



Manual de técnicas de cultivo de algas en condiciones de hipersalinidad

Esta publicación se produce enmarcada dentro del Proyecto ALGASAL+ desarrollado con la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar dentro de la convocatoria 2023, y se cofinancia por la Unión Europea por el FEMPA (Fondo Europeo Marítimo, de Pesca y de Acuicultura).



Contenido

1. Fundamentos del cultivo de algas en condiciones de hipersalinidad y biología de las cepas seleccionadas	3
1.1 Introducción al género <i>Ulva</i> sp.	3
1.2 Introducción a la especie <i>Dunaliella salina</i>	3
1.3 Parámetros fisicoquímicos óptimos bajo estrés salino	4
2. Protocolos de cultivo a escala laboratorio	5
2.1 Selección y limpieza de material biológico	5
2.2 Preparación de medios de cultivo	5
2.3 Inóculo	5
2.4 Mantenimiento	6
2.5 Adaptación a condiciones de hipersalinidad	6
2.6 Escalado	7
3. Diseño del sistema de cultivo en invernadero	8
3.1 Diseño de infraestructuras (Tanques y Raceways)	8
3.2 Gestión del agua y salinidad	9
3.3 Control ambiental (Temperatura y sombreado)	9
4. Operación, cosecha y calidad	9
4.1 Monitorización de parámetros físico-químicos	10
4.2 Gestión de epífitos y competidores	10
4.3 Métodos de cosecha y post-cosecha	10
4.4 Secado y conservación de biomasa	11
5. Análisis del rendimiento	11
5.1 Cálculo de productividad	11
5.2 Eficiencia de absorción de nutrientes (Biorremediación)	12
5.3 Análisis de costes de producción	12
6. Referencias bibliográficas	12

1. Fundamentos del cultivo de algas en condiciones de hipersalinidad y biología de las cepas seleccionadas

El cultivo de organismos fotosintéticos en ambientes hipersalinos representa uno de los nichos más exigentes y, a la vez, prometedores de la biotecnología moderna. Desde un punto de vista termodinámico, el aumento de la concentración de sales en el medio externo genera un gradiente de potencial hídrico que tiende a extraer el agua del interior celular, amenazando la turgencia y la estabilidad de las macromoléculas (Kirst, 1990). Para contrarrestar este fenómeno, las cepas seleccionadas han desarrollado mecanismos evolutivos de osmorregulación que les permiten no solo sobrevivir, sino optimizar su metabolismo bajo condiciones que serían letales para la mayoría de los organismos terrestres y marinos convencionales (Parida y Das, 2005).

La respuesta biológica ante el estrés salino se articula principalmente a través de la síntesis de solutos compatibles, moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se acumulan en el citosol para equilibrar la presión osmótica sin interferir con las funciones enzimáticas (Yancey, 2005). En el caso de las microalgas como *Dunaliella*, este proceso está íntimamente ligado a la vía del glicerol (Ben-Amotz *et al.*, 2009), mientras que en macroalgas como *Ulva*, se observa una regulación compleja de iones intracelulares y la acumulación de prolina o dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Lahaye y Robic, 2007). Estos fundamentos fisiológicos son la base del diseño de los sistemas de cultivo, ya que permiten utilizar la salinidad como un modulador metabólico para inducir la producción de metabolitos secundarios de alto valor comercial, como antioxidantes y pigmentos fotoprotectores.

1.1 Introducción al género *Ulva* sp.

Las especies del género *Ulva*, comúnmente conocidas como "lechugas de mar", son macroalgas verdes clorofíceas con una plasticidad fisiológica extraordinaria. Se caracterizan por su morfología de lámina delgada (distromática) o tubular, lo que les permite una alta tasa de absorción de nutrientes y un crecimiento rápido (Wichard *et al.*, 2015).

En contextos de salinidad elevada, destacan las siguientes especies por su resistencia y valor comercial:

- ***Ulva lactuca*:** Es la especie tipo, ampliamente distribuida y valorada por su contenido nutricional. Aunque es eurihalina, su crecimiento óptimo se sitúa en rangos marinos, activando potentes respuestas antioxidantes cuando la salinidad se eleva (Luo *et al.*, 2012).
- ***Ulva compressa*:** Se distingue por su tolerancia superior a la desecación y a las variaciones osmóticas extremas, siendo frecuente en zonas intermareales donde la evaporación concentra las sales (Msuya y Neori, 2008).
- ***Ulva australis*:** Una especie robusta capaz de mantener la estabilidad de su pared celular y su tasa fotosintética incluso en condiciones de fluctuación salina severa (Zou y Gao, 2010).

1.2 Introducción a la especie *Dunaliella salina*

Dunaliella salina es el microorganismo eucariota halófilo por excelencia. A diferencia de las especies de *Ulva*, esta microalga carece de una pared celular rígida, lo que le

permite responder de forma casi instantánea a los cambios osmóticos mediante variaciones en su volumen celular (Oren, 2005). Su importancia biotecnológica radica en su capacidad de acumular grandes cantidades de β -caroteno (hasta el 10% de su peso seco) como mecanismo de protección contra la foto-oxidación cuando se cultiva en medios con concentraciones de NaCl superiores a los $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Borowitzka, 1995).

1.3 Parámetros fisicoquímicos óptimos bajo estrés salino

Para que el cultivo en condiciones de hipersalinidad sea exitoso, la gestión de la salinidad debe ir acompañada de un control riguroso de otros parámetros que interactúan sinérgicamente con el estrés osmótico (Richmond y Hu, 2013).

A. Temperatura

En condiciones de hipersalinidad, la solubilidad del oxígeno disminuye drásticamente. Por ello, es crítico mantener temperaturas controladas.

- **Género *Ulva*:** Su rango óptimo es más bajo, entre 15°C y 22°C . Se ha observado que *Ulva compressa* tolera mejor los picos térmicos en charcas intermareales que *U. lactuca* (Luo et al., 2012).
- ***Dunaliella salina*:** Prefiere rangos de 25°C a 35°C . Temperaturas superiores a los 40°C , combinadas con alta salinidad, pueden provocar el colapso de la membrana celular (García et al., 2007).

B. Irradiación lumínica

La luz es el motor de la producción de pigmentos protectores.

- En *D. salina*, una alta intensidad lumínica ($> 1.000 \mu\text{mol} \cdot \text{fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) es necesaria para activar la síntesis masiva de β -caroteno cuando la salinidad supera los $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Ben-Amotz et al., 2009).
- En *Ulva* sp., una iluminación excesiva bajo alta salinidad puede causar fotoinhibición, por lo que se recomiendan regímenes moderados si el objetivo es el crecimiento de biomasa y no la inducción de estrés oxidativo (Zuo y Gao, 2010).

C. pH y disponibilidad de carbono

El pH tiende a fluctuar rápidamente en medios hipersalinos debido a la intensa actividad fotosintética y la reducida capacidad tampón del agua muy salinizada. Se recomienda mantener el pH entre 7,5 y 8,5, siendo fundamental la inyección de CO_2 o el uso de bicarbonato, ya que la disponibilidad de carbono inorgánico es el principal factor limitante cuando la densidad celular aumenta en medios saturados de sal (Richmond y Hu, 2013).

2. Protocolos de cultivo a escala laboratorio

2.1 Selección y limpieza de material biológico

El tratamiento inicial del material varía según la naturaleza del organismo. Para las macroalgas, el protocolo exige una limpieza manual meticulosa con pinzas para retirar epífitos, seguida de un shock osmótico breve con agua destilada para eliminar sedimentos y microalgas adheridas sin comprometer la integridad celular de la especie objetivo. Posteriormente se seca superficialmente con papel absorbente antes del pesaje, garantizando que la densidad de inóculo sea real y libre de agua intersticial sobrante.

Para las microalgas, el proceso se centra en la estabilización de clones mediante técnicas de aislamiento en laboratorio. El objetivo es obtener cultivos monoclonales puros, lo cual es un proceso más dilatado en el tiempo (pudiendo requerir de 4 a 7 meses) hasta asegurar que la densidad celular sea estable y libre de contaminantes antes de iniciar cualquier fase de experimentación o escalado.

2.2 Preparación de medios de cultivo

La formulación nutricional se ajusta a los requerimientos específicos de cada grupo, utilizando siempre el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975) como base. Para las macroalgas, se optimiza la asimilación de nitrógeno sustituyendo el nitrato por amonio (NH_4^+) en una concentración controlada de $100 \mu\text{M}$, manteniendo siempre una relación estequiométrica de 10:1 respecto al fosfato. Este ajuste es fundamental para preparar la biomasa para las condiciones nutricionales que encontrará en fases avanzadas. Es vital mantener el $\text{pH} < 8,5$ para evitar la formación de amoniaco gaseoso, el cual resulta tóxico para los tejidos.

En ambos casos, la salinidad del agua de mar utilizada como solvente debe ser ajustada mediante adición de NaCl o dilución para que su salinidad sea idéntica a la del entorno de origen de la cepa, evitando así un estrés innecesario durante la inoculación inicial.

2.3 Inóculo

La densidad del inóculo es un parámetro determinante para evitar el colapso inicial del cultivo. Para las macroalgas, en las fases de activación en laboratorio, se establece una densidad estándar de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasa fresca. Este equilibrio permite que el alga reciba una irradiancia homogénea y que el intercambio gaseoso sea eficiente en volúmenes pequeños de cultivo. El inóculo debe proceder de cultivos en fase exponencial de crecimiento, garantizando que el material biológico tenga una maquinaria fotosintética activa y lista para la expansión en los sistemas de laboratorio.

En el caso de las microalgas, la metodología de inoculación se basa en el volumen relativo, introduciendo generalmente un 10% de stock de microalgas respecto al

volumen total del medio de cultivo. Esta proporción asegura que la población celular inicial sea suficiente para superar la fase de latencia y entrar rápidamente en fase exponencial de crecimiento.

2.4 Mantenimiento

El mantenimiento rutinario se desarrolla bajo condiciones ambientales estrictamente controladas en cámaras de activación, con temperaturas de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. En el caso de las macroalgas, el sistema de aireación debe proporcionar un burbujeo constante para mantener la biomasa en suspensión, evitando así la obturación del sistema por los talos, lo que podría causar zonas muertas sin intercambio gaseoso y la consiguiente degradación de la biomasa, complementado con pulsos programados de CO_2 para la regulación del pH. Semanalmente, se realiza una renovación total del medio de cultivo y una sustitución de los recipientes para evitar la acumulación de metabolitos secundarios y el crecimiento de biofilms en las paredes de los matraces, asegurando así la sostenibilidad del cultivo a largo plazo.

Para las microalgas, el mantenimiento en laboratorio puede realizarse en sistemas de "batch" (sin renovación) o en continuo, dependiendo de la tasa de crecimiento. En el cultivo de microalgas es vital controlar la mezcla mediante inyección de aire con mezcla de 1% de CO_2 (filtrado a través de filtros de $0,02 \mu\text{m}$ de poro para garantizar la esterilidad) a fin de evitar la sedimentación celular, mientras que en las macroalgas el movimiento debe ser suficiente para mantener la biomasa en suspensión y evitar el autosombreado.

2.5 Adaptación a condiciones de hipersalinidad

Antes de iniciar cualquier proceso de escalado, es necesario asegurar que el organismo ha alcanzado un estado de homeostasis interna frente a la presión osmótica del medio. La adaptación no debe entenderse simplemente como la supervivencia del alga, sino como la recuperación de sus tasas de crecimiento y eficiencia fotosintética bajo condiciones de hipersalinidad. Este proceso es previo al escalado masivo, ya que intentar incrementar el volumen de un cultivo que aún se encuentra bajo estrés osmótico agudo suele derivar en la degradación irreversible de la biomasa o en fases de latencia excesivamente prolongadas.

Para las macroalgas, el protocolo de adaptación se basa en una transición gradual. Partiendo de la salinidad de origen, se incrementa la concentración salina en intervalos de 10 ups. Durante cada etapa, se monitoriza la integridad de los talos y la estabilidad del pH; cuando la biomasa muestra un crecimiento positivo, una coloración verde intensa en el nivel actual y la ausencia de formación de esporas, se procede al siguiente incremento. Este método de adaptación permite a las células de *Ulva* sintetizar osmoprotectores de manera progresiva, reduciendo el gasto energético de mantenimiento y preparando al organismo para un escalado posterior exitoso en condiciones de hasta 60 - 80 ups.

En el caso de las microalgas, la estrategia puede variar según la robustez de la cepa. Aquellas con alta halotolerancia natural, como *Dunaliella*, permiten protocolos de

adaptación más rápidos, aunque sigue siendo recomendable realizar el proceso en volúmenes pequeños (matraces de 50 ml a 250 ml) donde el control ambiental es total. La adaptación se confirma mediante el seguimiento de la densidad óptica: cuando la curva de crecimiento recupera su pendiente exponencial tras el choque osmótico inicial, se considera que la cepa está adaptada. Una vez establecida esta estabilidad fisiológica en la salinidad objetivo, el cultivo se considera apto para iniciar el proceso de escalado volumétrico.

2.6 Escalado

El escalado es la fase de aumento volumétrico controlado que permite pasar de los cultivos iniciales a volúmenes operativos de hasta 10 L. A diferencia de otras etapas, el factor determinante no es llenar el recipiente a su máxima capacidad, sino ajustar el volumen del medio de cultivo a la densidad inicial del inóculo disponible en cada momento. De este modo, se garantiza que la biomasa mantenga su actividad metabólica y fotosintética óptima durante toda la transición. En los casos donde se requiere trabajar en condiciones de hipersalinidad, la adaptación debe realizarse de forma previa al escalado masivo; una vez que la cepa ha estabilizado su crecimiento en la salinidad objetivo, se procede a incrementar el volumen del sistema.

Escalado de macroalgas del género *Ulva*

En este caso, el proceso se inicia en matraces de 250 ml. El criterio de transferencia se basa en el vigor de la biomasa y la duplicación de su peso fresco inicial. Antes de pasar a recipientes de mayor envergadura, el alga debe estar plenamente aclimatada a la salinidad y a la fuente de nitrógeno (NH_4^+). El escalado no es un salto directo, sino que utiliza matraces de volúmenes intermedios, de entre 1 y 5 L, según la progresión de la biomasa.

Es fundamental destacar que, al utilizar recipientes más grandes, no es estrictamente necesario iniciar el cultivo con el volumen final de medio de cultivo. El volumen de líquido se incrementa de forma proporcional a la biomasa disponible para respetar siempre la densidad de inóculo recomendada ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Este manejo permite que el burbujeo mantenga los talos en suspensión constante y asegura una disponibilidad de nutrientes equilibrada, evitando que una dilución excesiva de la biomasa ralentice el crecimiento o facilite la degradación del tejido.

Escalado de microalgas como *Dunaliella salina*

El escalado de las microalgas comienza en matraces de 50 ml y se monitoriza sistemáticamente mediante la medición de la densidad óptica. Este parámetro permite identificar con precisión el momento en que el cultivo entra en fase exponencial, garantizando que el inóculo transferido sea joven y vigoroso. Al igual que en las macroalgas, se emplean pasos intermedios en matraces de 250 ml - 500 ml o de 1 - 2 L, asegurando que la densidad celular no caiga por debajo de los límites críticos de supervivencia.

A medida que se traslada el cultivo a recipientes de mayor volumen, es importante que el volumen de medio de cultivo se ajuste para mantener siempre una proporción de inóculo aproximada del 10%. En especies como *Dunaliella*, el seguimiento por densidad óptica facilita la gestión de estos incrementos volumétricos, permitiendo

decidir el momento exacto del trasvase. Una vez que la microalga se ha adaptado a la salinidad de trabajo en los volúmenes pequeños y medianos, el escalado hacia la capacidad máxima se realiza de forma más estable, permitiendo incluso establecer regímenes de cosechado diario del 20% del volumen una vez alcanzada la fase exponencial en la garrafa final.

Control del pH durante el proceso de escalado

Durante todo el proceso de escalado, el control del pH mediante la inyección de CO₂ y el mantenimiento de una agitación eficiente son las herramientas clave para evitar la sedimentación en microalgas y la formación de zonas muertas en macroalgas. El éxito de la transición entre volúmenes intermedios depende de que las condiciones de iluminación y temperatura se mantengan constantes, permitiendo que el organismo enfoque sus recursos energéticos exclusivamente en la división celular o el aumento de biomasa foliar en lugar de responder a estreses ambientales evitables.

3. Diseño del sistema de cultivo en invernadero

El paso de las condiciones controladas de laboratorio al entorno de invernadero implica una transición hacia sistemas de mayor volumen donde las variables ambientales presentan una mayor fluctuación. El diseño debe garantizar que el hidrodinamismo y diseño de los reactores optimicen la exposición lumínica y el intercambio gaseoso.

3.1 Diseño de infraestructuras (Tanques y Raceways)

El diseño de los reactores depende estrictamente de la morfología del alga:

Para macroalgas (Sistemas de tanques)

Para especies foliares como *Ulva* sp., el diseño debe priorizar el movimiento tridimensional. Se recomienda el uso de tanques circulares o de sección ovalada (tipo “D-ended”) de entre 500 y 1.000 L.

Es imprescindible instalar una red de difusores en el fondo del tanque conectada a soplantes de aire. La clave del éxito es generar un vuelvo constante de la biomasa. Este movimiento asegura que el alga no se apile en el fondo (Evitando zonas de anoxia) y que todas las láminas reciban pulso de luz intermitentes, optimizando la fotosíntesis y evitando una excesiva exposición solar directa.

Para microalgas (Sistemas raceway)

Para el cultivo masivo de *Dunaliella salina*, el sistema más eficiente es el reactor de tipo raceway. El protocolo de escalado parte de raceways de 250 L hasta alcanzar sistemas de cultivo de 20.000 L de capacidad.

Se deben utilizar norias de palas (paddle wheels) que mantengan una velocidad de flujo constante (0,2–0,3 m/s), pues se ha comprobado que, al carecer de pared celular rígida, *Dunaliella* responde mejor a este flujo laminar que a la aireación turbulenta, la cual podría comprometer la integridad de la célula. La profundidad operativa recomendada para maximizar la entrada de luz es de 20 cm.

3.2 Gestión del agua y salinidad

Se propone una integración directa con el efluente de las plantas desaladoras, por lo que para replicar este modelo, se deben seguir las siguientes pautas de gestión hídrica:

Régimen de suministro

El sistema debe diseñarse para operar preferiblemente en circuito abierto, aprovechando el flujo continuo de salmuera de la planta (estabilizado en el entre 60 y 80 psu). Esto garantiza un aporte constante de nutrientes y ayuda a mantener la homeostasis del sistema.

Control de la evaporación

En ambientes de invernadero, la evaporación es el principal riesgo operativo, ya que puede elevar la salinidad a niveles letales. El operario debe realizar mediciones diarias mediante refractometría. Si la concentración supera los límites validados (ej. >85 psu en *Ulva*), la recomendación técnica es aumentar la tasa de renovación del efluente o reponer el volumen con agua de proceso para diluir el exceso de sales.

3.3 Control ambiental (Temperatura y sombreado)

Para mantener la productividad en zonas de alta radiación, se han validado las siguientes medidas de control pasivo:

Uso de sombreado técnico

Es fundamental disponer de mallas de sombreado (cobertura del 50%), pues se ha observado que el sombreado estacional es la herramienta más eficaz para evitar la esporulación masiva en las macroalgas (un proceso de reproducción por estrés que agota la biomasa) y para prevenir el sobrecalentamiento de los raceways de microalgas.

Regulación térmica por caudal

En lugar de sistemas de refrigeración costosos, se propone gestionar la temperatura mediante la tasa de renovación del agua. Mantener un flujo de salmuera fresca proveniente de la planta permite disipar el calor acumulado por la radiación. Además, se recomienda monitorizar especialmente los picos térmicos de la tarde, incrementando la aireación en los tanques de macroalgas para favorecer la refrigeración por evaporación superficial.

4. Operación, cosecha y calidad

Una vez establecida la infraestructura de cultivo, la fase operativa requiere una monitorización sistemática para asegurar que el sistema se mantiene en fase de crecimiento exponencial. La metodología propuesta se basa en un régimen de cosecha por desdoblamiento que permite la regeneración continua de la biomasa.

4.1 Monitorización de parámetros físico-químicos

La gestión diaria de un sistema de cultivo en salmuera exige el control riguroso de las variables que condicionan la fotosíntesis y la estabilidad osmótica:

Medición de la salinidad

Se debe realizar de forma diaria mediante refractometría de precisión. Al operar con efluentes industriales, es crítico asegurar que la salinidad se mantiene en los rangos validados (60-80 psu para *Ulva* y >150 psu para *Dunaliella*), procediendo a la renovación del medio si la evaporación eleva estos niveles por encima del umbral de seguridad.

Control del pH y temperatura

El registro se efectúa preferiblemente en las horas de máxima insolación. Un incremento del pH por encima de 8,5 indica una limitación de carbono inorgánico o un riesgo de toxicidad por amoníaco gas, lo que requiere el ajuste de la inyección de CO₂.

Seguimiento del crecimiento

En macroalgas: Se determina mediante el registro semanal del peso fresco (PF), previa eliminación del agua intersticial mediante centrifugado suave o secado por contacto.

En microalgas: Se utiliza la densidad óptica (DO) y el recuento celular mediante cámara de Neubauer para establecer las curvas de crecimiento y el momento óptimo de la cosecha.

4.2 Gestión de epífitos y competidores

El control de la contaminación biológica es uno de los mayores retos en sistemas outdoor. Las estrategias validadas en el manual incluyen:

En macroalgas: La principal medida preventiva es el mantenimiento de una alta densidad de inóculo y una agitación vigorosa. El movimiento constante de la biomasa impide el anclaje de epífitos. Ante una infestación incipiente, el protocolo sugiere realizar un shock osmótico inverso (inmersión breve en agua de baja salinidad) para eliminar organismos competidores menos tolerantes que las cepas seleccionadas.

En microalgas: La ventaja operativa de *Dunaliella salina* reside en su halotolerancia extrema. Mantener el cultivo en salinidades superiores a 150 g · L⁻¹ actúa como un filtro biológico natural, impidiendo el desarrollo de depredadores y otros microorganismos competidores que no sobreviven en medios hipersalinos.

4.3 Métodos de cosecha y post-cosecha

La cosecha se ejecuta siguiendo un modelo de explotación sostenible que garantiza la continuidad del cultivo:

Protocolo de cosecha diaria

Se recomienda una cosecha parcial del 20% del volumen o peso del reactor. Este método mantiene la biomasa en una densidad óptima, evitando el sombreado propio (auto-sombreado) y permitiendo que el sistema recupere su biomasa de forma cíclica.

Técnicas de concentración

Macroalgas: Se recolectan mediante filtración mecánica simple y se someten a un proceso de lavado con agua dulce para eliminar el exceso de sales superficiales.

Microalgas: El volumen cosechado se procesa mediante ultrafiltración para preconcentrar el cultivo hasta los $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Si se requiere un producto de mayor densidad para la industria, se procede a una centrifugación final para alcanzar concentraciones de hasta $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.4 Secado y conservación de biomasa

Para preservar los compuestos bioactivos de interés, el post-procesado debe ser inmediato:

Secado

Se recomienda el uso de secaderos solares controlados o estufas de aire forzado a temperaturas no superiores a $45\text{-}50^\circ\text{C}$ para evitar la desnaturalización térmica. La liofilización se reserva como el método óptimo para biomásas destinadas a aplicaciones nutracéuticas de alta gama.

Conservación

La biomasa seca debe almacenarse al vacío o en envases opacos, protegida de la humedad y la luz, para garantizar la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3) y carotenoides a largo plazo.

5. Análisis del rendimiento

Para validar la viabilidad de un sistema de cultivo asociado a efluentes industriales, se requiere una cuantificación precisa de la biomasa generada y de la tasa de asimilación de nutrientes. Los procedimientos sugeridos permiten establecer indicadores de desempeño tanto para macroalgas como para microalgas.

5.1 Cálculo de productividad

La medición del crecimiento varía según la naturaleza del organismo, pero en ambos casos se fundamenta en la diferencia de masa o densidad celular en un intervalo de tiempo determinado:

Tasa de crecimiento específico (SGR) para macroalgas

En el cultivo de *Ulva* sp., el crecimiento se expresa como el porcentaje de incremento de biomasa diario:

$$\text{SGR } (\% \text{ día}^{-1}) = [\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial}) / \text{tiempo (días)}] * 100$$

Es importante que el peso se tome siempre tras un proceso estandarizado de eliminación de agua superficial (centrifugado suave o secado por contacto). En el género *Ulva* se consideran óptimos valores superiores al $10\text{-}15\% \text{ día}^{-1}$. Además, en sistemas de cosecha diaria (desdoblamiento), la biomasa retirada debe ser igual a la biomasa producida para mantener la densidad de inóculo constante.

Productividad volumétrica para microalgas

Para *Dunaliella salina*, la productividad se calcula en término de peso seco por unidad de volumen:

$P_{vol} (g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = (X_{final} - X_{inicial}) / t \text{ (días)}$, donde X representa la concentración de la biomasa en gramos de peso seco por litro, determinada mediante la curva de calibración entre densidad óptica y peso seco.

5.2 Eficiencia de absorción de nutrientes (biorremediación)

El valor ambiental del modelo reside en su capacidad para reducir la carga de nitrógeno y fósforo de la salmuera. Se deben analizar muestras del agua de entrada (salmuera bruta) y del agua de salida (tras el paso por el cultivo):

Eficiencia de asimilación (EAN, %)

$EAN (\%) = (C_{entrada} - C_{salida} / C_{entrada}) \cdot 100$, donde C es la concentración de amonio (NH_4^+) o fosfato (PO_4^{3-}).

Se recomienda realizar las tomas de agua 24 horas después del pulso de nutrientes (en sistemas batch) o de forma integrada (en sistemas de flujo continuo) para obtener una media representativa.

5.3 Análisis de costes de producción

La sostenibilidad del modelo desarrollado se basa en la minimización de insumos externos mediante la integración industrial. Los factores críticos a considerar en el análisis de costes son:

Insumos hídricos y nutricionales

El uso de salmuera como base reduce drásticamente el coste de adquisición de agua y sales. El coste principal se desplaza hacia los nutrientes (sales de amonio y fosfato) necesarios para enriquecer el efluente.

Gasto energético

En macroalgas, el mayor consumo proviene de los soplantes para la aireación. Por otra parte, en microalgas, el coste se centra en el funcionamiento de las palas de agitación en los raceways y en los sistemas de bombeo para el escalado.

Costes operativos

Incluyen la mano de obra para la cosecha diaria, la limpieza de los reactores y el mantenimiento de los sistemas de ultrafiltración y secado.

Valorización del producto

El análisis de los costes debe contraponerse al valor de mercado de la biomasa obtenida (especialmente por su alto contenido proteico del 33% o su riqueza en β -caroteno), lo que permite establecer el punto de equilibrio económico del sistema.

6. Referencias bibliográficas

Ben-Amotz, A., Polle, J. E., y Subba Rao, D. V. (Eds.). (2009). *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. CRC Press.

Borowitzka, M. A. (1995). Blue-green algae, algae and cyanobacteria. En *Biotechnology* (pp. 653-687). VCH Verlagsgesellschaft.

García, F., Freile-Pelegrín, Y., y Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella salina* as a function of culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 19(2), 143-150.

Guillard, R. R. L., y Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239.

Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W. L., & Chanley, M. H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 26-60). Plenum Press, Nueva York.

Kirst, G. O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), 21-53.

Lahaye, M., y Robic, A. (2007). Structure and function of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774.

Luo, M. B., Liu, F., y Xu, Z. L. (2012). Growth and nutrient uptake of *Ulva prolifera*, *Ulva linza* and *Ulva lactuca* under different temperature and light conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 165-168.

Msuya, F. E., y Neori, A. (2008). Effect of water temperature and nitrogen supply on growth and chemical composition of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in integrated aquaculture. *Scientia Marina*, 72(1), 161-169.

Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1(1), 2.

Parida, A. K., y Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.

Richmond, A., y Hu, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Wichard, T., Charrier, B., Mineur, F., Bothwell, J. H., De Clerck, O., y Coates, J. C. (2015). The green seaweed *Ulva*: A model system to study morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 72.

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819-2830.

Zou, D., y Gao, K. (2010). Photosynthetic acclimation to different light levels in the marine macroalga, *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 22(5), 603-610.