



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

# DISTRIBUCIÓ DE LA LLUM EN UN FOTOBIOREACTOR PEL CULTIU DE L'ALGA *ULVA OHNOI*: EFECTE EN EL CREIXEMENT

---

Treball Final de Grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Gerard del Álamo Guaus

Tutora: Ingrid Masaló Llorca

EEABB Gener de 2022

## RESUM

La població mundial no ha parat de créixer en els últims anys, generant una demanda elevada d'aliments, productes provinents de la terra i recursos naturals. Aquests fets han potenciat la recerca de nous recursos que puguin suplir les necessitats nutricionals dels humans, que a la vegada siguin compatibles amb el medi ambient i que tinguin diversos usos en les indústries d'arreu del món, i les algues són les candidates ideals. Les algues són un recurs natural fàcilment manipulable pels humans, el cost de producció de les quals es força reduït, tenen valors nutricionals molt elevats i adequats per a l'alimentació humana, a més d'altres usos en les indústries farmacèutiques, cosmètiques, alimentació d'animals en la ramaderia i en la indústria dels biocombustibles.

Veient els diversos usos de les algues, l'objectiu d'aquest treball ha estat avaluar la taxa de creixement o *specific growth rate* (SGR), de fragments de l'alga *Ulva ohnoi* en dos fotobioreactors (BR1 i BR2), cada un amb una configuració de llums LED diferent, amb la intenció d'estudiar quin efecte ha tingut, tant el contingut en clorofil·la, com la incidència lumínica i les condicions dels cultius, en el creixement dels fragments d'alga.

En el BR1 (llums LED enfocant cap endins) s'ha apreciat intensitats de llum incident superiors a 200  $\mu\text{mol}$ s fotons/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ , en el centre del bioreactor durant la primera setmana de cultiu, en canvi, en el BR2 aquest valor amb prou feines ha arribat als 40  $\mu\text{mol}$ s fotons/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Aquesta diferència en la intensitat lumínica que han rebut ambdós bioreactors ha resultat en un creixement durant la primera setmana, generalment, molt elevat en el BR1, arribant a increments de la biomassa per sobre del 25 %. En canvi, en el BR2 (llums LED enfocant cap enfora), a excepció del cinquè cultiu, la biomassa ha experimentat creixement més lent, però més progressius al llarg del temps.

Aquest elevat creixement durant la primera setmana en el BR1 també ha suposat una menor concentració de clorofil·la i un augment de pH en tots els cultius, reduint considerablement el creixement de la biomassa. Els fragments d'alga en aquest bioreactor han patit fotoinhibició durant la primera setmana fent malbé el seu aparell fotosintètic, que, juntament amb l'augment de pH a causa de la fotosíntesi, no han permès als cultius fixar carboni adequadament.

En aquest treball s'ha pogut apreciar que, amb una configuració lumínica com la del BR2 s'ha aconseguit creixements més lents al llarg del temps, però també cultius molt més sans, amb un major índex de clorofil·la i uns fragments d'alga més consistents que els que es van obtenir amb la configuració lumínica del BR1.

**Paraules clau:** *Ulva ohnoi*, fotobioreactor, SGR (creixement), clorofil·la, pH, Radiació PAR

## RESUMEN

La población mundial no ha parado de crecer en los últimos años, generando una demanda elevada de alimentos, productos provenientes de la tierra y recursos naturales. Estos hechos han potenciado la búsqueda de nuevos recursos que puedan suplir las necesidades nutricionales de los humanos, que a la vez sean compatibles con el medio ambiente y que tengan diversos usos en las industrias de todo el mundo, y las algas son las candidatas ideales. Las algas son un recurso natural fácilmente manipulable por los humanos, cuyo coste de producción es bastante reducido, tienen valores nutricionales muy elevados y adecuados para la alimentación humana, además de otras utilizaciones en las industrias farmacéuticas, cosméticas, alimentación de animales en la ganadería y en la industria de los biocombustibles.

Viendo los diversos usos de las algas, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la tasa de crecimiento o *specific growth rate* (SGR), de fragmentos del alga *Ulva ohnoi* en dos fotobiorreactores (BR1 y BR2), cada uno con una configuración de luces LED diferente, con la intención de estudiar qué efecto ha tenido, tanto el contenido en clorofila, como la incidencia lumínica y las condiciones de los cultivos, en el crecimiento de los fragmentos de alga.

En el BR1 (luces LED enfocando hacia adentro) se ha apreciado intensidades de luz incidente superiores a 200  $\mu\text{moles fotones/m}^2\cdot\text{s}$  en el centro del biorreactor durante la primera semana de cultivo, en cambio, en el BR2 este valor a duras penas ha llegado a los 40  $\mu\text{moles fotones/m}^2\cdot\text{s}$ . Esta diferencia en la intensidad lumínica que han recibido ambos biorreactores ha resultado en un crecimiento durante la primera semana, generalmente, muy elevado en el BR1, llegando a incrementos de la biomasa por encima del 25 %. En cambio, en el BR2 (luces LED enfocando hacia afuera), a excepción del quinto cultivo, la biomasa ha experimentado crecimiento más lento, pero más progresivos a lo largo del tiempo.

Este elevado crecimiento durante la primera semana en el BR1 también ha supuesto una menor concentración de clorofila y un aumento de pH en todos los cultivos, reduciendo considerablemente el crecimiento de la biomasa. Los fragmentos de alga en este biorreactor han sufrido foto-inhibición durante la primera semana dañando su aparato fotosintético, que, junto con el aumento de pH debido a la fotosíntesis, no han permitido a los cultivos fijar carbono adecuadamente.

En este trabajo se ha podido apreciar que, con una configuración lumínica como la del BR2 se ha conseguido crecimientos más lentos a lo largo del tiempo, pero también cultivos mucho más sanos, con un mayor índice de clorofila y unos fragmentos de alga más consistentes que los que se obtuvieron con la configuración lumínica del BR1.

**Palabras clave:** *Ulva ohnoi*, fotobiorreactor, SGR (crecimiento), clorofila, pH, Radiación PAR.

## ABSTRACT

The world's population has not stopped growing in recent years, generating a high demand for food, products from the land and natural resources. These facts have boosted the search for new resources that can meet the nutritional needs of humans, that at the same time are compatible with the environment and that have various uses in industries around the world. Algae are the ideal candidates. Algae are a natural resource easily manipulated by humans, whose production cost is quite low, have very high nutritional values and suitable for human consumption, in addition to other uses in the pharmaceutical, cosmetic, animal feed in livestock and in the biofuels industry.

Looking at the various uses of algae, the objective of this work has been to evaluate the growth or specific growth rate (SGR), of fragments of the algae *Ulva ohnoi* in two photobioreactors (BR1 and BR2), each with a different configuration of LED lights, with the intention of studying what effect it has had, both the chlorophyll content, as well as the light incidence and the conditions of the crops, in the growth of algae fragments.

In the BR1 (LED lights focusing inwards) incident light intensities greater than 200  $\mu\text{moles photons/m}^2\cdot\text{s}$  has been appreciated in the center of the bioreactor during the first week of cultivation, however, in the BR2 this value has reached 40  $\mu\text{moles photons/m}^2\cdot\text{s}$ . This difference in the light intensity that both bioreactors have received has resulted in a growth during the first week, generally very high in BR1, reaching increases in biomass above 25 %. In contrast, in BR2 (outward-facing LED lights), except for the fifth crop, biomass has experienced slower, but more progressive growth over time.

This high growth during the first week in BR1 has also led to a lower concentration of chlorophyll and an increase in pH in all crops, considerably reducing the growth of biomass. The alga fragments in this bioreactor have undergone photoinhibition during the first week damaging their photosynthetic apparatus, which, together with the increase in pH due to photosynthesis, have not allowed the crops to fix carbon properly.

In this work it has been possible to appreciate that, with a light configuration such as that of BR2, slower growths have been achieved over time, but also much healthier crops, with a higher chlorophyll index and more consistent alga fragments than those obtained with the light configuration of BR1.

**Key words:** *Ulva ohnoi*, photobioreactor, SGR (growth), chlorophyll, pH, PAR radiation.

# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Les Macroalgues.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Classificació de les macroalgues.....	1
1.1.2 Sistemes de producció de macroalgues.....	3
<b>1.2 Ulva ohnoi.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Paràmetres per al creixement d'Ulva ohnoi.....	9
<b>2. Objectius .....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Característiques de la instal·lació (Sistema IMTA).....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Fotobioreactor utilitzat .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Experiments realitzats.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Obtenció de les condicions del cultiu .....</b>	<b>14</b>
<b>3.5 Obtenció de fragments d'alga .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Determinació del creixement.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7 Determinació de clorofil·la.....</b>	<b>17</b>
<b>3.8 Determinació de radiació PAR.....</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Primer cultiu .....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Nivells de clorofil·la del primer cultiu .....	22
<b>4.2 Segon cultiu .....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Nivells de clorofil·la del segon cultiu .....	24
<b>4.3 Tercer cultiu .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4 Quart cultiu.....</b>	<b>27</b>
4.4.1 Nivells de clorofil·la del quart cultiu .....	28
4.4.2 Evolució de la radiació PAR del quart cultiu.....	29
<b>4.5 Cinquè cultiu .....</b>	<b>32</b>
4.5.1 Nivells de clorofil·la del cinquè cultiu .....	35
4.5.2 Evolució de la radiació PAR del cinquè cultiu .....	36
<b>4.6 Discussió conjunta dels resultats .....</b>	<b>38</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>40</b>
<b>6. PERSPECTIVA PER FUTURS ESTUDIS .....</b>	<b>41</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>42</b>
<b>8. ANNEXOS .....</b>	<b>44</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

Fig 1: Alga Bruna <i>Fucus ceranoides</i> (APROMAR, 2014)	2
Fig 2: Alga Vermella <i>Delesseria Sanguinea</i> (APROMAR, 2014)	2
Fig 3: Alga verda <i>Ulva rígida</i> (APROMAR, 2014)	3
Fig 4: Cultius de <i>Eucheuma</i> i <i>Kappaphycus</i> a les Filipines (APROMAR, 2014)	4
Fig 5: Cambra de producció de gametòfits de <i>Saccharina lastissima</i> en la Planta de Cultiu d'algues del IEO a Santander i cultiu a mar obert en aigües gallegues dels esporòfits produïts. (APROMAR, 2014)	4
Fig 6: Planta terrestre del IEO a Santander de Cultius d'algues en tancs i bosses de diferents espècies de <i>Gracilaria</i> . (APROMAR, 2014)	5
Fig 7: Diagrama conceptual d'un Sistema IMTA (Integrated multi-trophic aquaculture). Els filtradors s'aprofiten de partícules orgàniques petites (small POM) i les algues dels nutrients dissolts en l'aigua (DIN). (Chopin, 2011)	6
Fig 8: Fases de desenvolupament d'un cultiu d'algues (microalgues) (Gaitero Álvarez, 2012)	7
Fig 9: (3); Marge d'un tal·lus d' <i>Ulva ohnoi</i> i les dents microscòpiques que s'hi formen. (5) Vista superficial de la membrana de l' <i>Ulva ohnoi</i> i les cèl·lules poligonals. (Hiraoka et al., 2003)	8
Fig 10: Cicle biològic del gènere <i>Ulva</i> (Casais Caamaño, 2016)	8
Fig 11: Sistema IMTA de l'EEABB. A) Tanc de llenguados ( <i>Solea senegalensis</i> ). B) i C) Tancs d'algues ( <i>Ulva ohnoi</i> ). D) Tanc d'expansió amb biofiltre. (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	11
Fig 12: Representació gràfica de la distribució del tancs del sistema IMTA de l'EEABB (Representació realitzada per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, UPC 2021)	12
Fig 13: Fotobiorreactors utilitzats per els diferents cultius d' <i>Ulva ohnoi</i> (Fotografia realitzada per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, UPC Castelldefels).	13
Fig 14: Sondes per a mesurar concentració i saturació d'oxigen i pH (marca Oxyguard). D'esquerra a dreta tenim, sonda Handy polaris (oxigen), sonda Handy pH (pH). (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	14
Fig 15: Corck borer utilitzat per obtenir petits fragments d'alga i fragments d'alga un cop han estat tallats. (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	16
Fig 16: MC-100 Chlorophyll Concentration Meter, amb exemple de determinació de clorofil·la d'un fragment d'alga. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	17
Fig 17: sonda ULM-500 i procés d'obtenció dels valors de radiació PAR en el BR2 (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	18
Fig 18: Distribució de la radiació PAR en el BR1 sense algues. Mesures fetes a la paret interior i al centre del bioreactor.	19
Fig 19: Distribució de la radiació PAR en el BR2 sense algues. Mesures fetes a la paret interior i al centre del bioreactor.	19
Fig 20: Biorreactors BR1 i BR2 al final del primer cultiu 17/09/21. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	21
Fig 21: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el primer cultiu.	21
Fig 22: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) mitjà de cinc fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el primer cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.	22
Fig 23: Bioreactors BR1 (esquerre) i BR2 (dreta) a la meitat del segon cultiu (01/10/21). Estat dels fragments d'alga (esquerre BR1, dreta BR2) al final del segon cultiu (11/10/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)	23
Fig 24: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el segon cultiu.	24
Fig 25: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) mitjà de cinc fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el segon cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.	24

<i>Fig 26: Bioreactors BR1 (esquerre) i BR2 (dreta) a la meitat del quart cultiu (25/10/21). Estat dels fragments d'alga a la meitat del quart cultiu (25/10/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)</i>	27
<i>Fig 27: Estat dels fragments d'alga al final del quart cultiu (03/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)</i>	27
<i>Fig 28: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el quart cultiu.</i>	28
<i>Fig 29: Representació gràfica de l'evolució dels índex de contingut en clorofil·la (CCI) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el quart cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.</i>	28
<i>Fig 30: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el quart cultiu.</i>	29
<i>Fig 31: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el quart cultiu.</i>	30
<i>Fig 32: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR2 (LED enfocant cap enfora) durant el quart cultiu.</i>	30
<i>Fig 33: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap enfora) durant el quart cultiu.</i>	31
<i>Fig 34: Bioreactors BR1 (esquerre) i BR2 (dreta) a l'inici de la segona setmana del cinquè cultiu (15/11/21). Estat dels fragments d'alga al inici de la segona setmana del cinquè cultiu (15/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)</i>	32
<i>Fig 35: Bioreactors BR1 i BR2 a l'inici de la tercera setmana del cinquè cultiu (22/11/21). Estat dels fragments d'alga al inici de la tercera setmana del cinquè cultiu (22/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)</i>	33
<i>Fig 36: Bioreactors BR1(esquerre) i BR2 (dreta) al final del cinquè cultiu (03/12/21). Estat dels fragments d'alga del BR2 al final del cultiu. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)</i>	34
<i>Fig 37: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el cinquè cultiu.</i>	34
<i>Fig 38: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el cinquè cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.</i>	35
<i>Fig 39: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el cinquè cultiu.</i>	36
<i>Fig 40: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el cinquè cultiu.</i>	37
<i>Fig 41: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR2 (LED enfocant cap enfora) durant el cinquè cultiu.</i>	37
<i>Fig 42: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap enfora) durant el cinquè cultiu.</i>	38

## ÍNDIX DE TAULES

<i>Taula 1: Condicions d'ambdós bioreactors. Els valors representats són les mitjanes de totes les mesures fetes al llarg de cada cultiu i les seves desviacions estàndard. Els resultats sense desviació estàndard són a causa d'una única determinació.</i>	15
<i>Taula 2: Evolució dels pesos dels cultius amb els respectius SGR pel BR1 (llums LED endins).</i>	20
<i>Taula 3: Evolució dels pesos dels cultius amb els respectius SGR pel BR2 (llums LED enfora).</i>	20
<i>Taula 4: Condicions del BR1 durant el tercer cultiu</i>	26
<i>Taula 5: Condicions del BR2 durant el tercer cultiu</i>	26



## **AGRAÏMENTS**

A la meva família i amics, pel constant suport i ajuda al llarg de tota la trajectòria universitària. A Ingrid Masaló per la dedicació, ajuda i paciència que ha demostrat sent la tutora d'aquest treball. A totes aquelles persones que han col·laborat o ajudat a fer possible la realització del treball, ja sigui professors o companys de laboratori, especialment a la Patricia Jiménez i l'Adrián durant els primers mesos al laboratori.

## 1. INTRODUCCIÓ

La utilització d'algues marines com a aliment humà, especialment en països com la Xina, la República de Corea i el Japó, data de l'antiguitat. En els darrers cinquanta anys i gràcies a la immigració a altres regions, s'ha introduït l'ús d'algues en les indústries alimentàries de gairebé totes les parts del món (FAO, 2002).

Més enllà del consum d'algues per a l'alimentació a causa de l'alt contingut en proteïnes (macronutriente), micronutrients com el sodi, calci, magnesi o potassi i vitamines com la B12, A i K, gran part de la producció d'algues com a matèria primera o biomassa va dirigida en resposta a la creixent demanda de la indústria d'hidrocol·loides. Aquest sector s'encarrega d'extreure i produir extractes d'agar-agar, alginat i carragenina els quals tenen ús com a additius alimentaris, agents gelificants d'aliments i productes farmacèutics i en l'estampat de teixits (FAO, 2002, 2018).

L'any 2020 les *Nacions Unides*, juntament amb la *Lloyd's Register Foundation*, van redactar un manifest titulat "*Seaweed Manifesto*" amb la intenció de crear uns estàndards a la indústria i mostrar que les algues marines poden contribuir als objectius de desenvolupament sostenible. La seva visió és que la indústria d'algues marines té el potencial per resoldre problemes d'ordre mundial com mitigar el canvi climàtic, ja que gairebé el 50% de la fotosíntesi a la Terra es produeix en les macro i micro-algues dels oceans, ajudar als ecosistemes marins proporcionant nous hàbitats i biodiversitat i crear llocs de treball fent créixer econòmicament les regions costaneres més subdesenvolupades (Giercksky & Doumeizel, 2020).

### 1.1 Les Macroalgues

Les algues, o macroalgues, són organismes pluricel·lulars de grandària macroscòpica i tal·lòfits, és a dir, sense una estructura vegetativa diferenciada. El seu cicle biològic es du a terme en el medi marí i posseeixen pigments fotosintetitzadors que els hi permeten utilitzar la nutrició autòtrofa (APROMAR, 2014).

#### 1.1.1 Classificació de les macroalgues

Les algues marines es poden diferenciar en tres grans grups segons el tipus de pigments que posseeixin els cloroplasts: brunes, vermelles i verdes (APROMAR, 2014; FAO, 2002).

### - Brunas (*Phaeophyceae*)

Aquest grup es caracteritza per tenir colors marronosos o groguencs (Fig. 1) a causa de l'existència de beta-carotens i xantofil·les, pigments fotosintètics que emmascaren el color verdós que proporciona la clorofil·la c que també les conforma. Comprenen unes 2000 espècies bentòniques que solen formar "prats" o "boscos" en els fons marins dels litorals, servint com a hàbitat o refugi per a diversos animals. Entre les diferents algues brunes podem trobar espècies filamentoses molt senzilles i de grandàries compreses entre els 30 cm a 60 cm, fins a espècies laminarials més complexes i de major grandària, arribant als 20 m de longitud o més. La paret cel·lular d'aquest grup d'algues està compresa de dues capes: la capa interior formada per cel·lulosa, resistent i proporcionant sosteniment, i la capa exterior formada per alginat principalment, la qual té un paper important en l'intercanvi iònic amb el medi. Les algues brunes són la principal font d'alginat per a indústries alimentàries i farmacèutiques.



Fig 1: Alga Bruna *Fucus ceranoides* (APROMAR, 2014)

### - Vermelles (*Rhodophyta*)

Les algues vermelles (Fig. 2) comprenen més de 5000 espècies, la majoria marines. Generalment, són algues pluricel·lulars i morfològicament molt diverses. Contenen clorofil·la a i d, com també pigments complementaris vermells i blaus de naturalesa proteica (ficoeritrina i ficocianina), alfa-carotens, beta-carotens i xantofil·les. Aquesta composició de pigments els hi permet captar radiacions lumíniques diferents de les que podrien captar si



Fig 2: Alga Vermella *Delesseria Sanguinea* (APROMAR, 2014)

només disposessin de clorofil·la, fet que els hi suposa un avantatge per colonitzar aigües profundes on la llum predominant és blava i verda. Són algues petites, de grandàries que van dels pocs centímetres fins a 1 m de longitud. En les parets cel·lulars d'aquest grup d'algues hi trobem cel·lulosa i diversos polisacàrids mucilaginosos (ficocol·loides), d'entre els quals cal destacar l'agar-agar per les seves aplicacions en la indústria com a gelificant.

### - Verdes (*Chlorophyta*)

Les algues verdes són el grup més diversificat amb més de 8000 espècies. Són molt variades morfològicament i hi podem diferenciar formes senzilles i filamentoses, formes laminars, discoidals o estructures més complexes de tipus sifonal. També les podem diferenciar en els seus cicles biològics i ambients que poden colonitzar.



Fig 3: Alga verda *Ulva rígida* (APROMAR, 2014)

A part, trobem ordres exclusius d'aigua dolça, d'aigua marina, o ambdós medis, però totes es caracteritzen per posseir clorofil·la a i b, fet que els hi profereix el color verdós característic (Fig. 3). Les parets cel·lulars contenen principalment cel·lulosa i algunes espècies són cultivades especialment per a les indústries alimentàries d'arreu del món degut al seu gran valor nutricional.

#### 1.1.2 Sistemes de producció de macroalgues

El cultiu d'algues (ficocultura) produeix aproximadament el 70 % de les algues marines utilitzades en tot el món. En l'actualitat han sorgit noves tècniques de cultiu que han permès diversificar enormement la producció. Les algues són, generalment, bones candidates per a ser cultivades a causa de les seves característiques i principalment per no posseir una marcada diferenciació de teixits, és a dir, tenen facilitat per a la propagació vegetativa, els seus cicles reproductius són mal·leables i la variabilitat dels seus metabolismes permeten produir diverses substàncies en proporcions molt diferents segons la tècnica de cultiu (APROMAR, 2014).

Els principals mètodes de cultiu són la ficocultura extensiva i la ficocultura intensiva. La ficocultura extensiva es caracteritza per ser una tècnica de semicultiu, ja que només tracta d'afavorir i expandir poblacions naturals d'algues fent augmentar les superfícies de fixació o trasplantant tal·lus fèrtils d'una plantació a una altra amb la intenció que el cultiu es naturalitzi. En canvi, en la ficocultura intensiva, tots els processos estan controlats per l'ésser humà independentment de la complexitat metodològica. En funció del tipus i l'emplaçament del cultiu, podem classificar els cultius intensius en:

#### - Ficocultura en mar ("*outdoor*")

Aquesta tècnica s'utilitza per a espècies que es poden cultivar a partir de la propagació vegetativa. Per a iniciar el cultiu es fragmenten les algues manualment i es replanten els fragments (Fig. 4). En ser una tècnica poc costosa en materials, és la més predominant en països en vies de desenvolupament, ja que només són necessàries cordes i piquetes. El rendiment d'aquest tipus de cultiu és modest, es realitza en zones poc profundes i són susceptibles a variacions naturals impredecibles i patologies.



Fig 4: Cultius de *Euclidean* i *Kappaphycus* a les Filipines (APROMAR, 2014)

#### - Ficocultura mixta planta-mar (“*indoor-outdoor*”)

Com el seu nom indica, la ficocultura mixta està constituïda de dues parts, cultiu en planta i cultiu en mar (Fig. 5). És una tècnica utilitzada per a espècies que no poden ser cultivades a partir de la propagació vegetativa i que han de dur a terme el seu cicle biològic, alternant entre generacions amb reproducció sexual (gametòfits) i asexual (esporòfits). El procés es basa en una producció controlada de plàntules en instal·lacions a terra, anomenada fase de multiplicació, que, posteriorment, són introduïdes al mar per al seu desenvolupament i per dur a terme la fase de producció.

Un cop en el mar, les algues es fixen en cordes situades en aigües amb una certa profunditat, d’aquesta manera no es veuen tan afectades per factors ambientals externs com podria passar amb els cultius “*outdoor*” en aigües poc profundes. Els cultius es poden adaptar molt més a les nostres necessitats i permeten collites més homogènies i de major qualitat.



Fig 5: Cambra de producció de gametòfits de *Saccharina lastissima* en la Planta de Cultiu d’algues del IEO a Santander i cultiu a mar obert en aigües gallegues dels esporòfits produïts. (APROMAR, 2014)

### - Ficocultura en planta (“indoor”)

Les instal·lacions per dur a terme aquest tipus de producció se situen en plantes terrestres (Fig. 6). Són sistemes amb un alt cost econòmic, però la gran majoria dels processos estan mecanitzats i controlats. Els cultius són de baixa productivitat i, generalment, són utilitzats de manera experimental per estudiar determinades característiques sobre una espècie d'alga, procés en el qual és necessari un control detallat de les condicions del cultiu segons l'objectiu al qual es vulgui arribar.



Fig 6: Planta terrestre del IEO a Santander de Cultius d'algues en tancs i bosses de diferents espècies de *Gracilaria*. (APROMAR, 2014)

### - Sistema IMTA

Un dels sistemes de cultiu que ofereix més avantatges, siguin econòmics, ecològics o ambientals, és el sistema IMTA (*Integrated multitrophic Aquaculture*). Aquest tipus de sistemes estan formats per diverses línies tròfiques (Fig. 7), és a dir, en un mateix cultiu hi trobem diferents organismes que no pertanyen al mateix nivell tròfic. Gràcies a aquesta pràctica, els subproductes generats per una espècie són reciclats per una altra, com si es tractés d'un ecosistema, permetent així un millor aprofitament dels recursos (Rosa et al., 2020).

El sistema IMTA ofereix una producció aquícola equilibrada i millora la qualitat de l'aigua que hi circula. Les macroalgues que formen part del sistema garanteixen efectes de biomitigació i redueixen l'eutrofització de l'aigua (Lima, 2020).

Els nivells tròfics que més habitualment conformen els sistemes IMTA (Fig. 7) són els següents:

- **Peixos:** Generen recursos orgànics i inorgànics com a resultat de la seva activitat metabòlica o d'aliments que no han estat ingerits. Generalment, seran aportacions de compostos inorgànics com el nitrogen amoniacal, fosfats i carboni.
- **Filtradors:** La funció dels organismes que conformen aquest nivell tròfic dintre del sistema és la de filtrar l'aigua i reduir partícules orgàniques grans a partícules més petites i de grandària apta perquè les algues les puguin absorbir. Es troben entre els peixos i les algues (Fig. 7).
- **Algues:** Aquests organismes s'encarreguen de consumir els nutrients inorgànics dissolts en l'aigua, principalment nitrogen i fòsfor procedents dels subproductes dels



organismes que formen la resta de nivells tròfics. Gràcies a les algues s'incrementa la qualitat de l'aigua que circula en tot el sistema.

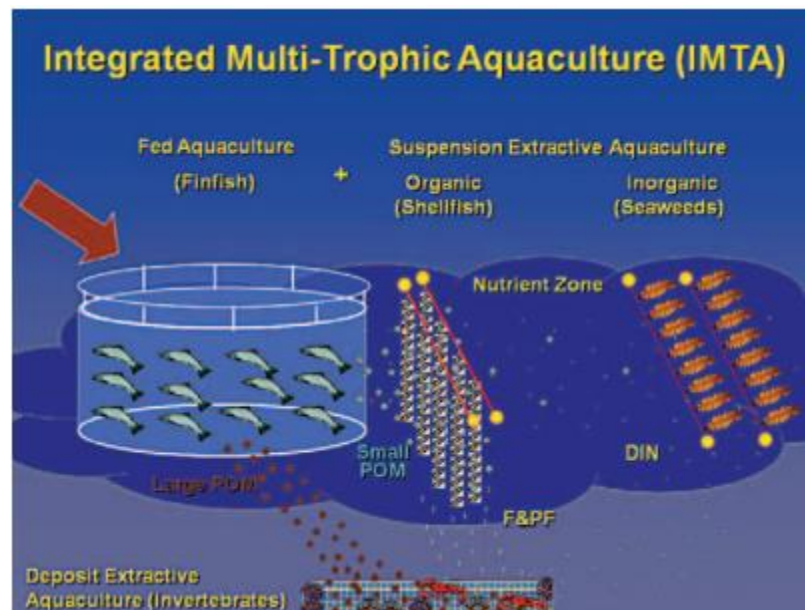


Fig 7: Diagrama conceptual d'un Sistema IMTA (Integrated multi-trophic aquaculture). Els filtradors s'aprofiten de partícules orgàniques petites (small POM) i les algues dels nutrients dissolts en l'aigua (DIN). (Chopin, 2011)

#### - Bioreactors (Batch)

La biotecnologia de les algues s'ha enfocada principalment cap a les algues microscòpiques i la configuració i disposició d'aquests cultius es fa, en gran part, en bioreactors de tipus *batch* (reactor discontinu seqüencial). Aquest tipus de bioreactor permet un bon control de les condicions del cultiu i és ideal per a cultius d'inòculs, petits cultius d'algues que es transfereixen al bioreactor, que té la funció de medi de cultiu fresc, amb la intenció que actuï com a element inicial de creixement (Gaitero Álvarez, 2012). Encara que aquest tipus de cultiu sigui més habitual per a microalgues, també s'hi poden cultivar macroalgues a partir de petits fragments.

En un cultiu de microalgues tipus *batch*, el creixement es presenta en cinc fases o etapes de desenvolupament (Gaitero Álvarez, 2012):

- **Fase d'ajust:** es l'etapa d'adaptació de l'inòcul a les noves condicions del cultiu. Es una fase curta i no hi ha creixement net de la població.
- **Fase exponencial:** les cèl·lules es dupliquen successivament en intervals iguals de temps.
- **Fase de retard o declinació:** en aquesta etapa el temps requerit per a duplicar la població augmenta, reduint-se la taxa de creixement. Els nutrients del medi han disminuït i hi ha menys activitat fotosintètica.
- **Fase estacionaria:** fase curta on no hi ha creixement cel·lular, és a dir, la població no augmenta. La taxa de creixement s'igual a la taxa de mortalitat.
- **Fase de mort cel·lular:** la taxa de mortalitat supera a la taxa de multiplicació cel·lular.

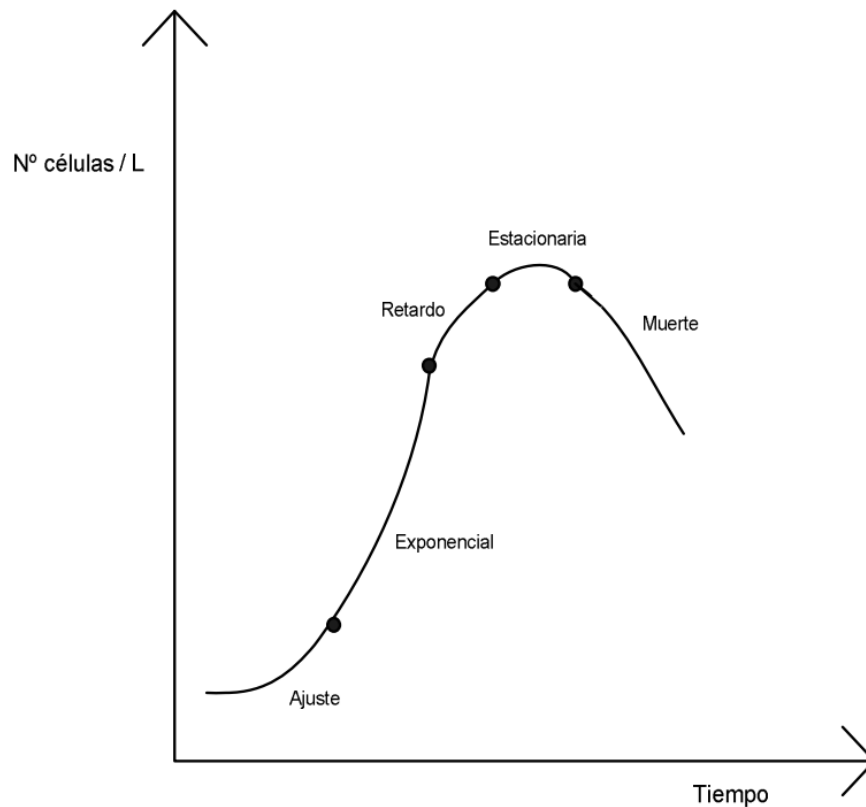


Fig 8: Fases de desenvolupament d'un cultiu d'algues (microalgues) (Gaitero Álvarez, 2012)

## 1.2 Ulva ohnoi

La macroalga *Ulva ohnoi* (*Ulvales*, *Chlorophyta*), alga verda marina endèmica de les costes del Japó, ha estat identificada com una bona candidata per a ser cultivada en plantes terrestres o plantes d'aqüicultura multi-tròfica integrada, gràcies a la capacitat de ser cultivada sense estar lligada a una superfície, la seva àmplia tolerància a factors ambientals, la seva alta velocitat de creixement i la capacitat d'absorbir nitrogen (Oca et al., 2019).

Aquesta alga es caracteritza per tenir una làmina gran però fràgil, amb gruixos d'entre 30  $\mu\text{m}$  i 50  $\mu\text{m}$  en les zones apicals i mitjanes i d'entre 80  $\mu\text{m}$  a 90  $\mu\text{m}$  en les zones inferiors o basals. Quan el tal·lus es troba flotant lliurement no disposa de zona basal, però pot créixer fins a 50 cm generant "dents" microscòpics. Les cèl·lules superficials es disposen de manera desordenada i tenen formes poligonals d'entre 13  $\mu\text{m}$  a 21  $\mu\text{m}$  de llargada i 7  $\mu\text{m}$  a 16  $\mu\text{m}$  d'amplada (Fig. 9) (Hiraoka et al., 2003).



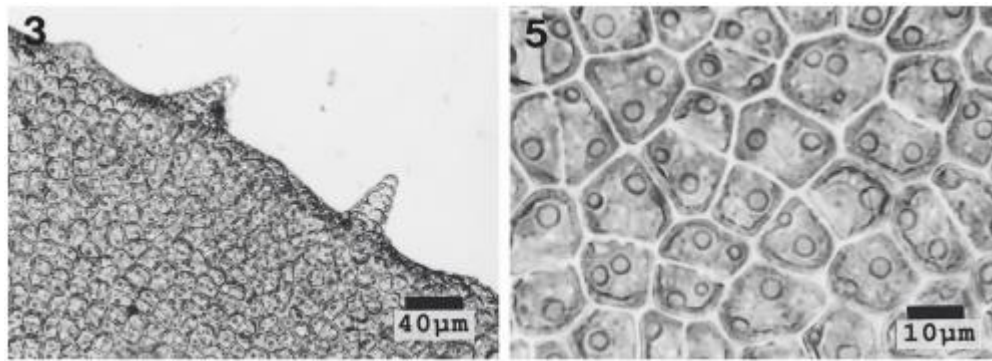


Fig 9: (3); Marge d'un tal·lus d'*Ulva ohnoi* i les dents microscòpiques que s'hi formen. (5) Vista superficial de la membrana de l'*Ulva ohnoi* i les cèl·lules poligonals. (Hiraoka et al., 2003)

El cicle biològic de l'*Ulva ohnoi* no difereix de la resta d'espècies d'*Ulva*. Les espècies d'aquest gènere es caracteritzen per posseir un cicle haplo-diploide isomòrfic (Fig. 10). Els esporòfits, en les regions marginals superiors clarament definides en el tal·lus, formen espores (1n) a partir de la meiosi. La nova generació d'espores duen a terme la mitosi i formen un nou tal·lus haploide (1n), que un cop format, genera nous gàmetes femenins i masculins, els quals, en fusionar-se, formen un zigot (2n) que acabarà generant un nou tal·lus diploide.

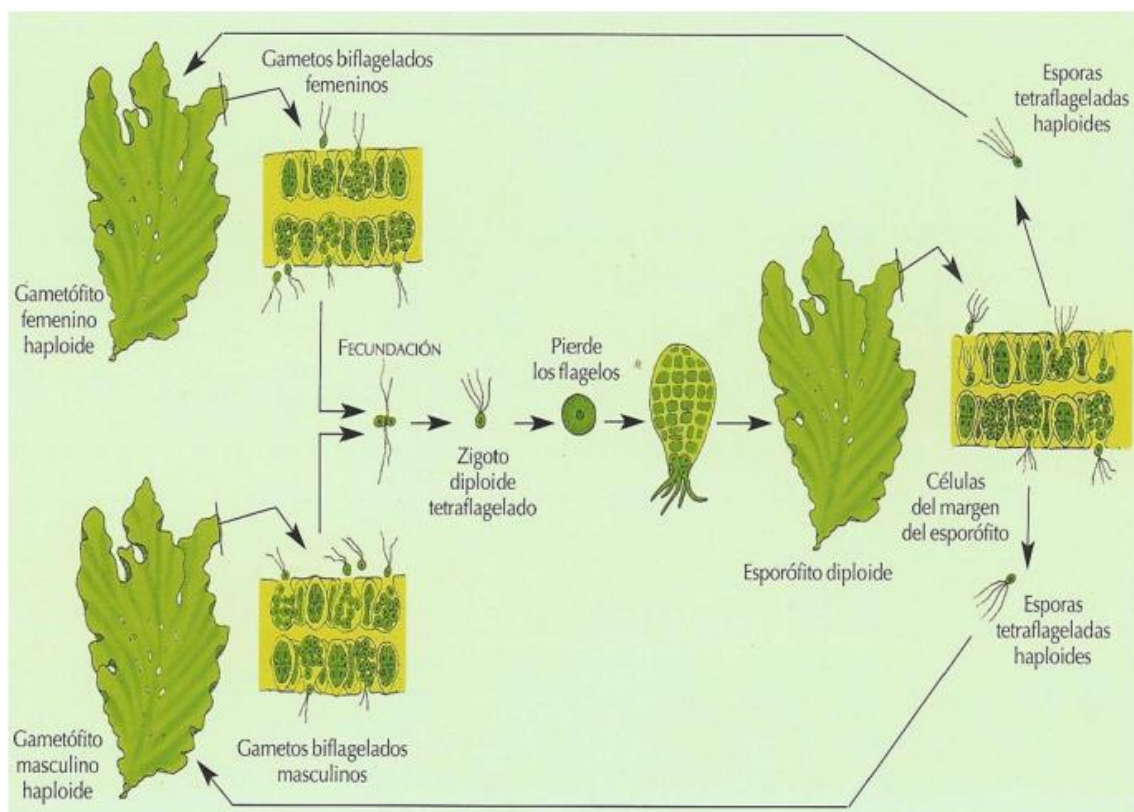


Fig 10: Cicle biològic del gènere *Ulva* (Casais Caamaño, 2016)

### 1.2.1 Paràmetres per al creixement d'*Ulva ohnoi*

En un cultiu d'*Ulva ohnoi* hi ha diferents factors que han d'estar controlats per al correcte creixement de l'alga. Per una banda, existeixen els factors abiòtics tals com la irradiància i la disponibilitat de carboni i nutrients essencials (nitrogen i fòsfor) en el medi. Per altra banda, també s'han de tenir en compte els factors o paràmetres ambientals com la temperatura, el pH i la salinitat.

Proveir energia lluminosa és essencial perquè les algues puguin créixer i dur a terme la fotosíntesi. Les radiacions òptimes es troben entre els 400 nm i 700 nm, rang gairebé equivalent a l'espectre de llum visible, o el que també rep el nom de PAR (*photosynthetically active radiation*). Tota aquella radiació que arriba a un cultiu provoca un augment de temperatura, o inclús pot ser letal per a les cèl·lules en el cas de llum ultraviolada (Huang et al., 2017).

El diòxid de carboni (bicarbonat un cop s'ha dissolt en el medi de cultiu), és la principal font de carboni per al creixement de les cèl·lules d'organismes fotoautòtrofs. Generalment, la difusió simple entre el CO<sub>2</sub> present en l'aire, cap a l'aigua del tanc, és molt lenta, o més lenta que l'assimilació de CO<sub>2</sub> per part de les algues que creixen molt ràpidament. La falta de carboni en el medi de cultiu es pot suplir afegint bicarbonat de sodi, sempre que els nivells d'alcalinitat estiguin per sota uns mínims (Suh & Lee, 2003).

De la mateixa forma que el carboni, altres nutrients essencials també han de ser presents en el medi. El nitrogen forma part de les estructures de proteïnes i nucleòtids, és per això que mai pot faltar en el medi, ja sigui en forma de nitrats (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o amoni (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). El tercer component que no pot faltar és el fòsfor. Aquest compost inorgànic forma part de les molècules estructurals de la membrana cel·lular, els fosfolípids, i té un paper important en certs intermediaris metabòlics (Bringué, 2019).

La temperatura i el pH són factors que també poden afectar el desenvolupament de l'*Ulva ohnoi*. El creixement òptim d'aquesta espècie es dona a temperatures entre els 20 °C i 25 °C i per sota de la temperatura llindar, sobre els 10 °C, el creixement és pràcticament nul (Hiraoka et al., 2003). Respecte al pH, es ideal intentar que no sobrepassi valors per sobre de 8,5 (Oca et al., 2019). L'alcalinitat i salinitat també són factors rellevants que es poden tenir en compte (Casais Caamaño, 2016).

## 2. Objectius

Aquest treball s'ha centrat en l'avaluació i comparació del creixement de fragments de l'alga *Ulva ohnoi* en dos fotobiorreactors, cada un, amb una configuració de llums LED diferent.

Els objectius principals d'aquest projecte han estat:

- Estudiar la taxa de creixement o SGR (Specific Growth Rate) dels fragments d'alga d'*Ulva ohnoi*, amb un control diari dels diferents paràmetres de cultiu.
- Determinar el contingut de clorofil·la en els fragments d'alga durant el període de cultiu.
- Determinar la radiació PAR dins els fotobiorreactors durant el període de cultiu.

### 3. MATERIALS I MÈTODES

Per dur a terme els objectius proposats i estudiar, tant la radiació PAR com el contingut de clorofil·la en els cultius, s'han fet créixer petits fragments d'alga en dos fotobioreactors.

#### 3.1 Característiques de la instal·lació (Sistema IMTA)

Aquest projecte s'ha realitzat en les instal·lacions de l'EEABB (Escola d'Enginyeria Agroalimentària i Biosistemes de Barcelona, UPC Castelldefels), concretament al laboratori del grup de recerca SPAq (Sistemes de Producció Aqüícola). En aquest laboratori (Fig. 11) s'hi troba el sistema multitròfic integrat (IMTA), a partir del qual s'han extret els fragments d'alga per iniciar els diferents cultius del projecte.

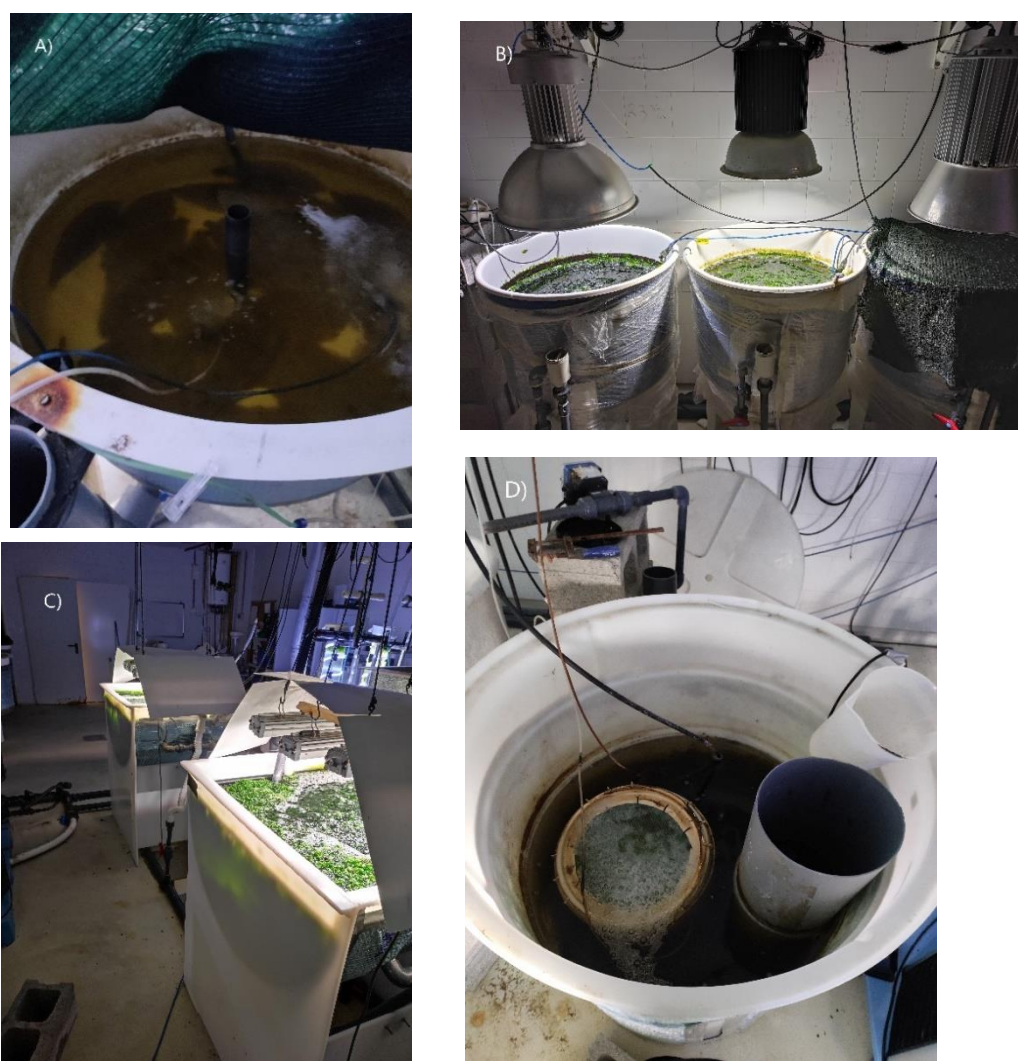


Fig 11: Sistema IMTA de l'EEABB. A) Tanc de llenguados (*Solea senegalensis*). B) i C) Tancs d'algues (*Ulva ohnoi*). D) Tanc d'expansió amb biofiltre. (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)

La circulació d'aigua dins del sistema comença en el tanc d'expansió (Fig. 12). Aquest tanc conté un biofiltre que és l'encarregat de transformar el nitrogen amoniacal provinent de les excrecions dels peixos (tòxic inclús a baixes concentracions, 1 ppm), en nitrats. A part, també hi ha un tanc amb una

concentració d'àcid clorhídric que proporciona un cabal constant al tanc d'expansió i que té la funció d'anar regulant el pH per tal que estigui en nivells òptims per al creixement de les algues.

El cabal d'aigua que surt del tanc d'expansió (Fig. 11, D) es redirigeix a la resta de tancs del sistema. Es tracta d'un tanc cilíndric amb un diàmetre d'1 m, el cabal de sortida del qual, retorna al tanc d'expansió amb la intenció que actuï el biofiltre. Per una banda aporta aigua al tanc on es cultiven els peixos (Fig. 11, A). Per altra banda, el cabal de sortida, ric en nitrats per l'actuació del biofiltre, es redirigeix als diferents tancs d'algues. Són cinc tancs en total, tres d'ells tenen una configuració cilíndrica amb una capacitat de 90 L (Fig. 11, B) i els dos restants tenen una superfície rectangular i fons semicircular amb una capacitat de 172 L (Fig. 11. C). Els cinc tancs també tenen un cabal de sortida que retorna l'aigua al tanc d'expansió, punt d'inici del sistema.

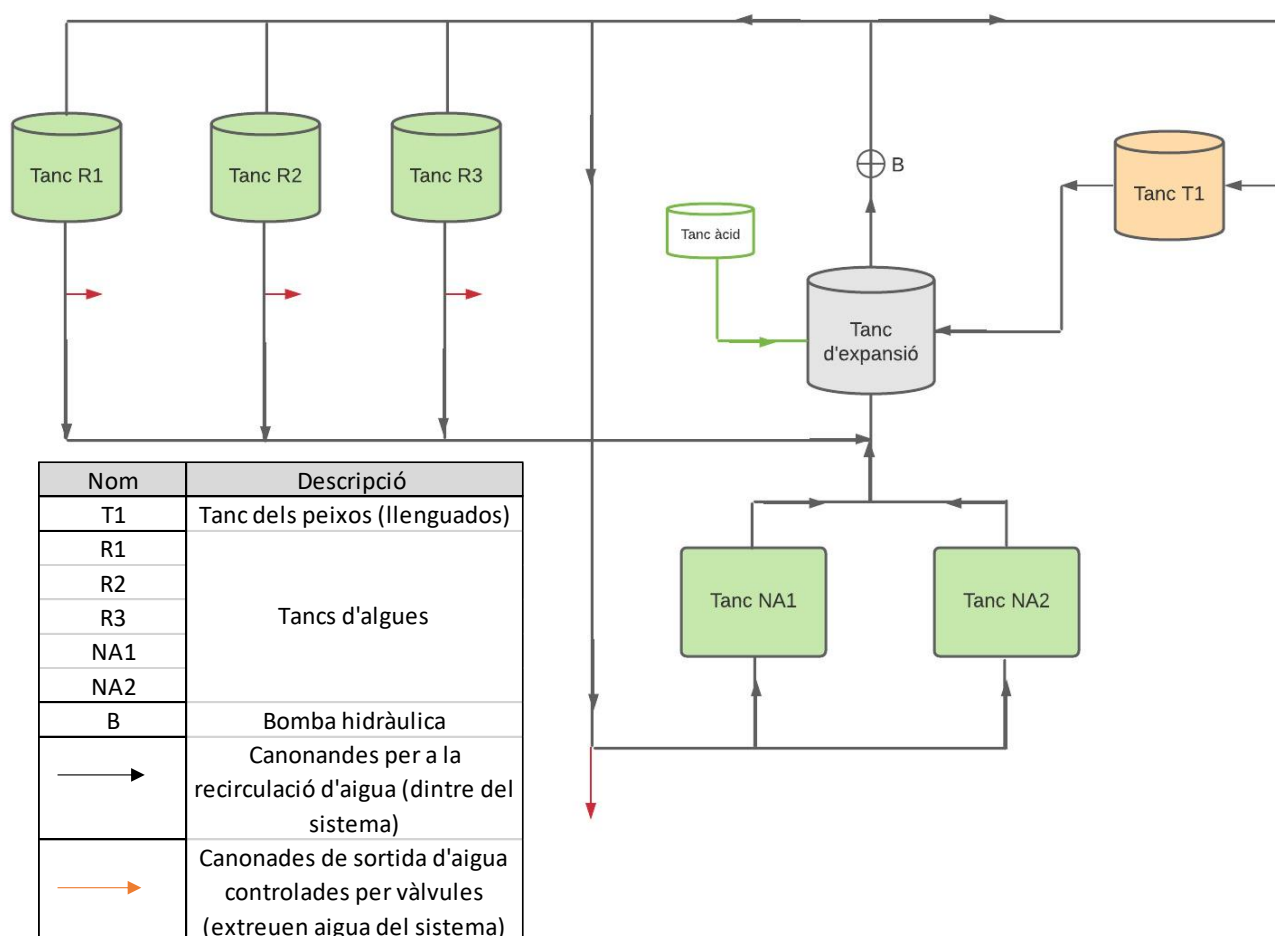


Fig 12: Representació gràfica de la distribució dels tancs del sistema IMTA de l'EEABB (Representació realitzada per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, UPC 2021)



### 3.2 Fotobioreactor utilitzat

Els cultius d'alga es van dur a terme en dos fotobioreactors (Fig. 13). Es tracta d'uns fotobioreactors cilíndrics, de diàmetre interior de 14,5 cm, 45 cm de longitud i una capacitat de 7 L. S'hi va aplicar un flux d'aeració a partir d'un compressor d'aire. La columna de bombolles, que sortia des de la base, servia per homogeneïtzar el medi i crear l'agitació necessària perquè les algues pugessin per el centre i baixessin lentament vora les parets, recorrent així gran part de la superfície del reactor i rebent el màxim d'irradiància possible.

Com es mostra en la imatge (Fig. 13), tots dos bioreactors disposaven d'uns llums LED enrotllats en la seva superfície. Un dels principals objectius de l'estudi era determinar si diferents configuracions lumíniques tenien un efecte sobre el creixement de les algues, és per això que cada reactor tenia col·locades les llums LED d'una determinada manera, un amb les llums enfocant a l'interior del reactor i l'altre amb les llums enfocant cap enfora del reactor. Per a diferenciar l'un de l'altre durant tots els cultius, es va anomenar BR1 al bioreactor amb els llums LED enfocant cap endins i BR2 al bioreactor amb les llums LED enfocant cap enfora. Ambdós reactors tenien les tires de LED separades per aproximadament 12 cm durant tots els cultius.



Fig 13: Fotobioreactors utilitzats per els diferents cultius d'*Ulva ohnoi* (Fotografia realitzada per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, UPC Castelldefels).

### 3.3 Experiments realitzats

Per a cada un dels cultius realitzats en aquest projecte es va seguir la mateixa metodologia, la qual es descriu a continuació.

El procés s'iniciava agafant algues d'un dels cinc tancs del sistema IMTA del laboratori. Es mirava que en aquestes algues no hi hagués epífites en la superfície per tal d'evitar que proliferessin en el bioreactor, i també que la superfície no fos molt rugosa per facilitar futures mesures de clorofil·la. Un cop s'havia escollit les algues, amb l'ajuda d'un estri (Corck borer, Fig. 15), es tallaven petits fragments d'alga amb forma circular els quals es transferien a cada un dels fotobioreactors. A partir de l'inici del cultiu, es prenen mesures diàries de les condicions i paràmetres més rellevants pel

correcte creixement de les algues i cada set dies es mesurava el pes d'ambdós bioreactors (s'extreien les algues i es pesaven amb una balança analítica de la marca COBOS i model COBOS UW 1020H), per poder analitzar el creixement setmanal de cada cultiu. Aprofitant que s'havia d'extreure les algues també es canviava aproximadament un 50 % de l'aigua de cada bioreactor amb la intenció de renovar els nutrients essencials (nitrogen i fòsfor).

Un cop per setmana s'elaboraven anàlisis de nitrats, fosfats i alcalinitat (annexos a, b i c), tant dels dos bioreactors com del tanc d'expansió, d'aquesta manera ens asseguràvem que l'aigua utilitzada també tenia les condicions adequades per al correcte creixement dels cultius.

Periòdicament, s'extreien fragments d'alga per analitzar els índexs de clorofil·la, que eren retornats al seu corresponent cultiu i, amb l'ajuda d'una sonda, es va mesurar la radiació PAR a l'interior dels tancs durant el quart i cinquè cultiu.

### 3.4 Obtenció de les condicions del cultiu

Era important dur un control diari de les condicions abiòtiques i ambientals d'ambdós fotobioreactors. Per a mesurar, tant la concentració i saturació d'oxigen, com el pH, es van utilitzar dues sondes de la marca Oxyguard (Handy Polaris per a l'oxigen i Handy pH per al pH) (Fig. 16)



Fig 14: Sondes per a mesurar concentració i saturació d'oxigen i pH (marca Oxyguard). D'esquerra a dreta tenim, sonda Handy polaris (oxigen), sonda Handy pH (pH). (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)

Per a utilitzar aquestes sondes, s'introduïa l'extrem amb el sensor a l'interior dels fotobioreactors i ens esperàvem que el valor que marcava no mostrés variacions.

Tant el control de l'alcalinitat i el control de nutrients essencials com el nitrogen i fòsfor, es van dur a terme a partir d'anàlisis químiques. Els protocols d'aquestes anàlisis es troben en l'apartat d'annexos (nitrats annex A, fosfats annex B, alcalinitat annex C)

Respecte a l'anàlisi de les concentracions de nitrats, fosfats i alcalinitat en el cultiu, cal destacar que també es van dur a terme anàlisis de l'aigua del tanc d'expansió a l'hora que es miraven les concentracions dels dos fotobioreactors (BR1 i BR2). Aquest procés es duia a terme perquè després

de mesurar el pes d'alga de cada cultiu es renovava part de l'aigua dels tancs (50 % de l'aigua) amb aigua del tanc d'expansió i era important saber quines concentració eren present a l'aigua que s'utilitzava per reomplir els dos bioreactors.

Pel que fa a la irradiància, es va utilitzar una sonda ULM-500 (Universal Light Meter, de WALZ). El procés d'obtenció de les radiacions PAR queda detallat en l'apartat 3.8.

En la següent taula (Taula 1) es poden apreciar les condicions dels 5 cultius realitzats.

*Taula 1: Condicions d'ambdós bioreactors. Els valors representats són les mitjanes de totes les mesures fetes al llarg de cada cultiu i les seves desviacions estàndard. Els resultats sense desviació estàndard són a causa d'una única determinació.*

	Primer cultiu		Segon cultiu		Tercer cultiu		Quart cultiu		Cinquè cultiu	
	BR1	BR2	BR1	BR2	BR1	BR2	BR1	BR2	BR1	BR2
Temperatura (°C)	25,7 ± 2,9	25,9 ± 2,4	23,2 ± 1,3	23,5 ± 1,3	22,8 ± 0,6	23 ± 0,5	22,6 ± 0,9	22,8 ± 0,6	24,0 ± 1,7	23,7 ± 1,3
[O <sub>2</sub> ] (mg/L)	7,07 ± 0,34	6,84 ± 0,33	7,39 ± 0,32	7,3 ± 0,21	7,49 ± 0,33	7,15 ± 0,11	7,75 ± 0,22	7,28 ± 0,11	7,43 ± 0,34	7,30 ± 0,15
Saturació O <sub>2</sub> (%)	101,36 ± 3,85	98,54 ± 2,69	101,22 ± 4,48	100,06 ± 1,55	99,03 ± 1,23	97,03 ± 1,18	104,13 ± 3,03	99 ± 0,99	103,41 ± 4,54	100,17 ± 1,02
pH	8,34 ± 0,27	8,19 ± 0,24	7,82 ± 1,31	7,58 ± 1,07	6,37 ± 0,02	6,21 ± 0,06	8,91 ± 0,94	8,35 ± 0,66	9,67 ± 0,53	8,77 ± 0,23
Alcalinitat (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	179,37	200,47	116,06 ± 74,61	94,96 ± 84,53	52,75	63,31	142,44 ± 141,75	147,71 ± 149,21	221,57	211,02
Nitrats (mg N-NO <sub>3</sub> /L)	12,63	17,90	33,93 ± 4,16	34,93 ± 1,76	37,07	32,75	31,09	47,05	38,05 ± 7,31	39,39 ± 4,17
Fosfats (mg P/L)	0,07	0,41	0,80 ± 0,75	1,05 ± 0,39	1,78	1,74	-	-	0,17 ± 0,02	1,11 ± 0,68

### 3.5 Obtenció de fragments d'alga

Els fragments d'alga es van obtenir amb l'ajuda de l'estri que es mostra a la figura 15. Aquest tallador ens permetia realitzar petits discs d'aproximadament 1 cm de diàmetre, els quals eren traslladats als fotobioreactors en cada inici de cultiu. Les algues s'extreien d'un dels cinc tancs del laboratori i, com que els fragments s'havien de tallar a mà, es disposaven diverses capes d'alga, l'una sobre l'altra, amb la intenció de facilitar el procés. Aquest procés es repetia fins a obtenir 2,00 g de fragments d'alga o 4,00 g en el cas del BR1 per als últims tres cultiu. Els fragments eren pesats amb una balança de precisió de la marca COBOS (COBOS UW 1020H).



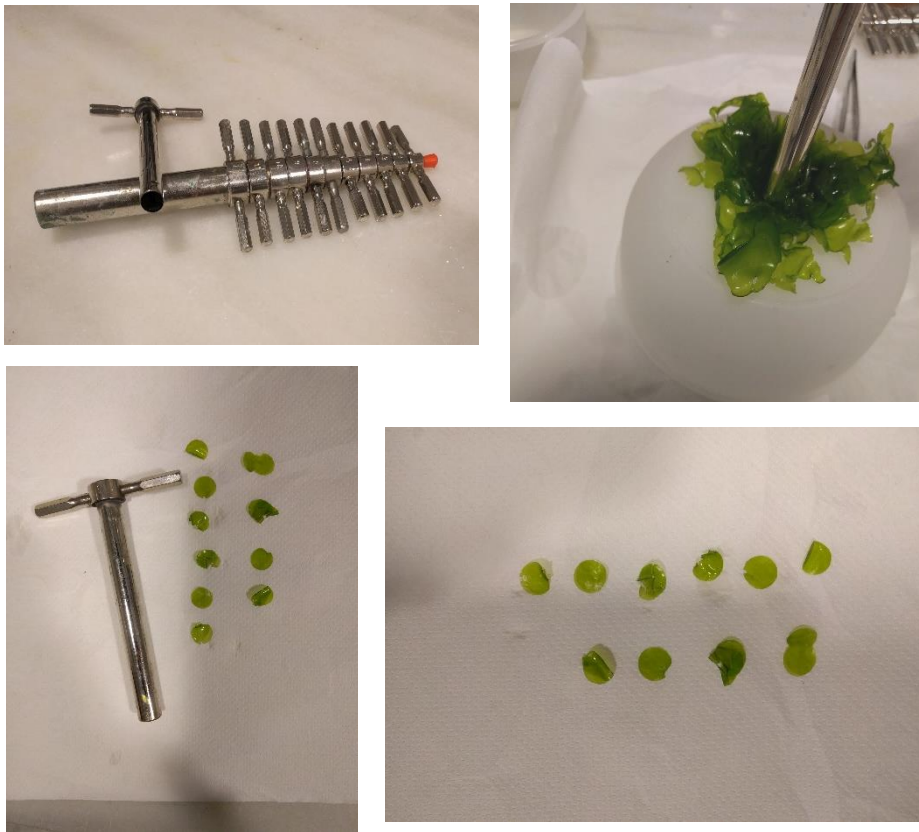


Fig 15: Corck borer utilitzat per obtenir petits fragments d'alga i fragments d'alga un cop han estat tallats. (Fotografies realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)

### 3.6 Determinació del creixement

Per a comparar si les dues disposicions lumíniques tenien algun efecte directe sobre els fragments d'alga, a part d'un control diari dels paràmetres de cultiu, es va mesurar el creixement de les poblacions d'alga de cada fotobioreactor. El creixement es va calcular a partir del SGR (*specific growth rate*) o taxa de creixement utilitzant l'equació (1).

$$\text{SGR} = \frac{\ln\left(\frac{\text{pes final}}{\text{pes inicial}}\right)}{\text{temps}} \cdot 100 \quad (1)$$

En aquest treball es va pesar les algues un cop per setmana.

### 3.7 Determinació de clorofil·la

En cada un dels cultius es va mesurar els índexs de clorofil·la, tant del BR1 com del BR2. Generalment, es va mesurar un cop per setmana amb la intenció de visualitzar l'evolució i comparar el contingut a principi i final de cultiu.

Les mesures del contingut en clorofil·la en les algues es van realitzar amb el sensor òptic MC-100 *Chlorophyll Concentration Meter* (Apogee Instruments Inc) (Fig. 16). Aquest mesurador òptic dona els valors com a índex de contingut en clorofil·la (CCI, *Chlorophyll Content Index*), que es tracta d'una unitat relativa, un valor sense dimensió però relacionat amb el contingut de clorofil·la. A partir de la recta de regressió (2) obtinguda en un altre estudi (Masaló & Oca, 2020), es poden convertir les unitats relatives en unitats absolutes de clorofil·la per a l'alga *Ulva ohnoi*.

$$\text{Total chlorophyll } (\mu\text{mol}/\text{m}^2) = 66.529 \cdot \text{CCI} - 58.185 \quad (2)$$



Fig 16: MC-100 Chlorophyll Concentration Meter, amb exemple de determinació de clorofil·la d'un fragment d'alga. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)

### 3.8 Determinació de radiació PAR

A partir del tercer cultiu es va idear un sistema per a poder mesurar la radiació fotosintèticament activa (PAR), en  $\mu\text{mols fotons}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , a cada un dels fotobioreactors. Aquesta mesura es va realitzar mitjançant la sonda ULM-500 (*Universal Light Meter*, de WALZ). Es van prendre mesures de la radiació PAR un cop per setmana d'inici a final de cultiu, tant al centre del fotobioreactor com a la paret d'aquest. En la següent figura (Fig. 19) es mostra com es va utilitzar la sonda, ja que, disposa d'un software que no es va poder utilitzar perquè no enregistrava les dades automàticament quan se submergia un cert temps en els tancs. Es van prendre diferents mesures al llarg de tot el bioreactor (Fig. 18, Fig. 19), a l'altura de les franges dels llums LED i en les zones que quedaven entre franja i franja.



*Fig 17: sonda ULM-500 i procés d'obtenció dels valors de radiació PAR en el BR2 (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)*

El tub de plàstic que s'introduïa al tanc es va marcar centímetre a centímetre, amb la intenció que servís com a guia a l'hora de prendre les mesures manualment.

Les gràfiques que es mostren a continuació (Fig. 18, Fig. 19) representen o contextualitzen la distribució lumínica (radiació PAR) dels dos reactors amb aigua però sense algues en el seu interior, tant en el centre per on pugen ajudades per l'aeració, com en la zona de la paret, per on acostumen a precipitar-se cap al fons. Aquestes gràfiques permeten comparar l'evolució de la radiació PAR ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) dins dels fotobioreactors a mesura que els cultius d'algues van creixent.

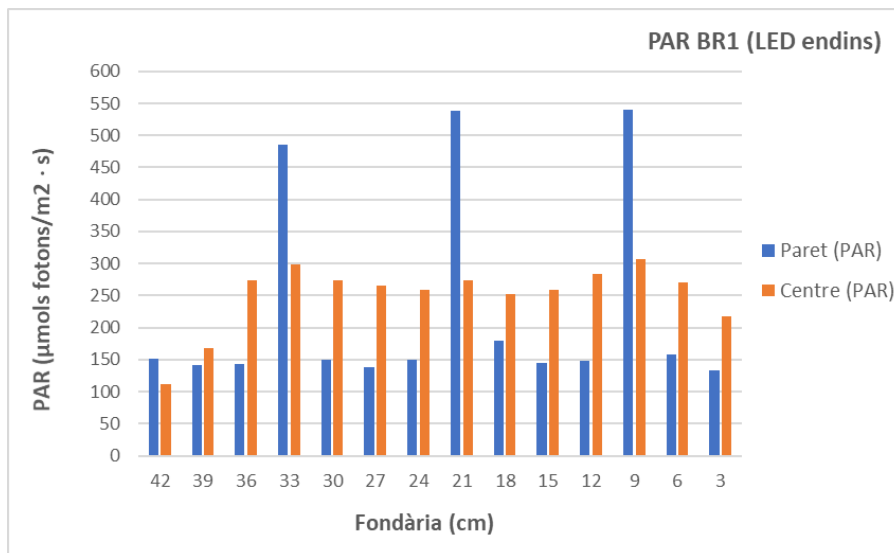


Fig 18: Distribució de la radiació PAR en el BR1 sense algues. Mesures fetes a la paret interior i al centre del bioreactor.

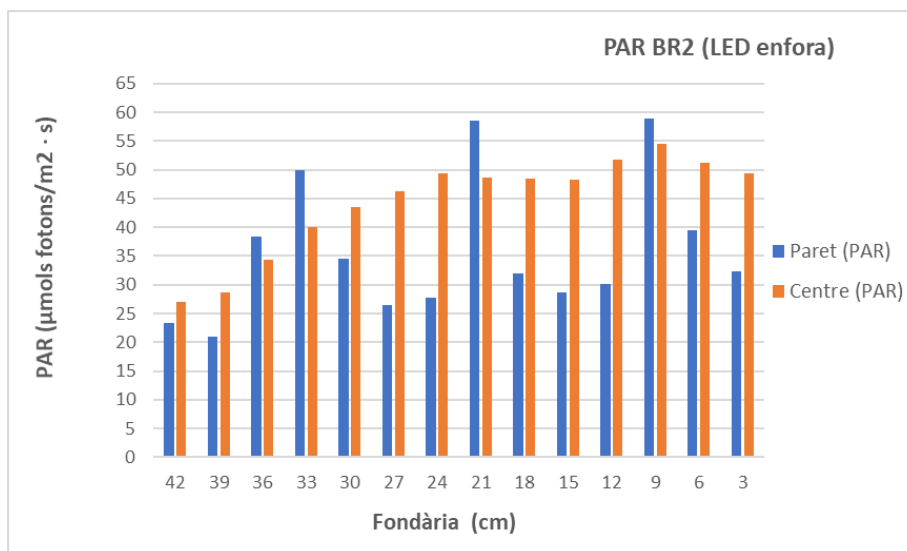


Fig 19: Distribució de la radiació PAR en el BR2 sense algues. Mesures fetes a la paret interior i al centre del bioreactor.

#### 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest projecte es van realitzar 5 cultius de durada entre 1 i 3 setmanes, 2 dels quals es van iniciar amb un pes de 2,00 g d'alga en cada fotobioreactor i, per als tres últims cultius, es va fer servir 4,00 g d'alga per al tanc BR1 (llums endins), i 2,00 g d'alga per al tanc BR2 (llums enfora). En les taules 2 i 3 es pot apreciar l'evolució del pes de les algues amb els respectius SGR (taxes de creixement) per ambdós cultius.

Taula 2: Evolució dels pesos dels cultius amb els respectius SGR pel BR1 (llums LED endins).

	BR1									
	cultiu 1		cultiu 2		cultiu 3		cultiu 4		cultiu 5	
	Pes 1 (g)	SGR 1 (%)	Pes 2 (g)	SGR 2 (%)	Pes 3 (g)	SGR 3 (%)	pes 4 (g)	SGR 4 (%)	pes 5 (g)	SGR 5 (%)
06/09/2021	2,00									
13/09/2021	15,00	28,79								
20/09/2021	29,30	9,56	2,00							
27/09/2021			13,65	27,44						
04/10/2021			13,22	-0,46						
11/10/2021			7,35	-8,38	4,00					
18/10/2021					4,00	0,00	4,00			
25/10/2021							26,65	27,09		
03/11/2021							29,21	1,02		
08/11/2021									4,00	
15/11/2021									20,70	23,48
22/11/2021									31,23	5,88
03/12/2021										

Taula 3: Evolució dels pesos dels cultius amb els respectius SGR pel BR2 (llums LED enfora).

	BR2									
	cultiu 1		cultiu 2		cultiu 3		cultiu 4		cultiu 5	
	Pes 1 (g)	SGR 1 (%)	Pes 2 (g)	SGR 2 (%)	Pes 3 (g)	SGR 3 (%)	pes 4 (g)	SGR 4 (%)	pes 5 (g)	SGR 5 (%)
06/09/2021	2,00									
13/09/2021	3,88	9,46								
20/09/2021	10,49	14,21	2,00							
27/09/2021			6,64	17,15						
04/10/2021			10,04	5,91						
11/10/2021			8,09	-3,09	2,00					
18/10/2021					2,00	0,00	2,00			
25/10/2021							2,95	5,54		
03/11/2021							2,59	-1,87		
08/11/2021									2,00	
15/11/2021									12,06	25,67
22/11/2021									16,10	4,13
03/12/2021									49,06	10,13

A continuació s'analitzen els resultats obtinguts durant els 5 cultius de la macroalga *Ulva ohnoi* en els dos fotobioreactors, cada un amb una configuració de llums LED diferent. S'avaluaran les taxes de creixement, els índex de contingut en clorofil·la i l'evolució de la radiació PAR pel quart i cinquè cultiu, amb la intenció d'estudiar quin efecte han tingut en el creixement de l'alga.

#### 4.1 Primer cultiu

El primer cultiu de fragments d'alga es va mantenir durant dues setmanes i, com es pot apreciar a la figura 20, es va aturar per culpa de la proliferació d'epífites (color lilós a l'aigua), petits organismes vegetals que es trobaven a l'aigua que circula pel circuit de tancs del laboratori o que romanien a sobre dels tal·lus d'*U. Ohnoi*, en el BR2 (LED enfocant cap enfora). Si observem les condicions d'aquest cultiu a la Taula 1, veiem que, a excepció de la temperatura, la resta de condicions van ser bones per al creixement dels dos cultius. Les temperatures lleugerament elevades respecte a la temperatura òptima de cultiu per a l'*Ulva ohnoi* (20 °C a 25 °C), tant al BR1 (25,7 ± 2,9 °C) com en el BR2 (25,9 ± 2,4 °C) van poder ser causades per a l'època de l'any en la que es va iniciar el cultiu i la temperatura del mateix laboratori.

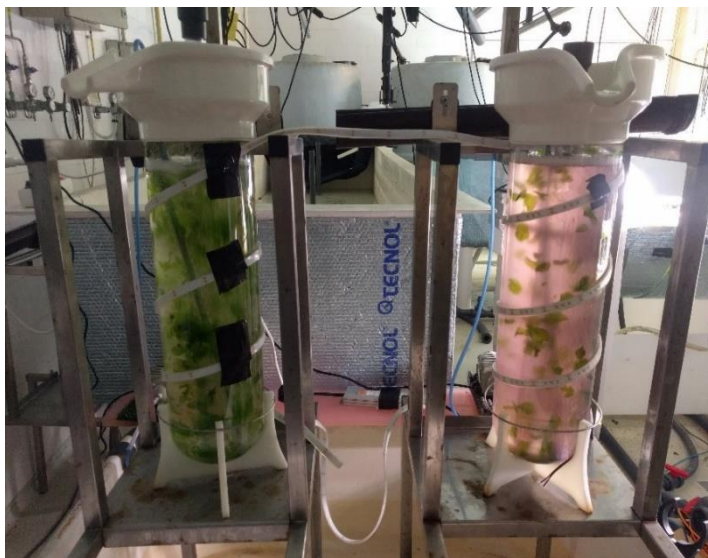


Fig 20: Biorreactors BR1 i BR2 al final del primer cultiu 17/09/21. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)

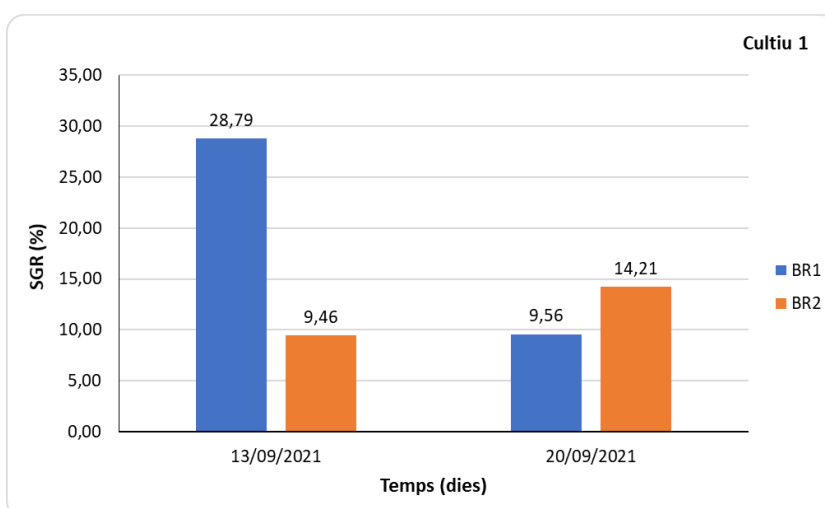


Fig 21: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el primer cultiu.



Observant la gràfica de les taxes de creixement per aquest cultiu (Fig. 21), veiem que durant la primera setmana, la biomassa del BR1 va experimentar un creixement del 28,8 %, passant de 2,00 g d'alga a l'inici del cultiu (06/09/21), a 15,00 g d'alga al cap de set dies (13/09/21). Per als fragments d'alga del BR2 es va obtenir un creixement molt més lent. Durant la primera setmana la biomassa va créixer un 9,5 %, passant de 2,00 g d'alga a 3,88 g. La biomassa del BR1 va experimentar un creixement del 9,6 % durant la segona setmana de cultiu arribant als 29,30 g i, el BR2, va incrementar la seva biomassa un 14,2 % passant de 3,88 g a 10,49 g.

El fet que en el BR2 proliferés una població d'epífites i en el BR1 no, pot ser a causa d'aquest elevat creixement. En el BR1, amb els llums LED enfocant cap endins, i tenint unes condicions de cultiu adequades (temperatura, pH, nutrients essencials), els fragments d'alga van experimentar bones condicions per créixer ràpidament, en canvi, en el BR2, també hi havia unes bones condicions, però sembla que, el fet de no rebre irradiància directa va suposar un creixement més lent durant la primera setmana i va permetre que part de l'excés de nutrients en el medi fos utilitzat per la població d'epífites. Per intentar frenar el creixement d'epífites es va renovar l'aigua del BR2 el mateix dia del primer pesatge de biomassa (13/09/21), fet que no va solucionar el problema, ja que, la següent setmana van continuar proliferant en el medi (Fig. 20). En la segona i última setmana de cultiu, tots dos biorreactors van veure incrementada la seva biomassa. Aquest cop, això no obstant, les algues del BR2 van experimentar un major creixement, fet que es pot relacionar amb que el BR1 rebia molta més llum i això produïa una reducció en el contingut en clorofil·la, que a la vegada permetia que augmentés la irradiància rebuda.

#### 4.1.1 Nivells de clorofil·la del primer cultiu

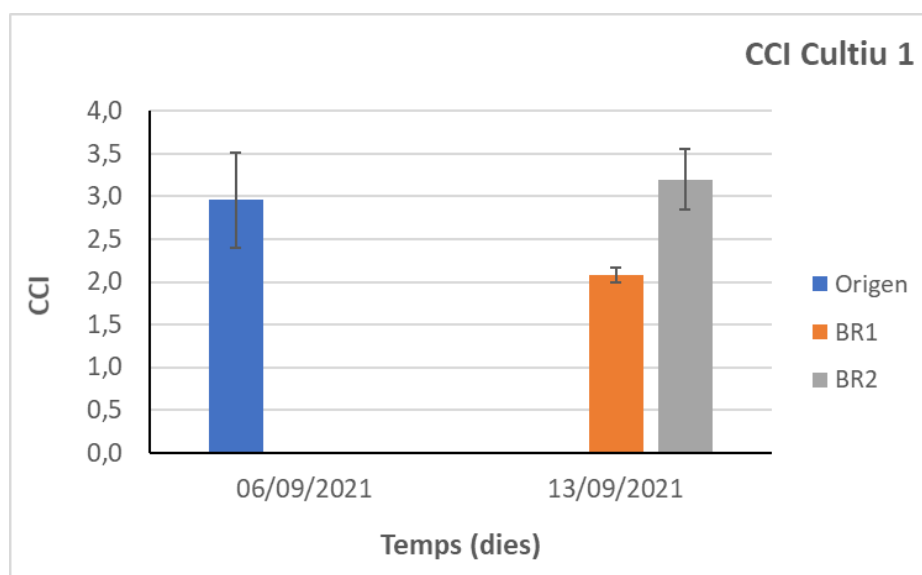


Fig 22: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) mitjà de cinc fragments d'alga d'ambdós biorreactors durant el primer cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

En aquesta gràfica (Fig. 22) es pot observar com la biomassa del BR1 va patir una reducció en el contingut en clorofil·la respecte al valor mitjà que van mostrar els fragments o tal·lus d'alga amb els que es va iniciar el cultiu. Els tal·lus "origen" extrets del tanc NA1 del laboratori van donar valors d'entre 2,5 CCI o 108  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  si ho expressem en unitats de clorofil·la total (equació 2), i fins a 3,9 CCI o 201  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , el primer dia de cultiu (06/09/21). En canvi, només passada una setmana, el contingut en clorofil·la mitjà del BR1, obtingut a partir de 5 fragments d'alga del bioreactor, va ser inferior al valor mitjà origen passant de 3 CCI a 2,1 CCI. Aquest decreixement en el contingut en clorofil·la pot explicar la davallada en el creixement de la biomassa del BR1 i també, el fet que la biomassa del BR2 seguís creixent a pesar de la proliferació d'epífites. L'elevat creixement de la primera setmana, juntament amb una temperatura lleugerament elevada i una prolongada i elevada irradiància respecte al BR2 podrien haver començat a malmetre l'aparell fotosintètic dels fragments d'alga del BR1, reduint el seu contingut en clorofil·la i, com a conseqüència, reduint la capacitat fotosintetitzadora i finalment afectant el creixement de la biomassa.

## 4.2 Segon cultiu

El segon cultiu d'algues va durar tres setmanes i el comportament va ser força semblant al que ens vam trobar durant el primer cultiu. Com es pot apreciar en la següent imatge (Fig. 23), en el BR2 hi van proliferar epífites novament. A partir d'aquest cultiu, es van buidar els dos bioreactors i es van netejar en profunditat per eliminar qualsevol rastre d'epífites que poguessin quedar al interior. A part, en el següents cultius es va rentar les algues que s'extreien dels tancs amb aigua destil·lada abans de tallar-les en discs, per tal de retirar i evitar noves proliferacions en els cultius quan s'hi afegien els fragments d'alga.



Fig 23: Bioreactors BR1 (esquerre) i BR2 (dreta) a la meitat del segon cultiu (01/10/21). Estat dels fragments d'alga (esquerre BR1, dreta BR2) al final del segon cultiu (11/10/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)



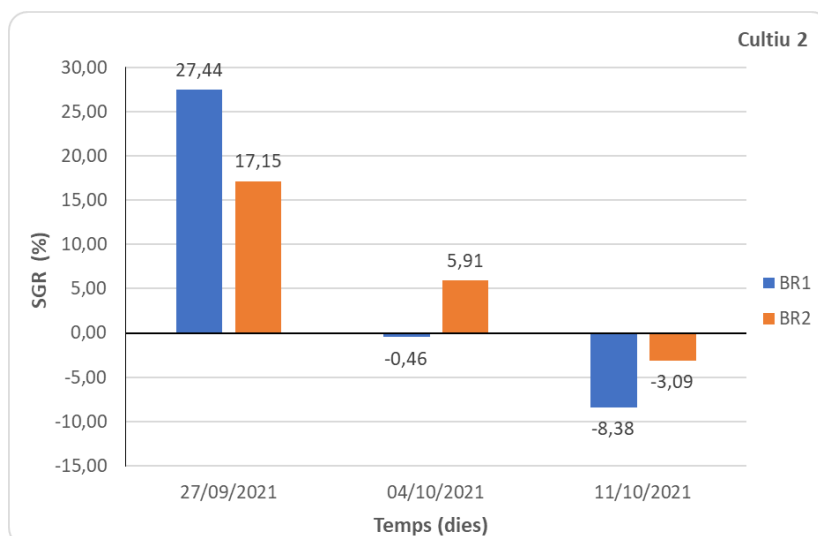


Fig 24: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el segon cultiu.

#### 4.2.1 Nivells de clorofil·la del segon cultiu

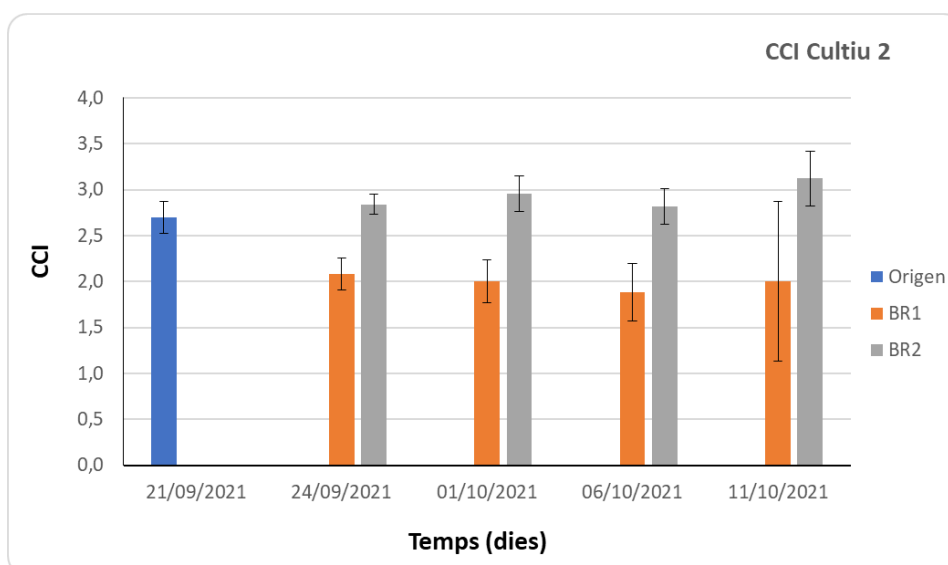


Fig 25: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) mitjà de cinc fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el segon cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

Com podem observar en la gràfica de creixement (Fig. 24), durant la primera setmana (20/09/21 a 27/09/21), en tots dos bioreactors hi va haver un increment de la biomassa i les condicions abiòtiques i ambientals van ser les adequades pel correcte creixement (Taula 1). En aquest cultiu van sorgir problemes relacionats amb un desajust en un dels paràmetres de creixement més importants, el pH. És rellevant comentar el desajust amb el pH, ja que juga un paper destacat sobre el fet d'apreciar creixements negatius durant la segona setmana pel BR1 i creixements negatius en els dos bioreactors durant la tercera i última setmana del segon cultiu.

Durant la segona setmana de cultiu, i possiblement, a causa de l'alta activitat fotosintètica i l'elevat creixement, el pH en el BR1 va arribar a ser superior a 9,90, i no va baixar de 8,64 durant tota la setmana, mentre que en el BR2 el pH es va mantenir durant tot el cultiu per sota de 8,40.

La fotosíntesi requereix carboni. En mars i oceans, el carboni és proporcionat pel  $\text{CO}_2$  quan es produeix la fotosíntesi. Com s'ha esmentat anteriorment, la difusió del  $\text{CO}_2$  a l'aigua és molt lenta, o almenys, més lenta del que suposa a les algues fixar el carboni per créixer. En l'ambient de laboratori, es proporciona l'hidrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), ja que és la forma més accessible i la que predomina a pH òptims pel creixement de *Ulva ohnoi*, d'entre les diferents formes del carboni inorgànic a diferents pH.

Com que el BR1 va experimentar un ràpid creixement i durant la segona setmana el pH va ser molt elevat, un dels possibles factors va ser l'esgotament d'hidrogencarbonat en el medi. El fet de disposar de les llums LED enfocant cap endins i rebre una irradiància molt superior a la del BR2, va permetre a les algues créixer molt ràpidament fent que augmentés el pH i indicant que l'equilibri d'hidrogencarbonat es va desplaçar cap a la dreta, és a dir, cap a pH més bàsics on la forma predominant passa a ser l'anió carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), el qual no pot ser utilitzat com a font de carboni per les algues.

La biomassa del BR2 va disminuir durant la tercera setmana de cultiu (del 04/10/21 a 11/10/21), experimentant un creixement negatiu (Fig. 24). Durant aquesta última setmana i pel fet d'haver canviat l'aigua dels bioreactors durant el pesatge de biomassa, amb aigua del tanc d'expansió, es va produir un desajust en el pH tant al BR1 com al BR2. El pH durant aquesta última setmana per ambdós bioreactors va estar sobre els 5,70 i 6,30, valors per sota del rang òptim de pH pel creixement de *U. Ohnoi*.

L'impossibilitat per fixar carboni i una continuada exposició lumínica, van produir una mort cel·lular ja durant la segona setmana de cultiu en el BR1. En l'anterior imatge (Fig. 23) s'aprecia l'aspecte de certs fragments d'alga d'aquest bioreactor. Molts dels fragments van perdre la totalitat de la seva clorofil·la i van adquirir un color translúcid, a part, eren molt fràgils al tacte. Les mesures amb el sensor òptic *MC-100 Chlorophyll Concentration Meter* van donar, en alguns casos, 1 CCI, la mesura més baixa que pot mesurar aquest sensor.

Respecte al contingut en clorofil·la (Fig. 25), observem el mateix que en l'anterior cultiu. En el BR1 els nivells de clorofil·la van disminuir al llarg de les tres setmanes, respecte al contingut que disposaven els fragments "origen" utilitzats. En canvi, el contingut en clorofil·la dels fragments del BR2, ja durant la primera setmana de cultiu, va ser superior al que es va mesurar a l'inici del cultiu.

A partir d'aquesta gràfica i l'obtinguda al primer cultiu (Fig. 22), podem relacionar el fet que, a més llum en el bioreactor s'observa menys clorofil·la, en canvi, quant la radiació és menor, s'observa

més clorofil·la en el cultiu. La clorofil·la del BR1 (llums LED enfocant endins) disminueix la primera setmana i al BR2 (llums LED enfocant enfora) augmenta, per tant, sembla que durant la primera setmana de cada cultiu hi havia una aclimatació per part de l'alga a la quantitat de llum que rep.

### 4.3 Tercer cultiu

A partir del tercer cultiu es va decidir augmentar el pes total de fragments d'alga en el BR1 de 2 g a 4 g, sobretot, veient l'aspecte i condicions que van adquirir les algues en els dos anteriors cultius per aquest bioreactor. Per aquest cultiu no es van obtenir resultats a causa del desajust en el pH que va sorgir durant l'última setmana del segon cultiu i que va ser present durant la setmana que va durar aquest cultiu (11/10/21 fins a 15/10/21). En aquest tercer cultiu sí que es van realitzar mesures de la Radiació PAR, però que no seran comentades pel fet que les algues no van experimentar cap mena de creixement. En les següents taules (Taula 4, Taula 5), es poden apreciar les condicions dels dos bioreactors per aquest cultiu.

Taula 4: Condicions del BR1 durant el tercer cultiu

	BR1 (llums LED endins)						
	Temperatura (°C)	O2 (mg/l)	O2 (%)	pH	Alcalinitat (mg CaCO3/L)	Nitrats (mg N-NO3/L)	Fosfats (mg P/L)
11/10/2021	23,0	7,95	99,10	6,35			
12/10/2021	-	-	-	-			
13/10/2021	22,6	7,27	99,20	6,35			
14/10/2021	23,5	7,50	100,40	6,39			
15/10/2021	22,2	7,23	97,40	6,39	52,75	37,07	1,78

Taula 5: Condicions del BR2 durant el tercer cultiu

	BR2 (llums LED enfora)						
	Temperatura (°C)	O2 (mg/l)	O2 (%)	pH	Alcalinitat (mg CaCO3/L)	Nitrats (mg N-NO3/L)	Fosfats (mg P/L)
11/10/2021	23,0	7,24	98,00	6,26			
12/10/2021	-	-	-	-			
13/10/2021	23,0	7,21	98,10	6,12			
14/10/2021	23,2	7,00	96,00	6,20			
15/10/2021	22,0	7,13	96,00	6,25	63,31	32,75	1,74

Com es pot apreciar en ambdues taules, les condicions d'aquest cultiu pels dos fotobioreactors van ser bones, a excepció del pH i l'alcalinitat. El desajust en el pH va donar-se en el tanc d'expansió a partir del qual es reomplen els bioreactors. Així com hi ha un cabal d'entrada constant d'àcid clorhídric, es va haver de proporcionar setmanalment hidrogencarbonat de sodi al tanc d'expansió per tal de corregir el pH, i per evitar tenir el mateix problema en els següents cultius.

#### 4.4 Quart cultiu

El quart cultiu va tenir una durada de 3 setmanes, en les quals, ja es va poder mesurar la radiació PAR (radiació fotosintèticament activa), dels dos fotobioreactors (Fig. 26, Fig. 27). Aquest cultiu es va iniciar amb 4,00 g d'algues en el BR1 i 2,00 g d'algues en el BR2. L'increment de la densitat de fragments d'alga en el BR1 es va dur a terme amb l'objectiu d'intentar disminuir la quantitat d'irradiància que aquestes rebien i per poder veure l'efecte de la densitat de cultiu en el creixement.

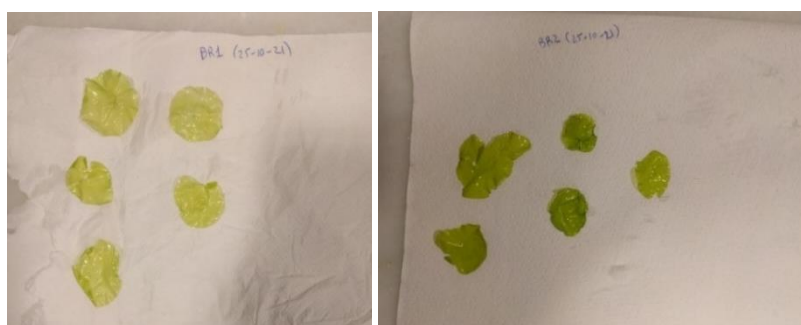


Fig 26: Bioreactors BR1 (esquerre) i BR2 (dreta) a la meitat del quart cultiu (25/10/21). Estat dels fragments d'alga a la meitat del quart cultiu (25/10/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)



Fig 27: Estat dels fragments d'alga al final del quart cultiu (03/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)

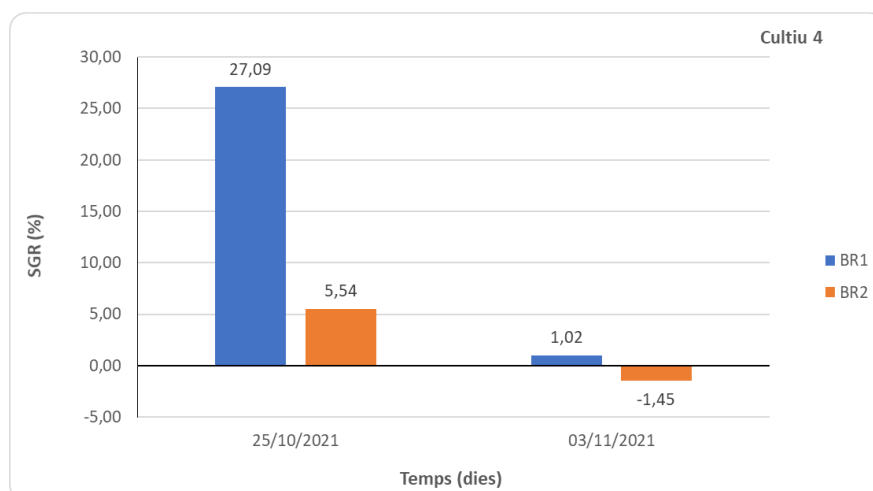


Fig 28: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el quart cultiu.

El creixement durant la primera setmana (Fig. 28) va ser molt elevat pel BR1, que va experimentar un augment de biomassa del 27,1 %, arribant als 26,65 g, però durant la tercera i última setmana només va créixer un 1 %. En canvi, en aquest cultiu, la biomassa del BR2 no va aconseguir créixer i es va produir mort cel·lular al final d'aquest.

#### 4.4.1 Nivells de clorofil·la del quart cultiu

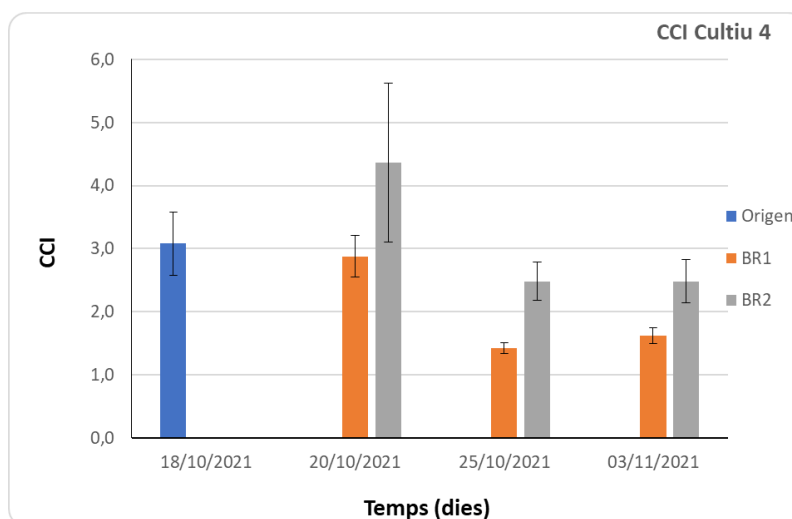


Fig 29: Representació gràfica de l'evolució dels índex de contingut en clorofil·la (CCI) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el quart cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

Respecte a l'índex de contingut en clorofil·la, destacar que les mesures realitzades el dia 20/10/2021 van presentar un error. El valor mitjà tan elevat pel BR2 és a causa d'un error en la utilització del sensor òptic. A l'hora de mesurar el contingut de clorofil·la d'alguns dels fragments, és possible que aquest presentessin algun plegament que va fer augmentar aquest valor.

Més enllà d'aquest valor atípic, també mostra com els nivells de clorofil·la en el BR1 són molt baixos en comparació al BR2, com ja es va poder apreciar en els cultius anteriors. Una possible explicació a aquest fet pot ser el poc creixement i una continuada i elevada exposició lumínica que va malmetre l'aparell fotosintètic dels fragments d'alga.

Observant tant les imatges dels fragments d'alga (Fig. 26, Fig. 27), i la gràfica on es representa el contingut en clorofil·la (Fig. 29), veiem que els creixements tan baixos es deuen a una pèrdua de clorofil·la. A simple vista es pot apreciar com els fragments d'alga del BR1, ja durant la segona setmana (25/10/21), van perdre gran part de la seva coloració i com, durant l'última setmana (03/11/21), els fragments es van tornar molt fràgils, inclús per ser estesos sobre un paper per ser fotografiats. Pel que fa al BR2, a principis de la segona setmana de cultiu pràcticament molts dels fragments d'alga no van experimentar creixement (Fig. 26), i que, durant l'última setmana de cultiu, els fragments van mostrar una textura fràgil i s'hi van generar epífites en la seva superfície (punts foscos a sobre dels fragments d'alga, Fig. 27). Aquest reduït creixement també va ser causat pel pH. Durant les tres setmanes de cultius, el pH del BR1 va estar per sobre de 8,64 arribant a valors de 9,68 en algunes mesures, i pel BR2 es van mesurar valors per sobre dels 8,45 de pH, al límit del qual seria el pH òptim de creixement per aquesta espècie. Aquest fet implica que ambdues poblacions d'algues no van ser capaces de fixar carboni pel seu creixement a través de la fotosíntesi.

#### 4.4.2 Evolució de la radiació PAR del quart cultiu

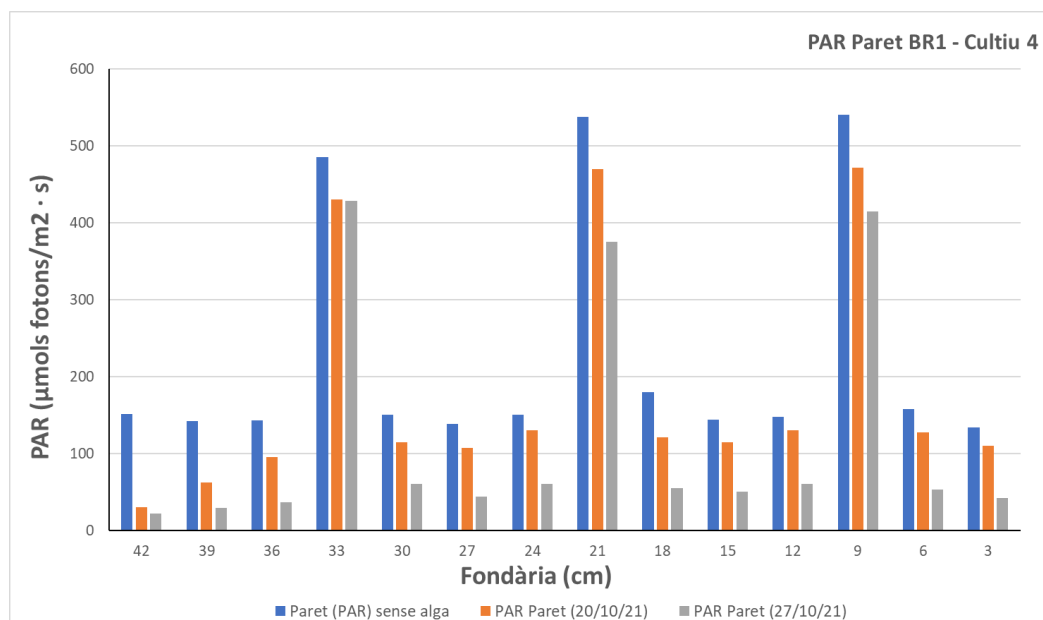


Fig 30: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el quart cultiu.

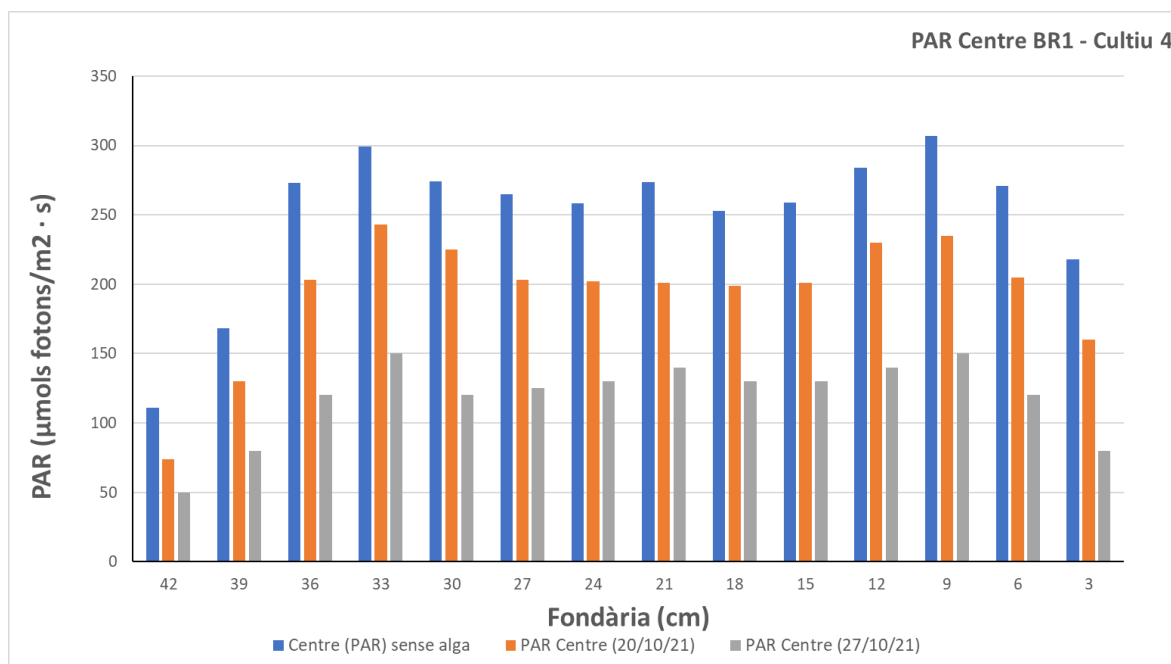


Fig 31: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el quart cultiu.

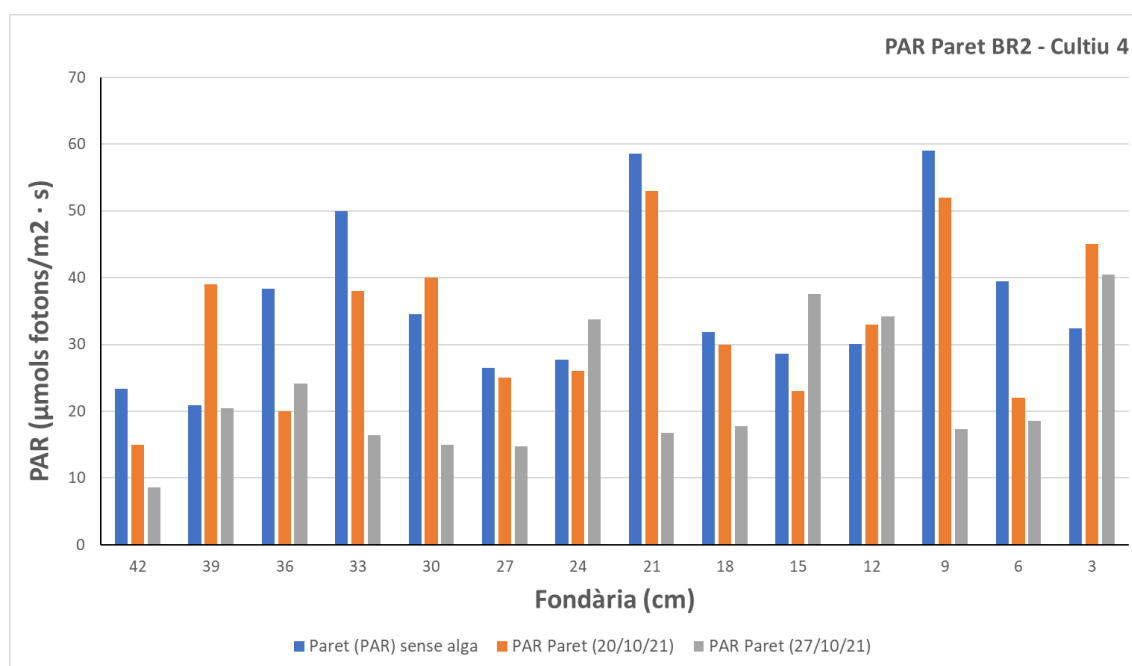


Fig 32: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR2 (LED enfocant cap enfora) durant el quart cultiu.

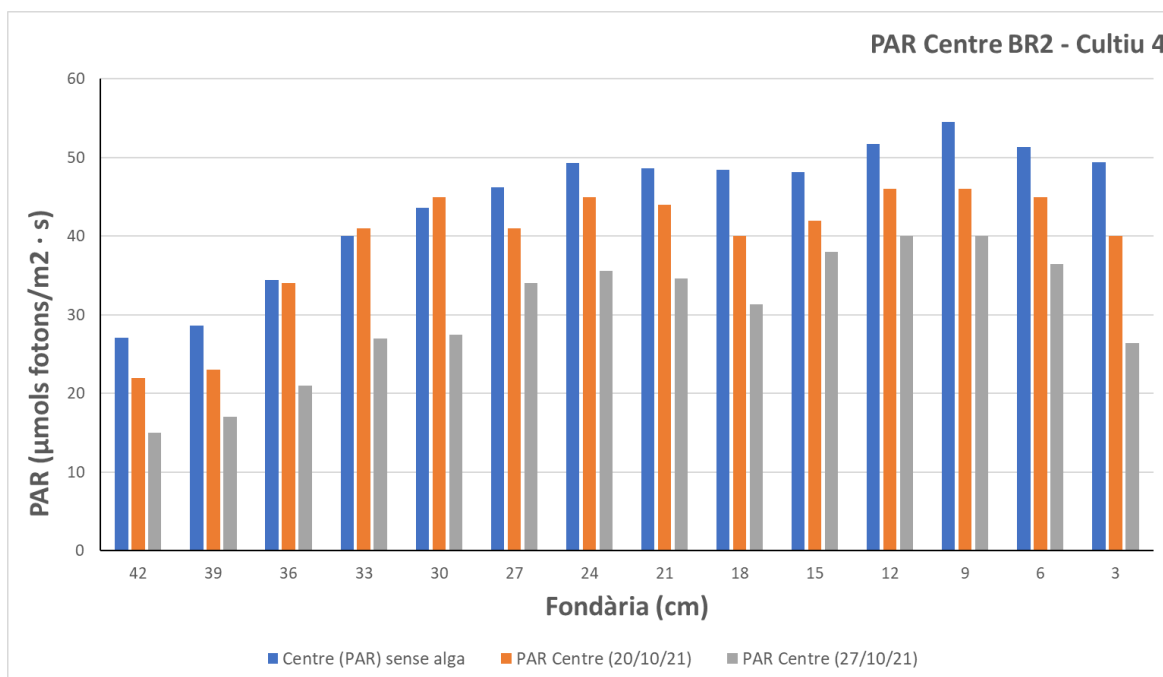


Fig 33: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap enfora) durant el quart cultiu.

En el quart cultiu es va mesurar l'evolució de la radiació PAR dels dos bioreactors. Les quatre gràfiques anteriors (Fig. 30, 31, 32 i 33) mostren com, a mesura que les poblacions d'algues augmenten la seva biomassa, la radiació que reben és menor a causa de l'efecte d'auto-ombreig.

Les figures 30 i 31 representen l'evolució de la radiació PAR durant el quart cultiu pel BR1 i les figures 32 i 33 pel BR2. Observant aquestes gràfiques veiem que les algues del BR1 van rebre, generalment una irradiància superior a les del BR2. El dia 27/10/21, el valor mitjà de les mesures que es van realitzar al quart cultiu van ser de  $(118,9 \pm 29,1) \mu\text{mols fotons/m}^2 \cdot \text{s}$  en el punt central del BR1 i de  $(30,3 \pm 8,2) \mu\text{mols fotons/m}^2 \cdot \text{s}$  en el punt centrals del BR2. Clarament, en tots els cultius, els fragments d'alga del BR1 van rebre una irradiància superior, això pot explicar el perquè de la pèrdua més gran de clorofil·la (Fig. 26, Fig. 35), com també el fet que durant la primera setmana de cultiu, en tots els cultius, mostrés un creixement molt elevat, però que, un cop passada aquesta primera setmana (i degut a una pèrdua de clorofil·la com a conseqüència de l'alta irradiància rebuda), presentés un creixement molt reduït i mort cel·lular (Fig. 23) abans que el BR2.

A partir de les dues gràfiques que mostren l'evolució de la radiació PAR al centre dels dos bioreactors (Fig. 31, Fig. 33), podem apreciar com, a mesura que augmenta la biomassa aquests valors són menors, donat que hi ha més biomassa, i per tant, més auto-ombreig. També queda demostrat pel fet que les radiacions, en la majoria de casos, van ser inferiors als valors obtinguts quan no hi havia algues en l'interior dels dos tancs.

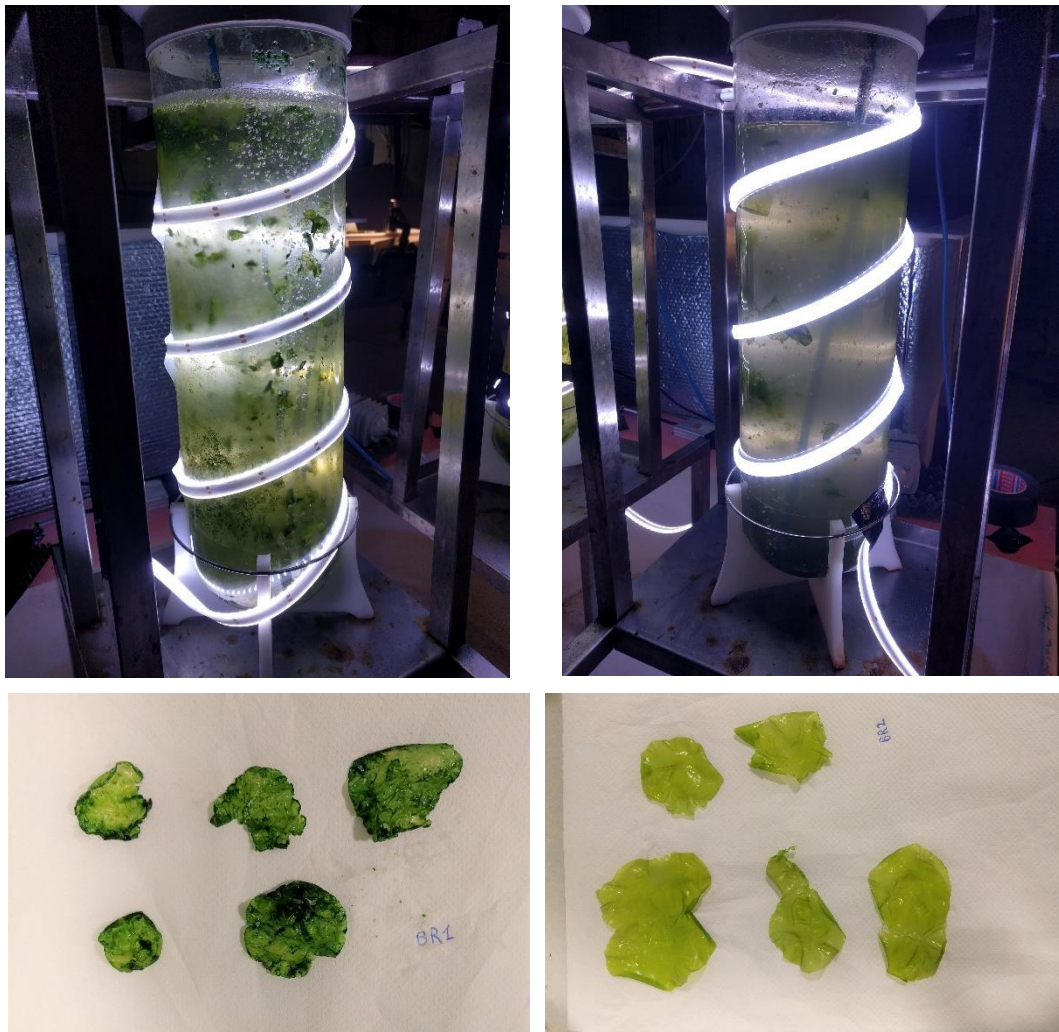
Pel que fa a les mesures realitzades a la paret dels bioreactors, veiem que, a les zones on estaven col·locades les llums LED (33 cm, 21 cm i 9 cm de fondària) la irradiància era molt superior a les zones que queden entremig. Observant les quatre gràfiques, podem dir que, pel BR1, a excepció de les fondàries on trobàvem les llums LED, les algues rebien més llum quan pujaven pel centre dels bioreactors ajudats per l'aeració, que quan baixaven pels laterals.



#### 4.5 Cinquè cultiu



*Fig 34: Bioreactors BR1 (esquerra) i BR2 (dreta) a l'inici de la segona setmana del cinquè cultiu (15/11/21). Estat dels fragments d'alga al inici de la segona setmana del cinquè cultiu (15/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Gaus, EEABB, 2021)*



*Fig 35: Bioreactors BR1 i BR2 a l'inici de la tercera setmana del cinquè cultiu (22/11/21). Estat dels fragments d'alga al inici de la tercera setmana del cinquè cultiu (22/11/21). (Fotografia realitzades per Gerard del Àlamo Guaus, EEABB, 2021)*



Fig 36: Bioreactors BR1(esquerre) i BR2 (dreta) al final del cinquè cultiu (03/12/21). Estat dels fragments d'alga del BR2 al final del cultiu. (Fotografia realitzades per Gerard del Álamo Guaus, EEABB, 2021)

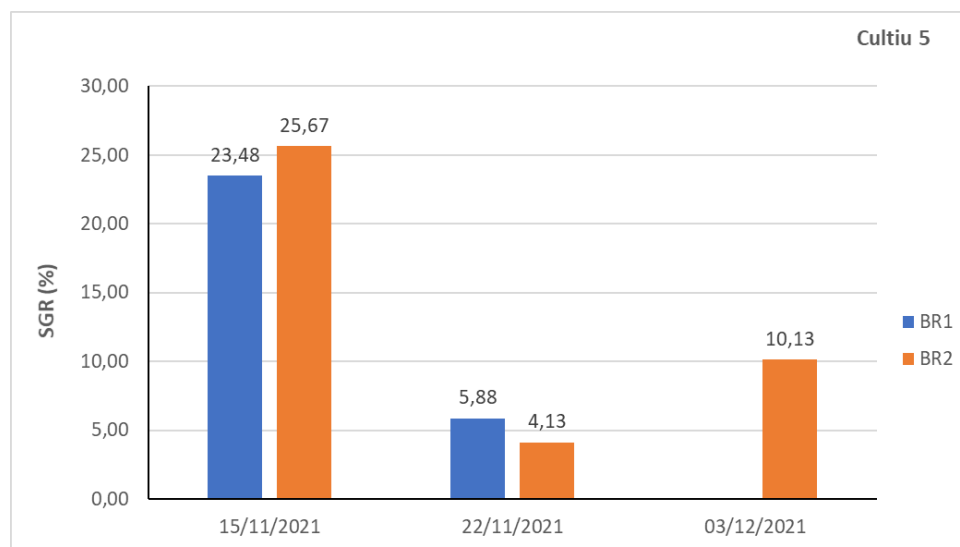


Fig 37: Representació gràfica de la taxa de creixement (SGR) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el cinquè cultiu.



#### 4.5.1 Nivells de clorofil·la del cinquè cultiu

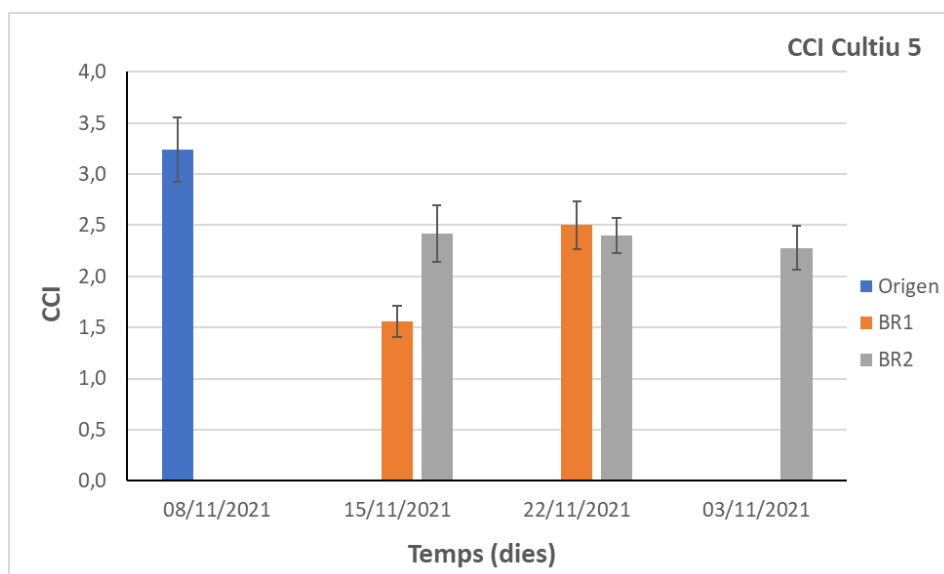


Fig 38: Representació gràfica de l'evolució del índex de contingut en clorofil·la (CCI) dels fragments d'alga d'ambdós bioreactors durant el cinquè cultiu. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

El cinquè i últim cultiu va tenir una durada de 4 setmanes. Ja des de la primera setmana es va apreciar pH molt elevats en el BR1, sobrepasant valors de 10 en alguns casos, i per sobre de 8,5 en el BR2 (Taula 1). Com s'ha comentat anteriorment, valors tan elevats per aquest paràmetre impliquen una dificultat de fixar carboni, i com a conseqüència, de créixer, per això si s'observa la gràfica de les taxes de creixement (Fig. 37), veiem un creixement molt elevat durant la primera setmana i creixements molt menors les següents setmanes.

Les anteriors imatges (Fig. 34, 35, 36) mostren l'estat dels fragments d'alga a durant tot el cinquè cultiu. Com es pot apreciar, els fragments d'alga del BR1 tenen un aspecte fràgil ja després de la primera setmana (Fig. 34), i mostren una clara pèrdua de clorofil·la pel color i per l'índex de contingut en clorofil·la mesurat durant aquella setmana (Fig. 38).

A l'inici de la tercera setmana veiem que (Fig. 35), pràcticament, s'ha produït la mort cel·lular dels fragments d'alga del BR1 a conseqüència d'un pH molt elevat i de l'elevada irradiància a les que es veien sotmesos els petits fragments d'alga. Observant la gràfica de l'índex de contingut en clorofil·la (Fig 38), per a aquesta setmana, es va obtenir valors superiors als obtinguts durant la segona setmana, 2,4 CCI ( $108,14 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) per al BR1 la setmana del 22/11/2021 i 1,6 CCI ( $45,60 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) la setmana del 15/11/2021. Havent patit mort cel·lular i veient l'aspecte dels fragments d'alga no hauria de ser possible, però aquest fet es deu a la formació d'epífites a sobre la seva superfície. A causa de les condicions que va mostrar el BR1 al final de la tercera setmana, es va decidir obviar en les mesures de la quarta i última setmana del cultiu.

Durant la quarta setmana la biomassa del BR2 va seguir creixent (Fig. 37), tot i tenir un pH per sobre 8,5, fins i tot arribant a valors de 9,0 de pH. El fet que aquests fragments no veiessin reduït el seu contingut en clorofil·la (Fig. 38) i que la biomassa seguís creixent, demostra que, el fet de tenir una irradiància menor, gràcies a tenir les llums LED enfocant cap enfora, va ajudar que no es produís fotoinhibició i una posterior mort cel·lular com va succeir amb els fragments del BR1.

En la figura 36 s'aprecien els fragments d'alga del BR2 al final del cultiu, sent els fragments que més van créixer d'entre els cinc cultius realitzats. A part, també es pot veure com les algues romanien en la part superior del bioreactor a conseqüència d'una falta de volum i una aeració que ja no era prou potent com per "arrossegar" les algues.

#### 4.5.2 Evolució de la radiació PAR del cinquè cultiu

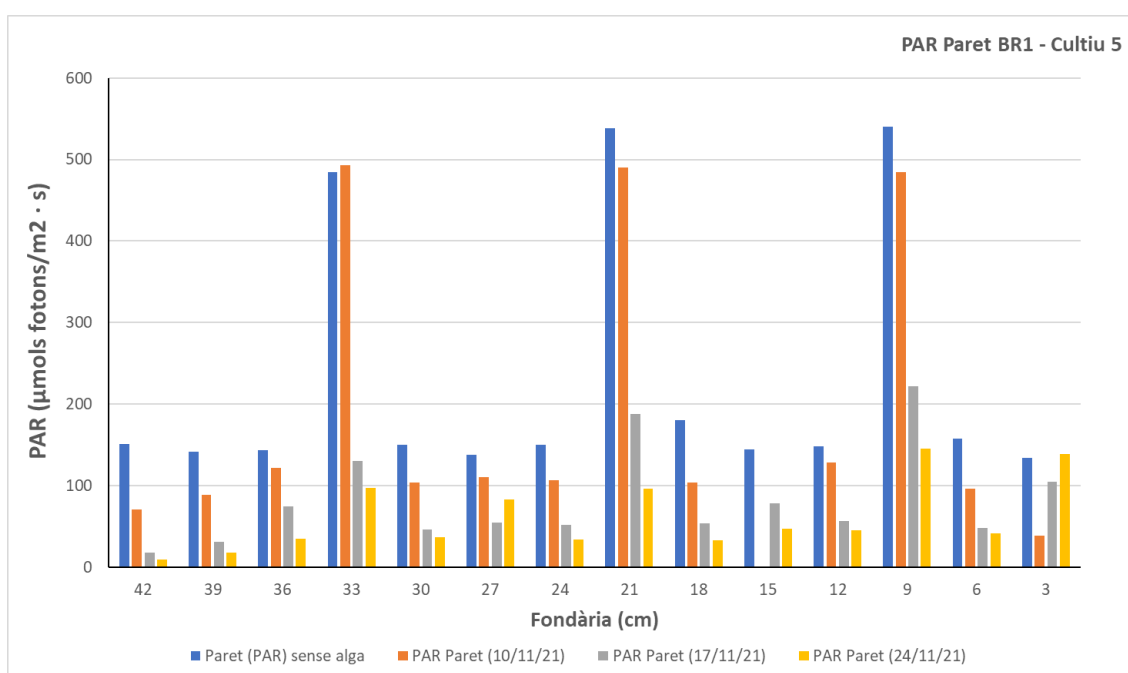


Fig 39: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el cinquè cultiu.

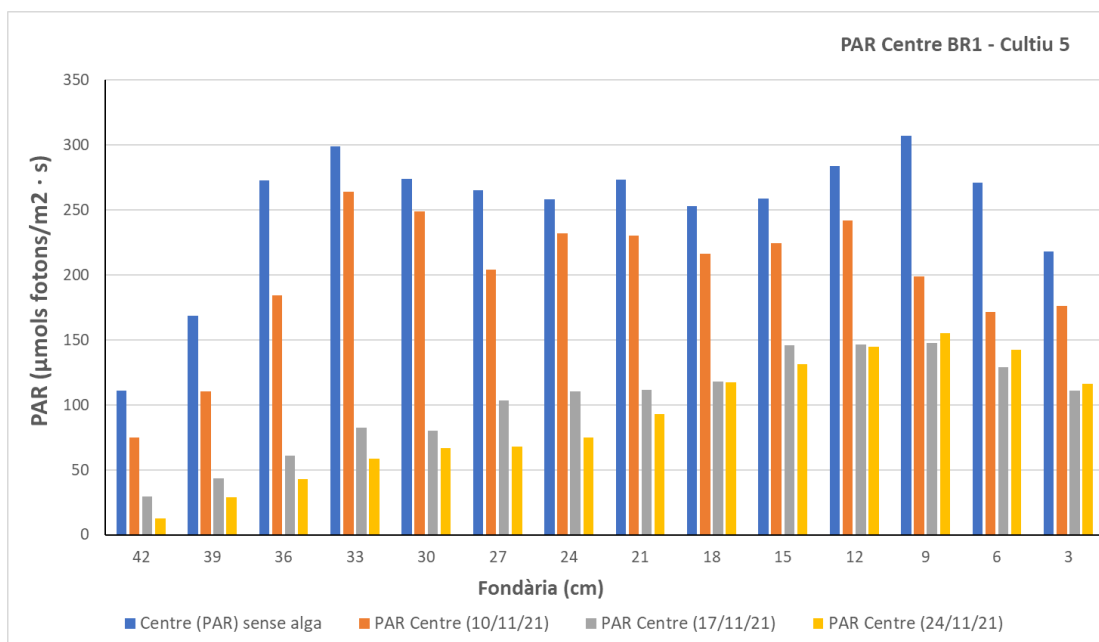


Fig 40: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap endins) durant el cinquè cultiu.

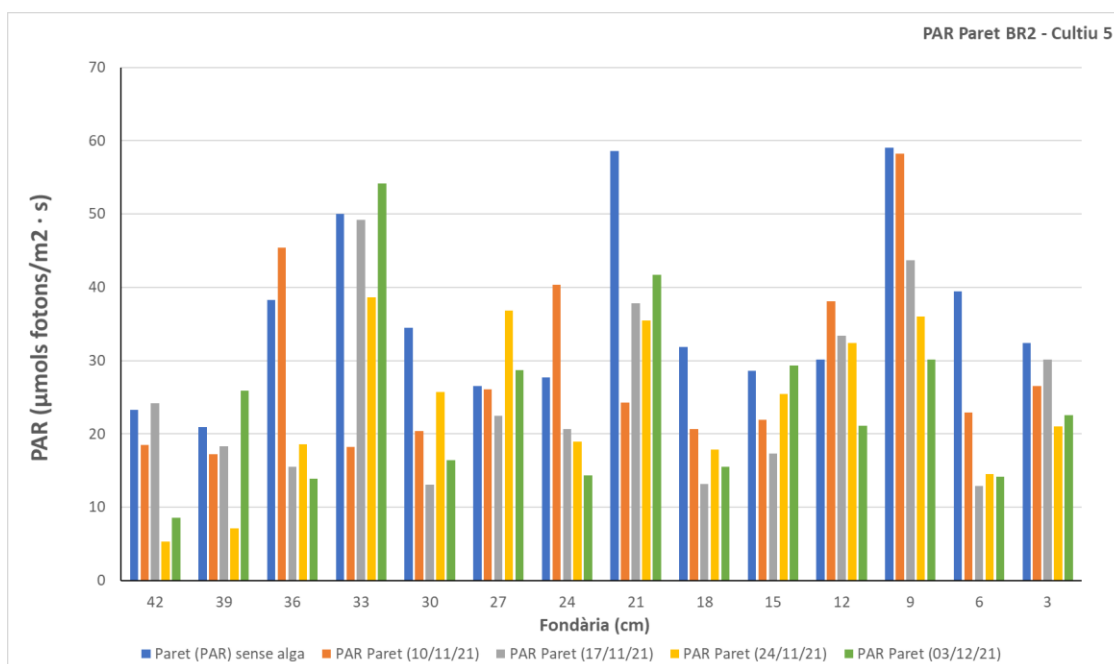


Fig 41: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (paret) del BR2 (LED enfocant cap enfora) durant el cinquè cultiu.

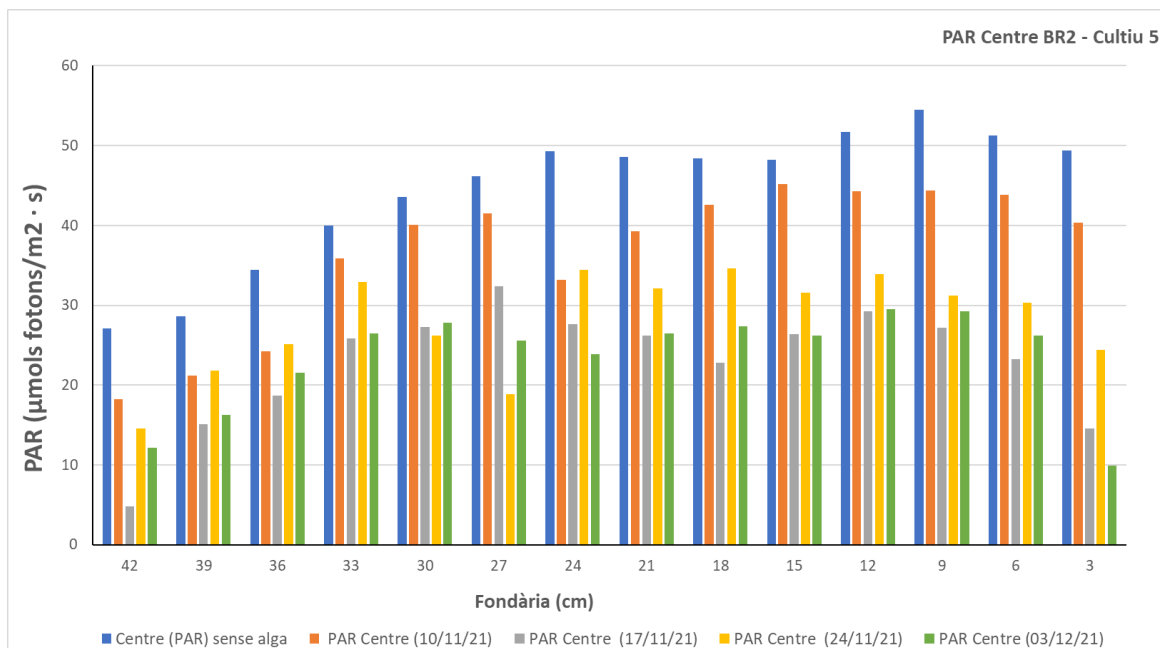


Fig 42: Representació gràfica de l'evolució de la radiació PAR a l'interior (centre) del BR1 (LED enfocant cap enfora) durant el cinquè cultiu.

L'evolució de la radiació PAR tant a les parets com al centre (Fig. 39 - 42) d'ambdós bioreactors va seguir el mateix comportament que s'aprecia al quart cultiu. A mesura que la biomassa dels bioreactors anava augmentant (Taules 2, 3) s'observa una menor radiació PAR a l'interior dels tancs com a conseqüència de l'efecte d'auto-ombreig entre les algues. Comparant les gràfiques de la radiació incident al centre dels bioreactors (Fig. 40, Fig. 42) veiem que la radiació PAR va ser força superior a gairebé totes les fondàries, superant el  $100 \mu\text{mols fotons}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  en el BR1, mentre que pel BR2 no es va apreciar radiacions superiors a  $40 \mu\text{mols fotons}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  (només durant la primera setmana de cultiu, i en cap cas va ser superior a  $50 \mu\text{mols fotons}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ). Aquest resultat podria indicar el perquè de la mort cel·lular i la pèrdua de clorofil·la que es va produir al BR1.

#### 4.6 Discussió conjunta dels resultats

Els resultats obtinguts en cada un dels cinc cultius realitzats en aquest treball han estat determinats per l'evolució dels paràmetres durant les diferents setmanes de cultiu. És important comparar aquests paràmetres de cultiu amb els que s'han obtingut en altres estudis per a l'alga *Ulva ohnoi*. Anteriorment, hem comentat que era rellevant no superar valors de pH per sobre de 8,5, en un estudi (Oca et al., 2019) el valor mitjà obtingut va ser de  $8,24 \pm 0,35$  pel pH i van presenciar taxes de creixement positives. Com es pot comprovar a la taula 1, els resultats obtinguts durant els diferents cultius han sigut, generalment, bastant més elevats, fent que el creixement no hagi sigut bo en la majoria de casos, després de la primera setmana de cultiu. Pel que fa a la temperatura, en aquest mateix estudi, van obtenir un valor de  $20,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$ , certament inferior a les temperatures que s'han obtingut en tots els cultius. Això es pot deure al fet que els dos biorreactors són força petits i són propensos a escalfar-se per culpa de la temperatura ambient del laboratori, i perquè disposaven



dels llums LED a sobre la seva superfície irradiant durant moltes hores del dia. A part, també parlen de les concentracions de nutrients essencials. La mitjana de  $\text{N-NO}_3^-$  i  $\text{P-PO}_4^{3-}$  van ser respectivament de  $21,7 \pm 2,5$  mg/L i  $0,59 \pm 0,088$  mg/L. Comparant amb la taula 3, veiem que pel BR1 hi ha concentracions de fosfats molt més baixes en el primer i cinquè cultiu (0,07 i 0,17 respectivament), probablement per l'alta activitat fotosintètica i l'alt requeriment de micronutrients necessaris pel correcte creixement. Finalment, també aconsellen tenir valors d'alcalinitat per sobre dels 100 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ . Com es pot apreciar en la taula 1, en el tercer cultiu aquesta concentració es troba molt per sota d'aquest valor i, juntament amb el pH, no van permetre experimentar cap mena de creixement en aquest cultiu.

Respecte a la llum incident dintre dels bioreactors, en un estudi (Rorrer & Cheney, 2004), comenten que la fotoinhibició és observada en moltes macroalgues a intensitats lumíniques per sobre dels 500  $\mu\text{mols fotons/m}^2\cdot\text{s}$ . També indica que les suspensions de macroalgues són cultivades en fotobioreactors a intensitats de llum de 200  $\mu\text{mols fotons/m}^2\cdot\text{s}$ , molt per sota del llindar de fotoinhibició.

En els cultius realitzats durant aquest estudi, pel BR1 (llums LED enfocant cap endins), en el centre del bioreactor s'ha apreciat radiacions PAR entre els 200 a 250  $\mu\text{mols fotons/m}^2\cdot\text{s}$  durant la primera setmana de cultiu (Fig. 31 pel quart cultiu, Fig. 42 pel cinquè cultiu). A diferència del que es va obtenir en l'estudi (Rorrer & Cheney, 2004), a aquests nivells de radiació ja es va originar la mort cel·lular, la pèrdua de clorofil·la i reducció en el creixement després de la primera setmana de cultiu tant en el BR1 com en el BR2. Atenent a aquest resultat, es podria suposar que hi ha hagut fotoinhibició en els bioreactors del present estudi.

## 5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball i la discussió realitzada a partir de la recerca bibliogràfica, s'extreuen les següents conclusions.

S'ha estudiat la taxa de creixement (SGR, Specific Growth Rate) dels fragments d'alga d'*Ulva ohnoi* i s'ha apreciat que el creixement s'ha vist afectat tant per les condicions de cultiu, especialment per efectes del pH, com per la incidència de llum que arribava a cada un dels bioreactors. Tenint en compte l'augment del pH en el medi, i com ha afectat en el creixement de les algues, cal destacar la importància de mantenir unes condicions idònies en ambdós fotobioreactors, d'aquesta manera es podria evitar problemes de fixació de carboni, pèrdues de clorofil·la i problemes en el creixement de la biomassa.

A partir de determinar el contingut de clorofil·la en els fragments d'alga, s'ha pogut determinar que, a cada un dels bioreactors (BR1 i BR2), les algues han adaptat els seus nivells de clorofil·la depenent de la intensitat lumínica que rebien. El procés per adaptar-se al medi l'han dut a terme durant la primera setmana de cultiu. En tots els cultius s'ha vist que, en el bioreactor amb les llums LED enfocant cap endins, els índex de clorofil·la han estat menors que en el bioreactor amb les llums LED enfocant cap enfora. La reducció del contingut en clorofil·la en el BR1, juntament amb pH elevats, ha suposat la mort cel·lular d'aquest cultiu, o han fet disminuir el creixement considerablement després de la primera setmana de cultiu.

La determinació de la radiació PAR dins els fotobioreactors ha permès apreciar que en el BR1 (llums LED enfocant cap endins), hi ha hagut intensitats de llum incident superiors a  $200 \mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$ , en el centre del bioreactor durant la primera setmana de cultiu, en canvi, en el BR2 aquest valor amb prou feines ha arribat als  $40 \mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$ . Aquesta diferència en la intensitat lumínica que han rebut ambdós bioreactors ha resultat en un creixement durant la primera setmana, generalment, molt elevat en el BR1, arribant a increments de la biomassa per sobre del 25 %. En canvi, en el BR2 (llums LED enfocant cap enfora), a excepció del cinquè cultiu, la biomassa ha experimentat creixement més lent, però més progressiu al llarg del temps.

Per concloure aquest treball, cal remarcar el fet que, amb una configuració lumínica com la del BR2 s'ha aconseguit creixements més lents al llarg del temps, però també cultius molt més sans, amb un major índex de clorofil·la i uns fragments d'alga més consistents que els que es van obtenir amb la configuració lumínica del BR1.

## 6. PERSPECTIVA PER FUTURS ESTUDIS

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquest treball, per a futurs estudis relacionats amb el creixement de l'alga *Ulva ohnoi* en fotobioreactors, es podrien tenir en compte els punts que es detallen a continuació.

Primer de tot, caldria destacar el fet de mantenir unes condicions de cultiu idònies en els bioreactors, ja que és la base perquè es produeixi un creixement adequat. Com s'ha vist en aquest treball, han sorgit força problemes amb el pH, sobretot per la mateixa acció fotosintètica de les algues. Per tal de reduir l'efecte negatiu que té aquest paràmetre, es podria fer un control setmanal afegint àcid clorhídric i hidrogencarbonat de sodi al medi d'ambdós bioreactors per tal de tenir aquest paràmetre sota control.

Respecte a la disposició dels llums LED, s'ha vist que, en el BR1, el qual tenia els llums LED enfocant cap a l'interior, ha permès a les algues créixer molt durant la primera setmana, però s'ha apreciat mort cel·lular i disminució en el contingut en clorofil·la, per tant, podria ser interessant comparar dues disposicions diferents amb els llums LED enfocant cap enfora, com s'ha fet en el BR2.

També seria atractiu veure si, les algues que han crescut adequadament i que requereixen un volum major del qual els hi proporciona els fotobioreactors utilitzats, com és el cas del cinquè cultiu realitzat en aquest treball, serien capaces de seguir creixent en un dels tancs del mateix laboratori, o en un bioreactor de major dimensió.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- APROMAR. (2014). *Estudio General 1, Una primera aproximación al sector de las macroalgas: Evaluación del estado de explotación y propuestas de gestión sostenible y cultivo de Macroalgas en Andalucía, Asturias y Galicia.*
- Bringué, J. (2019). *Importància de la mida i tipus de fragment en la taxa de creixement d'Ulva ohnoi i estudi de la reactivació post període de manteniment en refrigerador.*
- Casais Caamaño, E. (2016). *Desarrollo de cultivos de "Ulva" (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de AMTI.*
- Chopin, T. (2011). *Progression of the Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) concept and upscaling of IMTA systems towards commercialization Marsh ecology View project Sustainable Aquaculture Systems View project.* <https://www.researchgate.net/publication/269987632>
- FAO. (2002). PERSPECTIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGAS MARINAS EN LOS PAÍSES EN DESARROLLO - ÍNDICE. FAO. <https://www.fao.org/3/Y3550S/Y3550S04.htm>
- FAO. (2018). *The global status of seaweed production, trade and utilization Volume 124.*
- Gaitero Álvarez, A. (2012). *Biofijación de CO2 Mediante el Cultivo de Algas. Diseño de un Prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de "Spirulina Platensis."*  
[www.conama2012.org](http://www.conama2012.org)
- Giercksky, E., & Doumeizel, V. (2020). *SEAWEED REVOLUTION A MANIFESTO FOR A SUSTAINABLE FUTURE SEAWEED REVOLUTION: A MANIFESTO FOR A SUSTAINABLE FUTURE 2 FOREWORD.*  
[www.seaweedmanifesto.com](http://www.seaweedmanifesto.com),
- Hiraoka, M., Shimada, S., Uenosono, M., & Masuda, M. (2003). A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. In *Phycological Research* (Vol. 51).
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., and Anderson, L. (1999). *Methods of Seawater Analysis.* Weinheim: Wiley-VCH, 1999. (pp. 170 - 174).
- Lima, N. (2020). *Estudi del creixement en superfície de la macroalga ulva ohnoi en un fotobiorreactor.*
- Masaló, I., & Oca, J. (2020). *Evaluation of a portable chlorophyll optical meter to estimate chlorophyll concentration in the green seaweed Ulva ohnoi.* <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02257-3>/Published
- Oca, J., Cremades, J., Jiménez, P., Pintado, J., & Masaló, I. (2019). Culture of the seaweed *Ulva ohnoi* integrated in a *Solea senegalensis* recirculating system: influence of light and biomass stocking density on macroalgae productivity. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2461–2467.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-01767-z>
- Public Health Association, A. (1992). *APHA Method 9221: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*

Rorrer, G. L., & Cheney, D. P. (2004). Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*, 32(1), 11–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.03.007>

Rosa, J., Lemos, M. F. L., Crespo, D., Nunes, M., Freitas, A., Ramos, F., Pardal, M. Â., & Leston, S. (2020). Integrated multitrophic aquaculture systems – Potential risks for food safety. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 96, pp. 79–90). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.008>

Suh, I. S., & Lee, C. G. (2003). Photobioreactor engineering: Design and performance. In *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (Vol. 8, Issue 6, pp. 313–321). Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. <https://doi.org/10.1007/BF02949274>

## **8. ANNEXOS**

Annex A. Anàlisi Nitrats (Public Health Association, 1992)

Annex B. Anàlisi Fosfats (Methods of Seawater Analysis, 1999)

Annex C. Anàlisi Alcalinitat

## Annex A. Anàlisi de nitrats

El mètode descrit es basa en la mesura de l'absorció a l'UV de l'ió nitrat a 220 nm. És adequat com a mètode de screening en mostres d'aigües naturals no contaminades. L'absorció de matèria orgànica dissolta es corregeix amb la mesura a 275 nm. L'ió clorur no afecta la determinació. El medi àcid prevé la possible interferència d'hidròxid o carbonat.

### Protocol de mesura:

#### - Material necessari:

##### Instrumental i material

- Espectrofotòmetre a llum d'UV.
- Xeringues de 10 - 15 mL amb filtres de membrana, diàmetre de porus de 0,45 µm.
- Matrassos aforats de 50 mL.
- Pipetes de (1, 2, 5, 10, 20, 25) mL.
- Aigua desionitzada.

#### - Reactius:

- Solució mare de nitrats de 100 mg/L N-NO<sub>3</sub>. Dissoldre 0,7218 g de KNO<sub>3</sub> (assecat 1 h en estufa a 105 °C) en un litre d'aigua desionitzada.
- Solució intermèdia de 10 mg/L N-NO<sub>3</sub>. Es prepara per dilució 1/10 a partir de la solució mare. Es congela en gots de 100 mL.
- Àcid clorhídric 1 M. 41,22 mL de HCl concentrat (37 % i 1,19 g/mL) diluït fins a 500 mL amb aigua desionitzada.

#### - Procediment: Preparació dels patrons

- Patró de 0,2 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 1 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,4 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 2 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,8 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 4 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró d'1 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 5 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 2 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 10 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 4 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 20 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 5 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 25 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 7 mg N-NO<sub>3</sub>/L : Pipetejar 35 mL de la solució intermèdia de 10 mg de N-NO<sub>3</sub>/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Afegir a cada patró 1 mL de HCl 1 M.



- **Preparació de les mostres:**

- Filtrar la mostra per un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 µm.
- Diluir si la concentració prevista és superior a 5 mg N-NO<sub>3</sub>/L: Pipetejar un volum v mL en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Afegir 1 mL de HCl 1 M.

- **Lectura de patrons i mostres:**

- Fixar les longituds d'ona a l'espectrofotòmetre: 220 nm i 275 nm.
- Ajustar el zero d'absorbància amb aigua desionitzada.
- Llegir per duplicat els patrons preparats anteriorment.
- Llegir per triplicat les mostres preparades anteriorment.

**Càlculs:**

- **Dades**

- Lectura dels patrons a  $\lambda = 220$  nm i  $\lambda = 275$  nm.
- Lectura de les mostres a  $\lambda = 220$  nm i  $\lambda = 275$  nm.
- V = mL de mostra diluïts en 50 mL.

- **Recta de calibració:**

Obtenir l'equació i el valor de R<sup>2</sup> de la recta de regressió a partir de: Abscisses: valors de concentració 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 4, 5 i 7 mg N-NO<sub>3</sub>/L

Ordenades: valors d'absorbància corresponents, obtinguts mitjançant la següent equació:

$$\text{Absorbància nitrats} = \text{Lectura } \lambda (220 \text{ nm}) - 2 \cdot \text{Lectura } \lambda (275 \text{ nm})$$

- **Resultats:**

Calcular el valor d'Absorbància de les mostres a partir dels valors de lectura d'acord amb l'equació

$$\text{Absorbància nitrats} = \text{Lectura } \lambda (220 \text{ nm}) - 2 \cdot \text{Lectura } \lambda (275 \text{ nm})$$

Portar el valor d'Absorbància calculada a la recta de regressió i deduir el valor de la concentració en mg N-NO<sub>3</sub>/L.

Si s'ha fet dilució, aplicar el factor:

$$\frac{\text{mg N-NO}_3^-}{L \text{ dilució}} \cdot \frac{50 \text{ mL dilució}}{v \text{ mL mostra}} \cdot \frac{\text{mg N-NO}_3^-}{L \text{ mostra}}$$

## Annex B. Anàlisi de fosfats

El mètode descrit determina els ions de fosfat dissolts en aigua de mar. És un mètode colorimètric que es basa en la reacció del heteropoliàcid de fòsfor i molibdè que posteriorment es redueix formant el compost amb color blau de molibdè (absorbància a 880 nm).

### Protocol de mesura:

#### - Material necessari:

##### Instrumental i material

- Espectrofotòmetre a llum d'UV.
- Xeringues de 10 – 15 mL amb filtres de membrana, diàmetre de porus de 0,45 µm.
- Matrassos aforats de 50 mL.
- Pipetes de (1, 2, 5, 10) mL.
- Aigua desionitzada.

#### - Reactius

- Solució mare de 100 mg P/L : Dissoldre 0,4390 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (assecat 1h en estufa a 105 °C) en un litre d'aigua desionitzada.
- Solució intermèdia de 20 mg P/L : Pipetejar 20 mL de la solució mare de 100 mg P/L i enrasar a 100 mL d'aigua desionitzada. Es congela en gots de 100 mL.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  4,5 M. 249,8 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrat (96% i 1,84 g mL<sup>-1</sup>) diluït fins 1 L amb aigua desionitzada.
- Solució reductora: Dissoldre 5 g d'àcid ascòrbic ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) en 25 mL d'aigua desionitzada i afegir 25 mL d'àcid sulfúric 4,5 M. Aquesta solució es pot conservar en la nevera fins que apareix color groguenc (aproximadament 1 setmana).
- Reactiu Cromogen: Dissoldre 12,5 g d'heptà-molibdè d'amoni tetrahidratat ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 125 ml d'aigua (solució 1). Dissoldre 0,5 g de tartrat d'antimoni i potassi ( $\text{k}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) en 20 mL d'aigua (solució 2). Finalment afegir primer la solució 1 i després la solució 2 a 350 mL d'àcid sulfúric 4,5 M agitant contínuament.

#### - Procediment: Preparació dels patrons

- Preparar una solució de 5 mg P/L : Pipetejar 25 mL de la solució intermèdia de 20 mg P/L en un matràs de 100 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,1 mg P/L : Pipetejar 1 mL de la solució de 5 mg de P/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,2 mg P/L : Pipetejar 2 mL de la solució de 5 mg de P/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 0,5 mg P/L : Pipetejar 5 mL de la solució de 5 mg de P/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Patró de 1 mg P/L : Pipetejar 10 mL de la solució de 5 mg de P/L en un matràs aforat de 50 mL i enrasar amb aigua desionitzada.
- Blanc: 50 mL d'aigua.

### Preparació de les mostres

- Filtrar la mostra per un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Diluir si la concentració prevista és superior a 1 mg P/L.
- **Reacció de color**
  - Pipetejar 1 mL de solució reductora en les solucions: blanc, patrons i mostres.
  - Agitar
  - Pipetejar 1 mL de solució de reactiu cromogen en les solucions de: blanc, patrons i mostres.
  - Agitar
  - Esperar 10 minuts.
- **Lectura de patrons i mostres**
  - Fixar les longituds d'ona a l'espectrofotòmetre: 880 nm.
  - Ajustar el zero d'absorbància amb el blanc.
  - Llegir per duplicat els patrons preparats anteriorment.
  - Llegir per triplicat les mostres preparades anteriorment.

### Càlculs:

- **Dades:**

Lectura dels patrons a  $\lambda = 880 \text{ nm}$ .

Lectura de les mostres a  $\lambda = 880 \text{ nm}$ .

- **Recta de calibració:**

Obtenir l'equació i el valor de  $R^2$  de la recta de regressió a partir de:

Abscisses: valors de concentració 0, 0,1, 0,2, 0,5, i 1 mg P/L.

Ordenades: valors d'Absorbància corresponents.

- **Resultats:**

Portar el valor d'Absorbància calculada a la recta de regressió i deduir el valor de la concentració en mg Fòsfor/L.

Si s'ha fet dilució, aplicar el factor corresponent.

## Annex C. Anàlisi d'Alcalinitat

L'alcalinitat està descrita com la mesura de la capacitat de neutralització d'àcids de l'aigua i normalment es determina mitjançant la titulació contra l'àcid sulfúric fins al punt final de la reacció àcid base. La titulació és un mètode d'anàlisi químic quantitatiu per tal de determinar concentracions desconegudes d'un reactiu a partir d'un altre reactiu de concentració coneguda.

L'alcalinitat es causada per diversos motius, per exemple: reaccions d'intercanvi en els sòls, l'absorció biològica i la reducció d'anions forts, l'evaporació, precipitació de minerals, etc.

### Protocol de mesura:

#### - Material necessari:

- Erlenmeyer
- Vas de precipitats
- Bureta (10 mL)
- Ataronjat de metil amb comptagotes
- Pipeta
- HCl (0,02 M)
- Aigua destil·lada

#### - Procediment:

1. Buidar en vas de precipitats mostra de l'aigua a estudiar.
2. Amb la pipeta, s'agafen 10 mL de la mostra del vas de precipitats i es traslladen a l'erenmeyer.
3. S'introdueixen 3 gotes d'ataronjat de metil a l'erenmeyer i mesquem, quedarà un color de groc intens.
4. Afegim HCl necessari a un vas de precipitats.
5. Introduïm el HCl (0,02 M) del vas de precipitats a la bureta i enrasem a 0.
6. Anem afegint gota a gota de HCl de la bureta a l'Erlenmeyer ( que conté la mostra + 3 gotes d'ataronjat de metil). És important anar remouent l'Erlenmeyer, per tal d'homogeneïtzar la barreja.
7. En el moment, en què s'observi un canvi de color coure-granat, en caure la gota, s'ha d'aturar el procediment i remoure. Si una vegada remenat:
  - a) La solució de l'Erlenmeyer es torna de color groc (menys intens que a l'inici) continuem tirant gotes.
  - b) La gota de coure-granat, continua quedant com una taca en la superfície i no es reparteix uniformement per la resta de volum continuem tirant gotes.
  - c) El volum de l'Erlenmeyer es torna de color coure-granat, parar de tirar gotes, procés finalitzat.
8. Anotar el valor total de HCl que s'ha introduït a la mostra.

En general, amb 3 repeticions és suficient per obtenir un valor fiable. Tot i això, si alguna de les 3 mesures dóna un valor significativament diferent de la resta, l'aconsellable és eliminar aquesta mesura i realitzar una quarta repetició.

Un cop es tenen els tres valors de les diferents mesures, hi ha dues opcions a realitzar:

1. Fer la mitjana dels volums de HCl consumits en cada repetició i utilitzar el valor mitjà en el càlcul de la concentració de carbonat de calci.
2. Calcular, les diferents concentracions de carbonat de calci, a partir dels tres valors de HCl consumits i fer la mitjana dels diferents valors de concentració obtinguts en el càlcul.

Tant una opció com l'altre haurien de donar el mateix si s'ha realitzat el càlcul correctament.

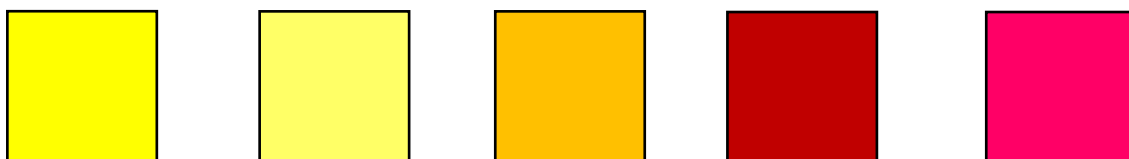
Càlcul de la concentració de carbonat de calci:

$$\text{Volum HCL gastat} \cdot 100,0089 \cdot \text{Factor del HCL}$$

Aquesta fórmula és el resultat d'una sèrie més de factors de conversió, una vegada simplificats. Mitjançant aquest càlcul obtenim la quantitat de  $\text{CaCO}_3$  (mg  $\text{CaCO}_3$ / L de mostra), aquest valor determina l'alcalinitat de la mostra estudiada.

**- Rang de colors:**

El rang de colors que s'ha de tenir en compte durant aquest procés és el següent:

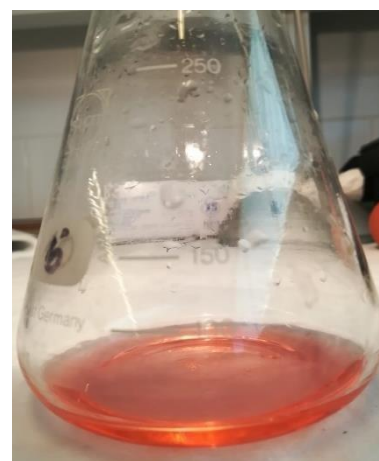
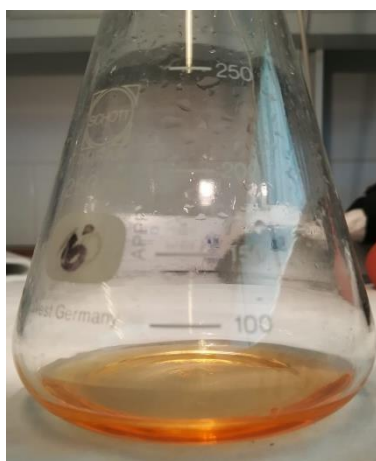
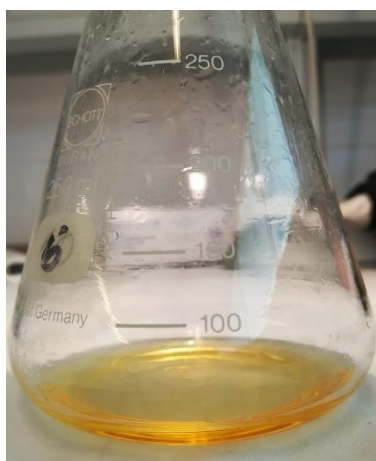


Mostra  
+  
Ataronjat  
de Metil

Mostra  
+  
Ataronjat de  
Metil  
+  
HCl (valor  
insuficient)

Mostra  
+  
Ataronjat de  
Metil  
+  
HCl (valor  
correcte)

Mostra  
+  
Ataronjat de Metil  
+  
HCl (Volum consumit excessiu)  
MESURA INCORRECTE



Com podem observar la diferència de colors és força clara. Cal tenir en compte que el canvi de tonalitat entre el groc i el coure és molt ràpid, i de seguida es canvia a rosa- granat.