, A.T., Cornish, M.L., Hubley, S.A. & Archibald, A.F. 2012. On-land cultivation of functional seaweed products for human usage. *J. Appl. Phycol.* 24:385–92.
- Hanelt, D., Huppertz, K. & Nultsch, W. 1993. Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97:31–7.
- Hanisak, M.D. & Harlin, M.M. 1978. Uptake of Inorganic Nitrogen by *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 14:450–4.
- Harley, C.D.G., Anderson, K.M., Demes, K.W., Jorve, J.P., Kordas, R.L., Coyle, T.A. & Graham, M.H. 2012. Effects Of Climate Change On Global Seaweed Communities. *J. Phycol.* 48:1064–78.
- Harris, L.G. & Jones, A.C. 2005. Temperature, herbivory and epibiont acquisition as factors controlling the distribution and ecological role of an invasive seaweed. *Biol. Invasions*.

7:913–24.

- Henley, W.J., Lindley, S.T., Levavasseur, G., Osmond, C. & Ramus, J. 1992. Photosynthetic response of *Ulva rotundata* to light and temperature during emersion on an intertidal sand flat. *Oecologia*. 89:516–23.
- Hernández-Garibay, E., Zertuche-González, J.A. & Pacheco-Ruíz, I. 2011. Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *J. Appl. Phycol.* 23:537–42.
- Horwitz, J.E. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC International. 15a ed. Arlington. 1018 pp.
- Huppertz, K., Hanelt, D. & Nultsch, W. 2007. Photoinhibition of photosynthesis in the marine brown algae *Fucus serratus* as studied in field experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 66:175–82.
- Hurd, C.L., Harrison, P.J., Bischof, K. & Lobban, C.S. 2014. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Invers, O., Romero, J. & Pérez, M. 1997. Effects of pH on seagrass photosynthesis: A laboratory and field assessment. *Aquat. Bot.* 59:185–94.
- Israel, A. 1995. Determinación de la producción primaria en macroalgas marinas. *En Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción. Chile*, pp. 795–823.
- Ivanova, V., Stancheva, M. & Petrova, D. 2013. Fatty acid composition of Black Sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*. *Bulg. J. Agric. Sci.* 19:42–7.
- Jiang, H., Zou, D., Lou, W. & Ye, C. 2017. Effects of stocking density and decreased carbon supply on the growth and photosynthesis in the farmed seaweed, *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 29:3057–65.
- Jie, X., Xiaohong, Z., Chunlei, G.A.O., Meijie, J., Ruixiang, L.I., Zongling, W., Yan, L.I. *et al.* 2016. Effect of temperature, salinity and irradiance on growth and photosynthesis of *Ulva prolifera*. 35:114–21.
- Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., Bertrand, S., Roussakis, C., Bourgougnon, N.B. & Bedoux, G. 2015. Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from brittany (France): An analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. *Mar. Drugs*. 13:5606–28.
- Kim, J., Kang, E.J., Park, M.G., Lee, B. & Kim, K.Y. 2011. Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea. 421–32.
- Kim, S., Woo, S., Yun, H., Yum, S., Choi, E., Do, J.-R., Jo, J.-H. *et al.* 2005. Total Phenolic Contents and Biological Activities of Korean Seaweed Extracts. *Food Sci. Biotechnol.* 14:798–802.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C. & Zhang, X.H. 2013. Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Glob. Chang. Biol.* 19:103–32.
- Lahaye, M. & Robic, A. 2007. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from

- green seaweeds. *Biomacromolecules*. 8:1765–74.
- Lapointe, B.E. & Ryther, J.H. 1979. The effects of nitrogen and seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* in mass outdoor cultures. *Bot. Mar.* 22:529–37.
- Lapointe, B.E. & Tenore, K.R. 1981. Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. I. Interaction of light and nitrogen on nutrient uptake, growth, and biochemical composition. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 53:135–52.
- Lavery, P.S. & McComb, A.J. 1991. the Nutritional Eco-Physiology of *Chaetomorpha linum* and *Ulva rigida* in Peel Inlet, Western Australia. *Bot. Mar.* 34:251–60.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 591–2.
- Lignell, A. & Pedersen, M. 1989. Effects of pH and inorganic carbon concentration on growth of *Gracilaria secundata*. *Br. Phycol. J.* 24:83–9.
- Liu, C. & Zou, D. 2015. Responses of elevated CO₂ on photosynthesis and nitrogen metabolism in *Ulva lactuca* (Chlorophyta) at different temperature levels. *Mar. Biol. Res.* 11:1043–52.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, United States of America. 366 pp.
- Longstaff, B.J., Kildea, T., Runcie, J.W., Cheshire, A., Dennison, W.C., Hurd, C., Kana, T. *et al.* 2002. An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynth. Res.* 74:281–93.
- Luo, M.B., Liu, F. & Xu, Z.L. 2012. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquat. Bot.* 100:18–24.
- Luzi, G., McHardy, C., Lindenberger, C., Rauh, C. & Delgado, A. 2019. Comparison between different strategies for the realization of flashing-light effects – Pneumatic mixing and flashing illumination. *Algal Res.* 38:101404.
- Maehre, H.K., Malde, M.K., Eilertsen, K.-E. & Elvevoll, E.O. 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *J. Sci. Food Agric.* 94:3281–90.
- Makino, A. 2011. Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat. *Plant Physiol.* 155:125–9.
- Malta, E. jan & de Nys, R. 2016. The effect of short-term preharvest strategies on the carbon constituents of *Ulva ohnoi* M. Hiraoka et S. Shimada. *J. Appl. Phycol.* 28:555–65.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. & Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105:1141–57.
- Mata, L., Magnusson, M., Paul, N.A. & de Nys, R. 2016. The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. *J. Appl. Phycol.* 28:365–75.

- Mendoza, W., Mendola, D., Kim, J., Yarish, C., Velloze, A. & Greg Mitchell, B. 2018. Land-based drip-irrigated culture of *Ulva compressa*: The effect of culture platform design and nutrient concentration on biomass production and protein content. *PLoS One*. 13:1–20.
- Menéndez, M. 2005. Effect of nutrient pulses on photosynthesis of *Chaetomorpha linum* from a shallow Mediterranean coastal lagoon. *Aquat. Bot.* 82:181–92.
- Menéndez, M., Martínez, M. & Comín, F.A. 2001. A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 256:123–36.
- Mhatre, A., Navale, M., Trivedi, N., Pandit, R. & Lali, A.M. 2018. Bioresource Technology Pilot scale fl at panel photobioreactor system for mass production of *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Bioresour. Technol.* 249:582–91.
- Mohy El-Din, S.M. 2018. Temporal variation in chemical composition of *Ulva lactuca* and *Corallina mediterranea*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*
- Msuya, F.E. & Neori, A. 2008. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *J. Appl. Phycol.* 20:1021–31.
- Murchie, E.H., Pinto, M. & Horton, P. 2009. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytol.* 181:532–52.
- Neori, A., Cohen, I. & Gordin, H. 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents . II . Growth Rate , Yield and C : N Ratio. *Bot. Mar.* 34:483–9.
- Nishihara, G.N., Terada, R. & Noro, T. 2005. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). *J. Appl. Phycol.* 17:371–7.
- Niyogi, K.K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:455–60.
- Olivé, I., Silva, J., Costa, M.M. & Santos, R. 2016. Estimating Seagrass Community Metabolism Using Benthic Chambers: The Effect of Incubation Time. *Estuaries and Coasts*. 39:138–44.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E. *et al.* 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem.* 99:98–104.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. & Tran, L.-S.P. 2014. Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5:1–8.
- Osmond, C.B., Ramus, J., Levavasseur, G., Franklin, L.A. & Henley, W.J. 1993. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* blid. *Planta*. 190:97–106.
- Pacheco-Ruiz, I., Becerril-Bobadilla, F., Zertuche-González, J.A., Chee Barragán, A., Gálvez-Telles, A. & Blanco-Betancourt, R. 2003. Effects of El Niño on beds of *Ulva lactuca* along the northwest coast of the Gulf of California, Mexico. *Geofis. Int.* 42.
- Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O. & Wanlapa, S. 2015. Characteristics and

- antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *Int. J. Biol. Macromol.* 81:912–9.
- Pedersen, M.F. & Borum, J. 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and importance of nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142:261–72.
- Pessaraki, M. 2001. Hand Book of Plant and Crop Physiology. Marcel Dek. Marcel Dekker, Inc. 965 pp.
- Phillips, J.C. & Hurd, C.L. 2004. Kinetics of nitrate, ammonium, and urea uptake by four intertidal seaweeds from New Zealand. *J. Phycol.* 40:534–45.
- Rautenberger, R., Fernandez, P.A., Strittmatter, M., Heesch, S., Cornwall, C.E., Hurd, C.L. & Roleda, M.Y. 2015. Saturating light and not increased carbon dioxide under ocean acidification drives photosynthesis and growth in *Ulva rigida* (Chlorophyta). 874–88.
- Riechert, R. & Dawes, C.J. 1986. Acclimation of the Green Alga *Caulerpa racemosa* var. *uvifera* to Light. *Bot. Mar.* 29:533–7.
- Robic, A., Rondeau-Mouro, C., Sassi, J.F., Lerat, Y. & Lahaye, M. 2009. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). *Carbohydr. Polym.* 77:206–16.
- Rohani-Ghadikolaei, K., Abdulalian, E. & Ng, W.K. 2012. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *J. Food Sci. Technol.* 49:774–80.
- Römheld, V. & Kirkby, E.A. 2010. Research on potassium in agriculture: Needs and prospects. *Plant Soil.* 335:155–80.
- Runcie, J.W., Ritchie, R.J. & Larkum, A.W.D. 2003. Uptake kinetics and assimilation of inorganic nitrogen by *Catenella nipae* and *Ulva lactuca*. *Aquat. Bot.* 76:155–74.
- Sandoval-Gil, J.M., Alexandre, A., Santos, R. & Camacho-Ibar, V.F. 2016. Nitrogen Uptake and Internal Recycling in *Zostera marina* Exposed to Oyster Farming: Eelgrass Potential as a Natural Biofilter. *Estuaries and Coasts.* 39:1694–708.
- Sandoval-Gil, J.M., Barrote, I., Silva, J., Olivé, I., Costa, M.M., Ruiz, J.M., Marín-Guirao, L. *et al.* 2015a. Plant-water relations of intertidal and subtidal seagrasses. *Mar. Ecol.* 36:1294–310.
- Sandoval-Gil, J.M., Camacho-Ibar, V.F., del Carmen Ávila-López, M., Hernández-López, J., Zertuche-González, J.A. & Cabello-Pasini, A. 2015b. Dissolved inorganic nitrogen uptake kinetics and $\delta^{15}\text{N}$ of *Zostera marina* L. (eelgrass) in a coastal lagoon with oyster aquaculture and upwelling influence. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 472:1–13.
- Sandoval-Gil, J.M., del Carmen Ávila-López, M., Camacho-Ibar, V.F., Hernández-Ayón, J.M., Zertuche-González, J.A. & Cabello-Pasini, A. 2019. Regulation of Nitrate Uptake by the Seagrass *Zostera marina* During Upwelling. *Estuaries and Coasts.* 42:731–42.
- Santos, S.A.O., Vilela, C., Freire, C.S.R., Abreu, M.H., Rocha, S.M. & Silvestre, A.J.D. 2015. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals.

Food Chem. 183:122–8.

- Schaffelke, B. & Klumpp, D.W. 1998. Short-term nutrient pulses enhance growth and photosynthesis of the coral reef macroalga *Sargassum baccularia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:95–105.
- Schreiber, U. 1994. New Emitter-Detector-Cuvette Assembly for Measuring Modulated Chlorophyll Fluorescence of Highly Diluted Suspensions in Conjunction with the Standard PAM Fluorometer. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 49:646–56.
- Schreiber, U. & Neubauer, C. 1990. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25:279–93.
- Solorzáno, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 799–801.
- Vandermeulen, H. 1989. A low-maintenance tank for the mass culture of seaweed. *Aquac. Eng.* 8:67–71.
- Vásquez-Elizondo, R.M., Legaria-Moreno, L., Pérez-Castro, M.Á., Krämer, W.E., Scheufen, T., Iglesias-Prieto, R. & Enríquez, S. 2017. Absorptance determinations on multicellular tissues. *Photosynth. Res.* 132:311–24.
- Vázquez-Rodríguez, J.A. & Amaya-Guerra, C.A. 2016. Ulva Genus as Alternative Crop: Nutritional and Functional Properties. *En Alternative Crops and Cropping Systems*. InTech, p. 64.
- Vergara, J. j, Sebastián, M., Pérez-Lloréns, J.L. & Hernández, I. 1998. Photoacclimation of *Ulva rigida* and *U. rotundata* (Chlorophyta) arranged in canopies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 165:283–92.
- Xu, J. & Gao, K. 2008. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. *J. Appl. Phycol.* 20:681–6.
- XU, Z., WU, H., Zhan, D., SUN, F., SUN, J. & WANG, G. 2014. Combined effects of light intensity and NH₄⁺-enrichment on growth , pigmentation , and photosynthetic performance of *Ulva prolifera* (Chlorophyta)*. 32:1016–23.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C. & Attia, H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem.* 128:895–901.
- Zertuche-González, J.A. 1987. Tank Culture Of The Red Seaweed *Eucheuma uncinatum* From The Gulf Of California. *Ciencias Mar.* 13:1–18.
- Zertuche-González, J.A., Camacho-Ibar, V.F., Pacheco-Ruíz, I., Cabello-Pasini, A., Galindo-Bect, L.A., Guzmán-Calderón, J.M., Macias-Carranza, V. *et al.* 2009. The role of *Ulva* spp. as a temporary nutrient sink in a coastal lagoon with oyster cultivation and upwelling influence. *J. Appl. Phycol.* 21:729–36.
- Zou, D. 2014. The effects of severe carbon limitation on the green seaweed , *Ulva conglobata* (

Chlorophyta). 2417–24.

Zubia, M., Payri, C. & Deslandes, E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.* 20:1033–43.

ANEXOS

Anexo 1. ANOVAS ANIDADOS DE UNA VÍA

Descriptor	Fuente	F	P	S1	S2	S3	S4
Fotosíntesis Neta	Intercepto	76.30	0.001				
	Semana	2.76	0.176				
	Semana (día)	9.56	>0.001				
Fotosíntesis Bruta	Intercepto	104.14	0.001				
	Semana	2.64	0.186				
	Semana (día)	10.49	>0.001				
Respiración	Intercepto	147.43	>0.001				
	Semana	1.90	0.270				
	Semana (día)	10.66	>0.001				
Clorofila a	Intercepto	461.44	>0.001	a	b	c	c
	Semana	11.07	0.026				
	Semana (día)	6.17	0.003				
Clorofila b	Intercepto	468.4	>0.001	a	b	c	c
	Semana	13.98	0.014				
	Semana (día)	4.728	0.010				
Carotenoides	Intercepto	773.15	>0.001	a	b	c	d
	Semana	22.52	0.006				
	Semana (día)	2.81	0.061				
Razón Cl b/Cl a	Intercepto	24299.11	>0.001				
	Semana	2.46	0.202				
	Semana (día)	3.98	0.020				
Fv/Fm	Intercepto	7425.80	>0.001				
	Semana	0.844	0.537				
	Semana (día)	26.94	0.000				
ETR	Intercepto	537.34	>0.001	a	b	c	c
	Semana	13.304	0.015				
	Semana (día)	3.33	0.037				
NPQ	Intercepto	3391.20	>0.001	*			
	Semana	7.41	0.041				
	Semana (día)	1.022	0.426				
Φ_{PSII}	Intercepto	11134.23	>0.001	a	b	c	d
	Semana	32.82	0.003				
	Semana (día)	1.62	0.219				
Carbohidratos	Intercepto	888.88	>0.001				
	Semana	6.41	0.052				
	Semana (día)	7.90	0.001				
Nitrógeno	Intercepto	1912.47	>0.001				
	Semana	6.15	0.077				
	Semana (día)	0.652	0.003				

Cenizas	Intercepto	1861.91	>0.001	a	b	c	d
	Semana	25.18	0.005				
	Semana (día)	7.61	0.001				
Lípidos	Intercepto	11276.23	>0.001	a	b	ab	ab
	Semana	18.38	0.008				
	Semana (día)	0.384	0.817				

Anexo 2. REGRESIONES LINEALES

Descriptor	R ²	P
Fotosíntesis bruta	0.74	<0.001
Fotosíntesis neta	0.73	<0.001
Nitrógeno	0.81	<0.0001
Razón Cl a/Cl b	0.60	0.002
F _v /F _m	0.05	0.798
Carbohidratos	0.82	<0.001