

*Una Revisión sobre la Biotecnología
de las Algas*

MIGUEL ÁLVAREZ COBELAS y TOMÁS GALLARDO

Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología,
Universidad Complutense, E-28040 Madrid.

Resumen.

ÁLVAREZ COBELAS, M. & T. GALLARDO. 1989. Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas. *Bot. Complutensis* 15: 9-60.

En este trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre la Biotecnología de las Algas. Esta consiste en el cultivo masivo de las algas en condiciones controladas con objeto de usar posteriormente la biomasa producida. La revisión empieza con una breve reseña histórica y continúa describiendo las necesidades del cultivo masivo: inóculo, tecnología y medios de cultivo. Posteriormente se revisan las condiciones que optimizan los cultivos: radiación, tiempo de retención, turbulencia, pH y oxígeno disuelto, carbono, nitrógeno y fósforo e interacciones bióticas. Después se indican las cifras de producción masiva y se discuten los métodos de recolección de la biomasa, incluyendo un apartado sobre inmovilización de las algas. También se describen los usos a los que se dedican las algas producidas: producción de sustancias, depuración de aguas residuales, uso en alimentación animal y humana, uso como fertilizante. Finalmente, se realiza una breve descripción de las experiencias realizadas en Biotecnología de Algas en España.

Palabras clave: Biotecnología de las Algas, cultivo masivo, usos de la biomasa.

Abstract.

ÁLVAREZ COBELAS, M. & T. GALLARDO. 1989. A Review on Algal Biotechnology. *Bot. Complutensis* 15: 9-60 (in Spanish).

A literature review on Algal Biotechnology is outlined here. Algal Biotechnology deals with algal mass culture in controlled situations in order to further use the biomass produced. A short historical account is followed by a report on the needs of mass culture (inoculum, technology and culture media). Afterwards the conditions optimizing mass cultures are reviewed: irradiance, retention time, turbulence, pH and dissolved oxygen, carbon, nitrogen and phosphorus and biotic interactions. Productivity values are referred too and the methods of biomass harvesting are briefly outlined, including a report on algal immobilization. Biomass applications are also considered, i.e., chemicals, wastewater treatment, animal feed and human food, fertilizers. Finally, the Spanish research on Algal Biotechnology is reported.

Key words: Algal Biotechnology, mass culture, biomass applications.

INTRODUCCIÓN

Las algas vienen siendo utilizadas por la Humanidad desde antes de Cristo (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980). No nos proponemos, sin embargo, revisar los detalles de dicha utilización. Existe un buen número de revisiones sobre sus distintos aspectos (MICHANEK, 1975; CHAPMAN & CHAPMAN, 1980; HOPPE et al., 1979, HOPPE & LEVRING, 1982; LEVRING et al., 1969; SHELEF & SOEDER, 1980, etc.), aunque ninguna amplia en castellano —sólo la dedicada a alimentación animal de HERRERO et al. (1985)—.

En las dos últimas décadas se ha ido desarrollando una nueva tecnología aplicada a los seres vivos: la Biotecnología. A grandes rasgos, la Biotecnología consiste en hacer que los organismos trabajen en nuestro beneficio mediante un conjunto de técnicas que, combinadas con nuestro conocimiento de la biología de los seres vivos, orienta la vida de éstos hacia procesos de interés económico-social para la Humanidad.

En esta revisión describiremos someramente la Biotecnología de las Algas. La enorme cantidad de aplicaciones dirigidas es tal que un relato pormenorizado de las mismas convertiría la presente revisión en un libro de tamaño considerable. Por ello, restringiremos voluntariamente la extensión del texto, aportando las referencias bibliográficas necesarias para ampliar aspectos concretos de la Biotecnología de las Algas. Excluiremos de la revisión, pues, toda la temática no estrictamente biotecnológica, es decir, todo lo concerniente a procesos sin intervención humana, tales como producciones masivas en condiciones naturales parte de las cuales originan grandes arribaciones a las costas de todo el mundo, por ejemplo. En resumen, nos restringiremos al cultivo intensivo de algas y a su aprovechamiento ulterior.

La Biotecnología de las Algas se ha enfocado principalmente hacia las algas microscópicas. Las algas de mayor porte, como ya hemos señalado, llevan siendo utilizadas desde hace mucho tiempo, pero su Biotecnología ha avanzado menos comparativamente, por lo que no debe extrañar el reducido espacio que aquí se les dedicará.

No nos extenderemos tampoco sobre las bases ecofisiológicas de esta Biotecnología. El lector interesado puede consultar a ese respecto las obras de MORRIS (1981), PLATT (1981), LOBBAN & WYNNE (1981), LOBBAN et al. (1985) y FOGG & THAKE (1987).

A grandes rasgos, la Biotecnología de las Algas consta de dos fases: producción controlada de la biomasa algal y aprovechamiento de dicha biomasa. En esta revisión se seguirá ese mismo orden, comenzando con la descripción de las características técnicas de dicha producción, los factores que influyen sobre la misma y las cifras que se han alcanzado. Posteriormente, se referirán los usos principales de que es objeto la biomasa producida:

— obtención de sustancias de interés químico-farmacéutico,

- depuración de aguas residuales,
- utilización en alimentación animal y humana,
- utilización como fertilizantes.

En España la Biotecnología de las Algas presenta una enorme potencialidad que aún ha sido escasamente abordada (RODRÍGUEZ LÓPEZ et al., 1981). Este trabajo pretende, además, describir brevemente las experiencias españolas en este campo de la ciencia aplicada.

RESEÑA HISTÓRICA

Los comienzos de la Biotecnología de las Algas se remontan a la II Guerra Mundial cuando científicos alemanes empezaron a cultivar microalgas masivamente para obtener lípidos y proteínas (HARDER & VON WITSCH, 1942; VON DENFFER, 1949; GUMMERT et al., 1953). Poco después de dicha conflagración se iniciaron experiencias similares en la Unión Soviética, EE.UU. y Japón; a principios de la década siguiente se celebró la primera Reunión Internacional sobre el tema (BURLEW, 1953) y pocos años después se efectuó la primera revisión sobre el tema (TAMIYA, 1957). Paulatinamente, la Biotecnología de las microalgas ha ido extendiéndose a muchos países (GOLDMAN, 1979a) y en la actualidad hay experiencias de esta clase en Europa (Inglaterra, Suecia, Noruega, Alemania, Checoslovaquia, Francia, Bulgaria, URSS, Italia, Holanda, Bélgica, España), Asia (Israel, Kuwait, India, Singapur, Tailandia, Japón, Indonesia, Filipinas, China, Taiwan), América (Canadá, USA, Perú, Chile, Cuba, Brasil), Oceanía (Australia, Nueva Zelanda, Hawaii), África (Egipto, Sudáfrica).

La Biotecnología de las algas macroscópicas ha ido más retrasada, aunque su utilización extensiva provenga de más antiguo. Los primeros cultivos inducidos de algas marinas datan de 1700 (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980) y tenían lugar en la bahía de Tokyo, pero no fue hasta la década de 1950 cuando empezaron a conocerse bien los ciclos vitales de las algas marinas (DREW, 1949) y pudieron introducirse mejoras sustanciales en los cultivos masivos. En la actualidad la Biotecnología de las algas marinas macroscópicas se encuentra bien desarrollada en Asia (Japón, China, Indonesia, Taiwan, Filipinas) y sólo relativamente en otras áreas del globo (Chile, Brasil, Francia, Inglaterra, México, USA).

PRODUCCIÓN MASIVA CONTROLADA

Esencialmente la Biotecnología de las Algas se basa en su cultivo masivo. Este se realiza en condiciones controladas, con el inóculo de la especie que interesa, en recipientes apropiados de capacidad variable (o en condiciones naturales, caso de las algas bentónicas marinas) y con diversos

medios de cultivo, según los requerimientos de la especie que se desee cultivar.

EL INÓCULO

El número de especies que se ha cultivado masivamente hasta ahora es relativamente grande (Tabla 1), aunque pequeño aún comparado con el número total de especies de algas que se conocen. Como puede comprobarse en dicha tabla, se han cultivado algas pertenecientes a casi todos los grandes grupos taxonómicos. El origen de los inóculos suele ser doble: plantas aisladas de la Naturaleza o plantas procedentes, bien de Colecciones de Cultivo de Algas, bien de cultivos masivos realizados en otros lugares. Todos los inóculos, en condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes experimentan un crecimiento exponencial, pero —dado que las condiciones de cultivo no suelen ser siempre estrictamente controlables— es importante contar con un inóculo abundante de la especie en cuestión con objeto de evitar proliferaciones de otras especies no deseadas. Dicho inóculo abundante suele producirse en el laboratorio en cultivos unialgales ya masivos, pero rara vez axénicos. Cuando el cultivo alcanza el final de la fase exponencial, se pasa a trabajar en condiciones semicontroladas, con mayores volúmenes que se obtienen diluyendo el inóculo con medio de cultivo. Desde esta fase (fase de planta-piloto) se comienza la fase industrial al aire libre o en el mar abierto.

Un aspecto de la Biotecnología de las Algas actualmente en auge es la selección genética de cepas para el cultivo masivo. La genética de las algas se encuentra aún bastante retrasada con respecto a la de las plantas superiores (GALLAGHER, 1986; VAN DER MEER, 1988), pero en los últimos años se han conseguido algunos resultados muy interesantes. La selección de cepas se realiza mediante técnicas de genética clásica: mutantes naturales (*Anabaena*: KERBY et al., 1988; *Gelidium*, *Gracilaria*, *Porphyra*: VAN DER MEER, 1987), hibridaciones (*Laminaria*, *Undaria*: WU & LIN, 1987) o inducción artificial de mutaciones.

Los mutágenos que se han probado con éxito han sido la NNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) y ésteres etílicos o metílicos del ácido metanosulfónico, con los cuales se han inducido mutaciones en *Porphyra* y *Gelidium* (VAN DER MEER, 1987).

La obtención de mutantes ha permitido, entre otras cosas, cultivar *Spirulina* en agua de mar —un medio de cultivo prácticamente gratuito— (TOMASELLI et al., 1987) o aumentar la fotoproducción de hidrógeno en *Anabaena* (SPILLER & SHANMUGAM, 1986). Las hibridaciones en *Laminaria* han incrementado muchísimo la producción de este alga en las costas de China (ZENG, 1981).

En cualquier caso, CHENEY (1986) recomienda empezar a usar técnicas ya habituales en genética molecular, tales como fusión de protoplastos,

TABLA 1. Producción de algas en cultivo masivo. Todas las cifras, en gr. (peso seco) · m⁻² · día⁻¹. Se ha procurado ofrecer los promedios anuales si existen. Todas las cifras se han redondeado al número entero más próximo.

TABLE 1. Algae mass culture productivity (gr. (dry weight) · m⁻² · d⁻¹). Annual averages are given if available. All numbers have been approached to their nearest integer.

Pais	Alga	Producción	Referencia
<i>Cyanophyceae</i>			
España	<i>Anabaena variabilis</i>	13	GARCIA FONTES et al. (1982)
URSS	<i>A. variabilis</i>	4- 7	GRAMOV & PINEVICH (1972)
USA	<i>Anabaenopsis</i> sp.	7-15	WEISSMAN et al. (1978)
India	<i>Spirulina platensis</i>	8-12	BECKER & VENKATARAMAN (1982)
Israel	<i>S. platensis</i>	10-50	RICHMOND & VONSHAK (1986)
México	<i>S. platensis</i>	10-15	SANTILLAN (1982)
URSS	<i>S. platensis</i>	9-20	GROMOV & PINEVICH (1972)
USA	<i>S. platensis</i>	14-21	BEDELL (1985)
Japón	<i>Tolypothrix tenuis</i>	6- 8	WATANABE et al. (1959)
<i>Chlorophyceae</i>			
Japón	<i>Chlorella</i> sp.	21-26	TSUKADA et al. (1977)
Kuwait	<i>Chlorella sorokiniana</i>	8-22	PROKOP & FEKRI (1984)
Taiwan	<i>Chlorella</i> sp.	20-40	SOONG (1980)
URSS	<i>Chlorella</i> sp.	15-25	DODGE (1976)
España	Chlorococcales	33	VELASCO et al. (1975)
Filipinas	Chlorococcales	3- 5	RODULFO et al. (1982)
Israel	Chlorococcales	16-24	SHELEF et al. (1978)
Singapur	Chlorococcales	15-20	GOH (1986)
URSS	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	20-40	SPECTOROVA et al. (1982)
USA	<i>D. primolecta</i>	12	THOMAS et al. (1986b)
USA	<i>Micractinium</i> sp.	7-20	BENEMANN et al. (1978)
Alemania Occidental	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-15	SOEDER (1976)

TABLA 1. (Continuación).

País	Alga	Producción	Referencia
Bulgaria	<i>S. obliquus</i>	17-20	DILOV et al. (1985)
Checoslovaquia	<i>S. obliquus</i>	12-16	VENDLOVA (1969)
Egipto	<i>S. obliquus</i>	12-16	EL-FOULY et al. (1984)
India	<i>S. obliquus</i>	15-20	BECKER & VENKATARAMAN (1982)
Perú	<i>S. obliquus</i>	15-25	HEUSSLER et al. (1978a)
Polonia	<i>S. obliquus</i>	10-14	VENDLOVA (1969)
Rumania	<i>S. obliquus</i>	18-25	VENDLOVA (1969)
Tailandia	<i>S. obliquus</i>	12-17	PAYER et al. (1978)
<i>Diatomophyceae</i>			
España	<i>Chaetoceros gracilis</i>	7-17	LUBIAN (1986)
Inglaterra	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	7-13	ANSELL et al. (1963)
USA	<i>P. tricornutum</i>	22	THOMAS et al. (1984a)
USA	Cultivo mixto	13-25	GOLDMAN et al. (1975)
<i>Euglenophyceae</i>			
Italia	<i>Euglena</i> sp.	17-22	BALLONI et al. (1980)
<i>Eustigmatophyceae</i>			
España	<i>Nannochloropsis</i> sp.	5-39	LUBIAN (1986)
USA	<i>Isochrysis</i> sp.	48	THOMAS et al. (1984c)
<i>Phaeophyceae</i>			
USA	<i>Sargassum muticum</i>	55	GELLENBECK & CHAPMAN (1986)
<i>Prasinophyceae</i>			
Canadá	<i>Chondrus crispus</i>	30	SHARP (1987)

TABLA I. (Continuación).

País	Alga	Producción	Referencia
Filipinas	<i>Euclima striatum</i>	4	PARKER (1974)
Sudáfrica	<i>Gelidium pristoides</i>	2,5-5	CARTER & SIMONS (1987)
USA	<i>Gracilaria foliifera</i>	18-44	LAPOINTE & RYTHER (1979)
China	<i>G. sjostedtii</i>	10-27	LI REN et al. (1984)
USA	<i>G. tikvahiae</i>	22-25	HANISAK & RYTHER (1986)
Taiwan	<i>G. verrucosa</i>	4-12	YOUNG MENG (1981)
USA	<i>G. verrucosa</i>	6- 9	DAUGHERTY & BIRD (1988)
USA	<i>Hypnea musciformis</i>	18	LAPOINTE et al. (1976)
Canadá	<i>Palmaria palmata</i>	10-28	MORGAN et al. (1980)
Francia	<i>Porphyridium cruentum</i>	4- 8	THEPENIER et al. (1988)
<i>Xanthophyceae</i>			
USA	<i>Monallantus salina</i>	14	THOMAS et al. (1984c)

microinyección de material genético y vectores como el plásmido Ti. La obtención de protoplastos en algas está bien documentada (CHENEY, 1986) para miembros de Chlorophyceae, Phaeophyceae y Rhodophyceae; incluso existen ya algunos datos de fusión entre especies del mismo género o distinto (*Zygnema*, *Spirogyra*, *Chlamydomonas*, entre *Enteromorpha linza* y *Monostroma angicava*, etc.: CHENEY, 1986), aunque los híbridos resultantes son poco estables (SAGA et al., 1986). Hasta la fecha, el trabajo más espectacular de fusión de protoplastos es el de LEE & TAN (1988), quienes mediante glicol de polietileno inducen la fusión de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) y *Dunaliella bardawil* o *D. salina* (Chlorophyceae); la frecuencia de fusiones es baja (10^{-5}) pero el organismo resultante es estable.

Un campo anexo que también está siendo explorado activamente en las algas macroscópicas marinas es la regeneración a partir de callos («callus») o pequeñas porciones de tejido (POLNE-FULLER, 1988). Este aspecto es muy interesante porque permite la producción masiva de algas marinas de modo vegetativo, sin necesidad de esporas o fases sexuales en las cuales la mortalidad es mayor. Se ha descrito la formación de callos en algas macroscópicas marinas de los tres grupos principales (CHENEY, 1986). El éxito de la regeneración, sin embargo, depende de múltiples factores: tipo de tejido, morfología de la regeneración, condiciones de cultivo, etc. (POLNE-FULLER et al., 1986).

SISTEMAS DE CULTIVO

Nos referiremos aquí a los utilizados en el cultivo masivo, los de cultivo en pequeños volúmenes no los consideraremos. Pueden ser de dos tipos: abiertos y cerrados. Los primeros son los más abundantes y más antiguos; los segundos, más recientes, presentan la ventaja de reducir la contaminación del cultivo por otros organismos no deseados (algas competidoras, parásitos, epífitos) o sustancias químicas que puedan resultar tóxicas para el alga en cuestión. Hay una enorme variedad de diseños de recipientes abiertos para el cultivo masivo, aunque todos sobre el mismo esquema básico: un paralelepípedo de superficie variable (Fig. 1) y profundidad por lo general inferior a 50 cms. (RICHMOND & BECKER, 1986). La cubeta puede estar construida con los materiales más diversos: piedra, hormigón, cemento, ladrillos, distintos plásticos, arena impermeabilizada con un plástico, etc. (DODD, 1986). La extensión de las cubetas oscila entre 1 m² y 10 ha (DODD, 1986).

Si de algas planctónicas se trata, los primeros problemas a resolver en un cultivo masivo son la sedimentación y la fotoinhibición de las algas. Ello se consigue mediante la agitación del cultivo. Existen varios sistemas de agitación (Fig. 6) que incluyen paletas rotatorias, hélices, agitación manual, pequeñas pendientes o inyección de gases (aire o dióxido de car-

bono mezclado con aire). La agitación en muchos de estos sistemas se ve favorecida si se añaden divisiones internas en la cubeta de cultivo de modo que se formen meandros.

En el caso de algas bentónicas es preciso añadir al recipiente superficies de soporte adicional. Las más antiguas son las cañas de bambú, usadas desde muy antiguamente en el cultivo de *Porphyra* en el Japón (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980). El proceso suele complicarse porque los ciclos vitales de estas algas requieren a menudo de distintas superficies. Así, *Gracilaria tikvahiae* necesita conchas de bivalvos para la fijación de sus esporas (ZERTUCHE et al., 1988) y algo similar ocurre con el estadio "Conchocelis" de *Porphyra* (WAALAND et al., 1986). Una vez desarrolladas las pequeñas plantitas, se intenta su adhesión a cuerdas o redes, manualmente (ZERTUCHE et al., 1988) o de modo espontáneo (WAALAND et al., 1986). Las estructuras de cultivo de las plantas adultas pueden llegar a ser muy grandes (Fig. 7). En el caso de algunas algas bentónicas que viven sobre sustratos arenosos, como las *Gracilaria* chilenas, se han desarrollado varios sistemas para cultivarlas: herramientas en forma de Y griega que entierran trocitos de talo en la arena o bolsas de plástico que, enterradas en la arena, liberan dichos propágulos al desintegrarse (SANTELICES & UGARTE, 1987).

Los recipientes cerrados se fabrican con algún tipo de plástico transparente como material básico, pudiendo adoptar la forma de invernadero, de bolsa (Fig. 2) o de tubería (Fig. 8). En Biotecnología de algas bentónicas marinas no suelen usarse lugares cerrados, sino en estadios iniciales (KAIN & DAWES, 1987) o en condiciones desfavorables, siendo el sistema de invernadero el más empleado en dichos casos. Entre los inconvenientes de esta clase de recipientes se cuentan los siguientes: no son totalmente transparentes a la luz, cubriéndose de polvo con facilidad, son de limpieza interior difícil y resultan más caros que los sistemas de cultivo abierto (RICHMOND & BECKER, 1986).

MEDIOS DE CULTIVO

Las algas no sólo necesitan energía luminosa para crecer sino también elementos nutritivos, fundamentalmente en forma inorgánica. La Biotecnología de las Algas, que es —entre otras cosas— un proceso de tipo económico, requiere de medios de cultivo baratos y fáciles de confeccionar. También debe tenerse en cuenta que no todas las algas tienen los mismos requerimientos nutritivos y por ello éstos deben ser tenidos en cuenta antes de iniciar el cultivo masivo de algún alga determinada.

Existen muchos tipos de medio de cultivo para algas (MCLACHLAN, 1973; NICHOLS, 1973), pero todos tienen el inconveniente de resultar muy caros cuando se usan para la producción masiva. En el caso de las algas

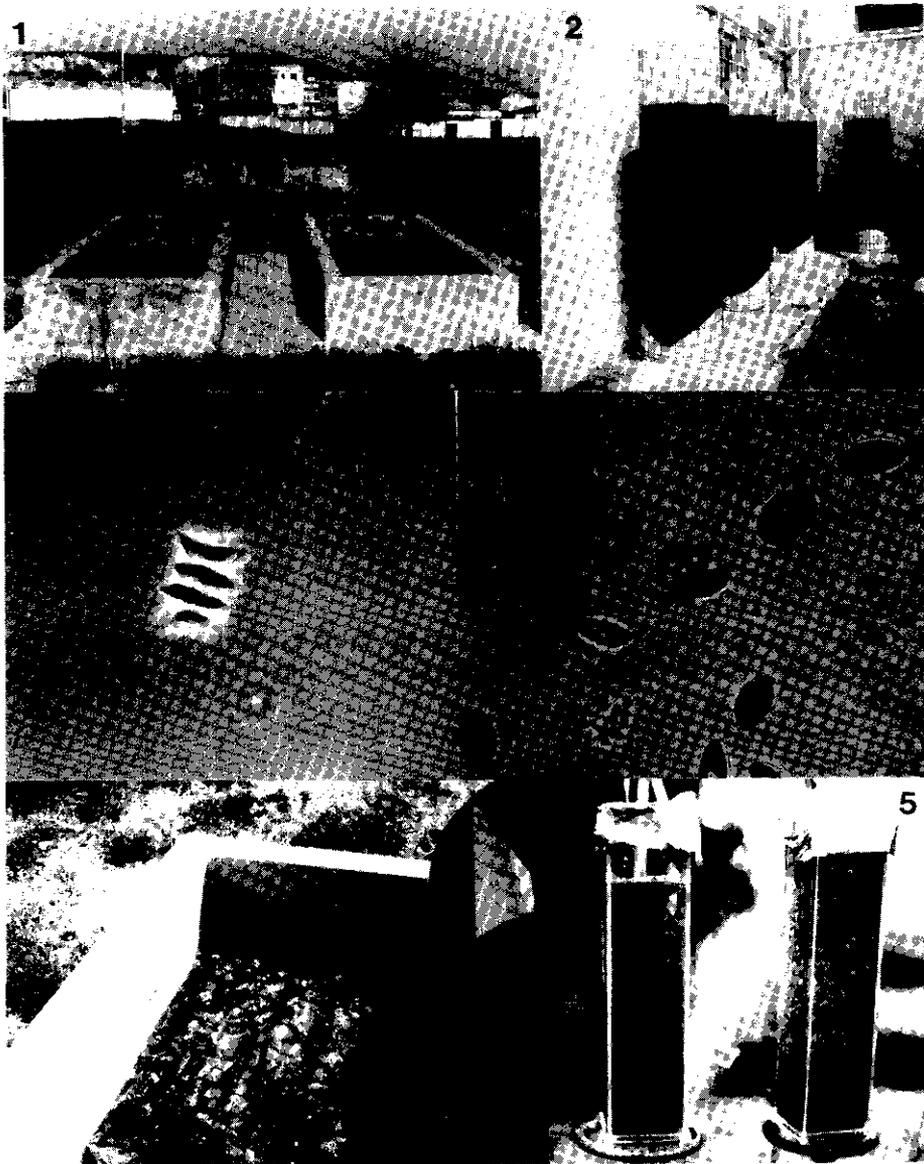


FIG. 1.—Cubetas de cultivo masivo de microalgas al aire libre en el Centro de Investigaciones del Agua (CSIC).

FIG. 1.—Microalgal outdoor mass culture ponds in the Centro de Investigaciones del Agua (CSIC).

marinas suele emplearse normalmente agua de mar suplementada en grado variable con sales inorgánicas de nitrógeno y fósforo.

Para las algas continentales el número de medios de cultivo empleados en Biotecnología es alto y puede decirse que casi cada institución o empresa tiene el suyo propio. Se han cultivado algas con: agua del grifo suplementada con fosfatos y nitratos (GELDENHUYS et al. 1987), agua del grifo con abonos comerciales (BECKER & VENKATARAMAN, 1982), efluentes de la industria azucarera (TRAVIESO & BENÍTEZ, 1987), aguas residuales urbanas diluidas en grado variable (PICARD et al., 1980), aguas residuales urbanas sometidas a tratamiento secundario previo aerobio (VELASCO et al., 1986) o anaerobio (FIESTAS et al., 1988), medios desprovistos de nitrógeno para favorecer a las Cianofíceas fijadoras de nitrógeno atmosférico (GARCÍA FONTES et al., 1987), agua de mar tamponada para producir *Spirulina* —que no es marina— (MATERASSI et al., 1984), efluentes de la industria agropecuaria (porcino, GROENEWEG et al., 1980; bovino: TOERIEN & GROBBELAAR, 1980), etcétera.

La salinidad es otro parámetro importante en el medio de cultivo de algas marinas. Así, por ejemplo, el crecimiento óptimo de *Eucheuma striatum* se obtiene con un 35.11 ‰ de salinidad (MAIRH et al., 1986), mientras que el de *Gracilaria verrucosa* se presenta para un 30 ‰ (RUENESS & TANANGER, 1984).

Es obvio que algunos de estos medios de cultivo condicionan la aplicación posterior de la biomasa producida. No se puede alimentar a seres

FIG. 2.—Cultivo de microalgas para acuicultura marina en bolsas cerradas y verticales (Foto, cortesía de Luis Lubián).

FIG. 2.—Microalgal mass culture for marine aquaculture in vertical plastic bags (Photograph is a courtesy of Luis Lubián).

FIG. 3.—*Scenedesmus acutus* en cultivo con condiciones nutritivas óptimas (A) y en condiciones de déficit de fósforo (B).

FIG. 3.—*Scenedesmus acutus* growing in a balanced culture (A) and in a culture with phosphorus depletion (B).

FIG. 4.—Aspecto de un cultivo masivo de Chlorococcales al aire libre en el Centro de Investigaciones del Agua (CSIC).

FIG. 4.—Appearance of Chlorococcales mass outdoor culture in the Centro de Investigaciones del Agua (CSIC).

FIG. 5.—*Scenedesmus* inmovilizado sobre lentejas de alginato en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana (Cuba).

FIG. 5.—Alginate-immobilized *Scenedesmus* in the Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana (Cuba).

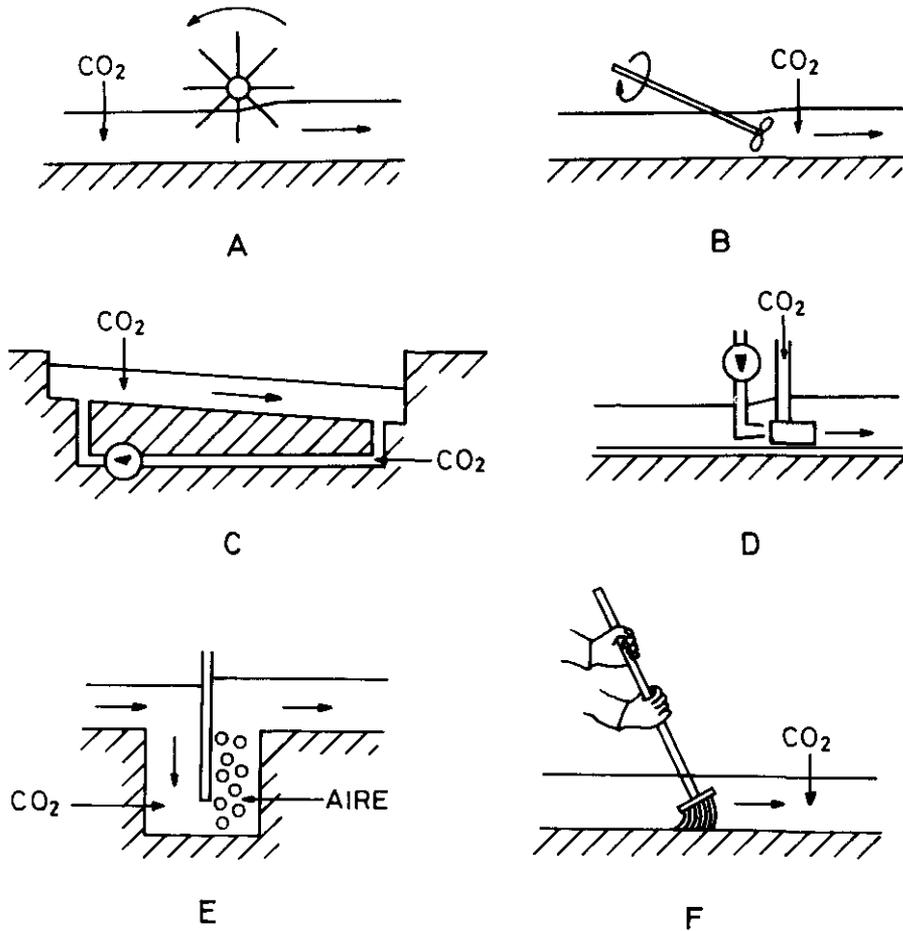


FIG. 6.—Principales sistemas de agitación en los cultivos masivos. Modificado de RICHMOND & BECKER (1986).

FIG. 6.—Main agitation devices in algal mass cultures. Modified from RICHMOND & BECKER (1986).

humanos directamente con algas que hayan crecido con agua residual o fertilizar suelos con cultivos de algas de salinidad elevada, por ejemplo.

CONDICIONES DE CULTIVO

Los principales factores determinantes de la producción masiva de algas son los siguientes:

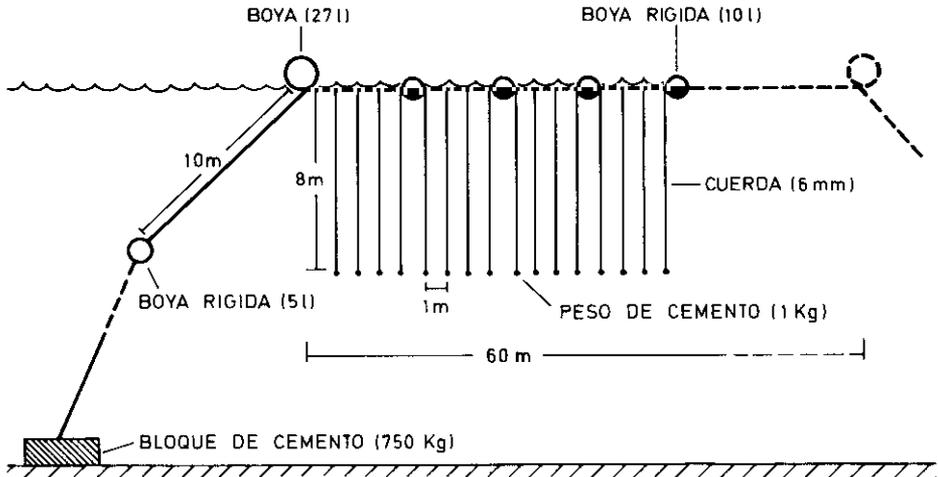


FIG. 7.—Sistema de cultivo de algas bentónicas marinas en mar abierto. Modificado de KAIN & DAWES (1987).

FIG. 7.—Offshore benthic marine algae cultivation facility. Modified from KAIN & DAWES (1987).

- Radiación.
- Tiempo de retención.
- Turbulencia.
- Oxígeno disuelto y pH.
- Carbono.
- Nitrógeno y fósforo.
- Interacciones bióticas.

Radiación

Resulta difícil independizar los efectos que sobre el crecimiento masivo de las algas provocan la temperatura y la luz. Se sabe que en invierno los cultivos al aire libre crecen menos, pero se ignora si se debe a la menor iluminación, a la inferior temperatura o a un efecto de ambas.

La radiación fotosintéticamente activa de saturación bajo la cual hay limitación luminosa es muy variable, dependiendo de cada especie y de su estado fisiológico, pero en promedio puede situarse en torno a los $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ (HARRIS, 1986). Hacia mediados de febrero en la latitud de Israel ya se alcanza esa cifra y, pese a ello, las producciones masivas de microalgas aún resultan subóptimas (SHELEF et al., 1978). En este caso, puede concluirse que la limitación se debe a la temperatura. HEUSSLER (1985) menciona para Perú el caso complementario: cubierta la cubeta de cultivo en invierno con un plástico transparente que contribuía a su calen-

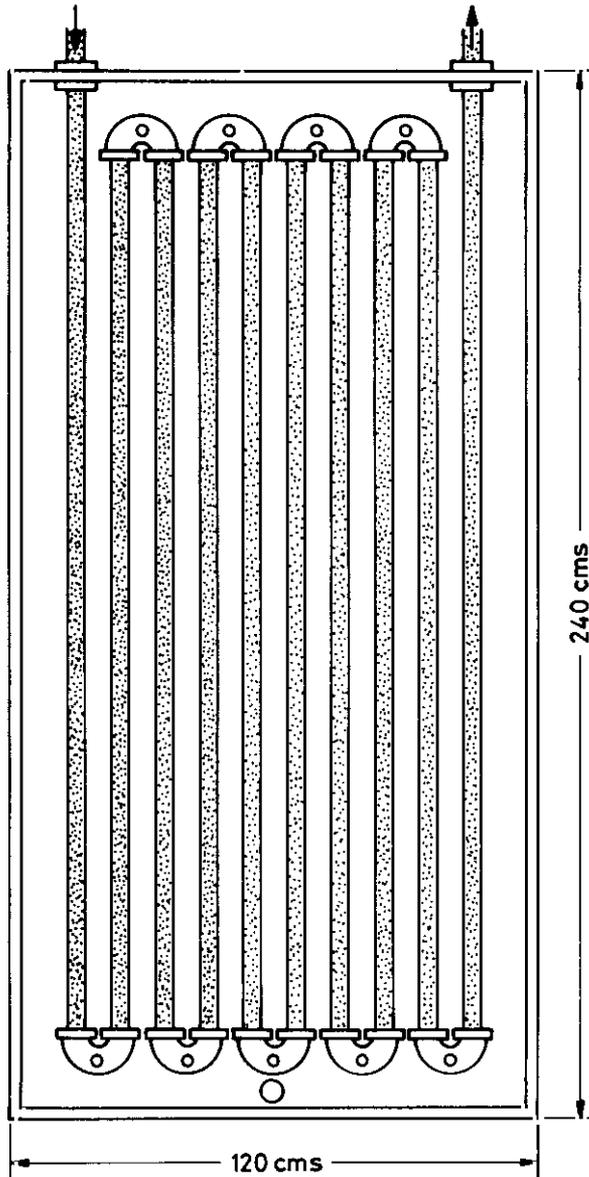


FIG. 8.-Cultivo de *Spirulina* en fotorreactores cerrados. Las tuberías son de vidrio transparente y el baño donde se encuentra está termostatzado. Modificado de BOCCI et al. (1988).

FIG. 8.-*Spirulina* culture in closed photoreactors. Pipes are made of transparent glass and the water bath containing them is termostatzed. Modified from BOCCI et al. (1988).

tamiento, la producción de microalgas ascendió. Este es el motivo de la instalación de la mayor parte de las experiencias de producción masiva de algas en las zonas más cálidas y de mayor insolación del globo: las limitaciones al crecimiento de la escasa radiación son mucho menores.

En las algas macroscópicas se dan distintos óptimos luminosos, a menudo paralelos a los térmicos. Así, *Gracilaria conferta* presenta sus óptimos de crecimiento por debajo de los $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ (FRIEDLANDER et al., 1987); *G. secundata*, sin embargo, no ve saturado su crecimiento a $1.450 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ (LIGNELL et al., 1987).

Por otro lado, los óptimos térmicos de las algas varían según la especie. Así, las Chlorococcales más utilizadas (*Chlorella* y *Scenedesmus*) ofrecen producciones máximas entre los 20 y los 25° C (BECKER & VENKATARAMAN, 1982), mientras *Spirulina* necesita temperaturas más elevadas. Nosotros hemos observado un comportamiento similar de *Oscillatoria* frente a *Chlorella* en el laboratorio. En el caso de las algas bentónicas marinas sucede otro tanto; por ejemplo, el óptimo de crecimiento de *Gracilaria verrucosa* cepa G-16 se encuentra a 24° C (BIRD, 1988), mientras que el de *Laminaria brasiliensis* se halla a 16° C (YONESHIGUE & OLIVEIRA, 1987) y el de *Chondrus crispus*, a 20° C (SIMPSON & SHACKLOCK, 1979).

En el otro extremo del espectro, hacia el ultravioleta, se presenta la influencia fotoinhibidora de la radiación. Es poco probable que dicho fenómeno se produzca en cultivos masivos de algas planctónicas bien agitados, pues la turbulencia generada por la agitación determina que todas las algas pasen bastantes períodos en la oscuridad o en zonas de luz escasa y así la fotoinhibición no se produce (HARRIS & PICCININ, 1977). De todos modos, es bien conocido el hecho de que las Cianofíceas fotoinhiben a intensidades luminosas menores que las Clorofíceas (RICHARDSON et al., 1983). A intensidades elevadas las Cianofíceas producen alrededor de un 25 % menos que las Clorofíceas; a intensidades bajas, aproximadamente lo mismo (WEISSMAN et al., 1978). Que sepamos, apenas hay datos sobre fotoinhibición en cultivos masivos de algas bentónicas marinas, si bien los datos sobre el crecimiento en dichas algas rara vez incluyen medidas fotosintéticas; sólo en *Ascophyllum nodosum* se ha apreciado fotoinhibición a intensidades luminosas de $800 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ (LIGNELL & PEDERSEN, 1986). La fotoinhibición de algas bentónicas marinas en poblaciones naturales está bien documentada (RAMUS, 1981).

La producción masiva de microalgas reduce considerablemente la penetración de la luz en el cultivo. Según nuestros datos, para producciones de $30 \text{ g (peso seco)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1}$ se tienen constantes de extinción de la luz de 60-80 m^{-1} , es decir, penetraciones de la luz de 7-5 cm, lo cual es común a los sistemas de cultivo masivo de microalgas (SHELEF et al., 1978; VONSHAK & RICHMOND, 1985). Fenómenos análogos de autosombreado se han apreciado con algas bentónicas marinas; en *Gracilaria secundata*

biomasas de $3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ producen extinciones de la luz de $15,3 \text{ m}^{-1}$ (LIGNELL et al., 1987).

Con objeto de estimular el efecto multiplicador de la radiación intermitente sobre la producción de algas, conocido desde hace tiempo (KOK, 1953), se han descrito sistemas sencillos generadores de turbulencia y de trayectorias erráticas que exponen las algas a la luz con frecuencias de 0,5-1 Hz (LAWS et al., 1983); los resultados parecen prometedores, toda vez que dichos autores han conseguido incrementos en la eficiencia fotosintética (véase más abajo) del orden del doble de los medidos en los controles.

La radiación luminosa ejerce también otros efectos menos conocidos sobre los cultivos masivos. Así, por ejemplo, el porcentaje de adhesión al sustrato de las esporas de *Porphyra yezoensis* aumenta con la radiación (LI SHI, 1984).

Tiempo de retención

Se conoce desde hace tiempo el fenómeno de la ingestión lujosa de nutrientes en microalgas (KETCHUM, 1939) y macroalgas (RYTHER et al., 1981). Por ello, no es preciso tener operando continuamente el sistema de aprovisionamiento de medio de cultivo para lograr el crecimiento de las mismas en los cultivos masivos. Sin embargo, como quiera que los nutrientes acaban agotándose, se hace necesaria la renovación periódica del medio. El tiempo transcurrido entre cada suministro de medio nuevo es el tiempo de retención si el sistema se halla en equilibrio dinámico. Lo ideal es que dicho período sea igual al que las algas precisan para consumir eficientemente los nutrientes suministrados: un plazo más breve suele eliminar algas en pleno crecimiento por el rebosadero, un plazo más largo provoca una deficiencia nutritiva y la aparición de distintas malformaciones en las microalgas (ORON et al., 1981); nosotros hemos observado también teratologías en cultivos masivos sometidos a limitación nutritiva (Fig. 3). Es difícil, no obstante, acertar con el tiempo de retención idóneo porque el metabolismo de las algas no depende sólo del medio de cultivo, sino también de cada especie concreta y de su historia previa en dicho medio (DROOP, 1983). BENEMANN et al. (1978) estiman el óptimo en cuatro días, al igual que ORON & SHELEF (1982), aunque señalan que si la radiación es inferior a $200 \text{ ly} \cdot \text{día}^{-1}$, dicho período debe alargarse.

Para algas macroscópicas marinas apenas hay datos sobre la importancia de este parámetro, pero el tiempo de renovación del medio de cultivo suele programarse para una semana (DAUGHERTY & BIRD, 1988; LIGNELL et al., 1987). De todos modos, LAPOINTE & RYTHER (1979) indican que el crecimiento masivo de *Gracilaria foliifera* aumenta inversamente con el tiempo de renovación del agua, lo cual también ocurre en *G. tikvahiae* (DE BUSK & RYTHER, 1984; FUJITA & GOLDMAN, 1985).

Otro aspecto importante relacionado con el tiempo de retención es la densidad del cultivo. Como hemos visto en el apartado anterior, las densidades elevadas extinguen con mucha facilidad la luz que recibe el cultivo y hacen que este aspecto resulte limitante de la producción masiva. Se debe, pues, regular la densidad celular en el cultivo a fin de controlar el auto-sombreado y ello puede conseguirse jugando con el tiempo de retención (HARTIG et al., 1988).

Turbulencia

La turbulencia en la masa de cultivo es fundamental para la producción masiva de microalgas. Aunque por el hecho de su escasa profundidad los cultivos sean prácticamente isotermos y, por tanto, se encuentren bien mezclados y sean turbulentos, las algas sedimentan igualmente, si bien con lentitud mayor que en una fase laminar (REYNOLDS, 1984). Resulta preciso, pues, añadir alguna clase de agitación artificial que, produciendo turbulencia, impida la sedimentación. La turbulencia, además, favorece la producción puesto que las algas no se encuentran en todo momento en superficie y, así, evitan la fotoinhibición, aprovechándose del efecto optimizador de la radiación intermitente (véase el apartado de radiación). En efecto, en experiencias realizadas en el mar (MARRA, 1978) y en lagos (JEWSON & WOOD, 1975) en las cuales se evaluaba la producción primaria del fitoplancton en botellas dispuestas en un sistema giratorio que las hacía moverse por toda la columna vertical a la misma escala temporal que los movimientos del agua, la producción prácticamente duplicaba la de los controles fijos.

En los tanques de cultivo de algas bentónicas marinas este aspecto de la turbulencia no ha sido considerado aún, pero debe tenerse en cuenta si la altura de los mismos supera el metro, pues pueden desarrollarse estratificaciones que afecten a la distribución homogénea de los nutrientes en la columna vertical. En *Macrocystis*, por ejemplo, dada la longitud de los talos, este aspecto es muy importante (NORTH et al., 1981).

Oxígeno disuelto y pH

El control de uno y otro son fundamentales en los cultivos masivos de microalgas, puesto que ejercen una influencia indirecta, pero importante, sobre los procesos de crecimiento. Así, el oxígeno producido por las algas durante la fotosíntesis puede llegar a hallarse en una concentración tan elevada que inhiba aquélla (inhibición por producto final, llamada en este caso «efecto Warburg») y la producción del cultivo disminuya. Este riesgo se reduce si se agita el cultivo, con lo cual se favorece el paso del oxígeno a la atmósfera y, de ese modo, decrece su concentración en el agua.

Hay otro efecto desfavorable para los cultivos de algas planctónicas, en el cual intervienen la luz y el oxígeno: la fotooxidación. El oxígeno es un elemento tóxico para los organismos, quienes se protegen de él de muy distintas maneras. Las algas utilizan como protección los carotenoides, la superóxido dismutasa y otras moléculas que se combinan con el oxígeno en exceso, pero con intensidades luminosas elevadas, sobresaturación de oxígeno y ausencia de dióxido de carbono en el cultivo se produce el fenómeno de fotooxidación que mata las algas del cultivo y es capaz de acabar con éste en muy poco tiempo (RICHMOND, 1986b). Este fenómeno es especialmente delicado en el caso de los cultivos masivos de *Spirulina* (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986); otras algas, como *Dunaliella*, tienen medios para adaptarse mejor a la fotooxidación, tales como la acumulación masiva de β -caroteno, hecho que permite una aplicación biotecnológica adicional (véase más abajo).

Por otro lado, las algas también respiran; es decir, consumen oxígeno y lo hacen tanto en la luz como en la oscuridad. En la luz el fenómeno se denomina fotorrespiración (TOLBERT, 1974) y puede llegar a ser una causa importante de destrucción o excreción del carbono orgánico recién formado durante la fotosíntesis (FOGG, 1983). Este aspecto rara vez ha sido considerado en los cultivos masivos de algas, pero no por ello deja de tener su interés por cuanto reduce efectivamente la producción.

La concentración de oxígeno en el cultivo también es importante de noche, cuando no hay fijación de carbono, ya que entonces las algas exclusivamente respiran y, teniendo en cuenta su elevadísima densidad, pueden llegar a agotar el oxígeno disuelto y provocar situaciones de anoxia, también perjudiciales (BECKER & VENKATARAMAN, 1982).

El pH es otro aspecto delicado del cultivo masivo porque la ingestión del carbono inorgánico por las algas aumenta el pH del medio y desplaza el equilibrio hacia los carbonatos. Las algas no usan los carbonatos, con lo cual pueden encontrarse limitadas en su crecimiento por el carbono (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986). En cultivos masivos de algas bentónicas marinas estos aspectos no se han estudiado.

Carbono

Las principales fuentes de carbono inorgánico para el cultivo masivo de algas son el dióxido de carbono libre y el bicarbonato. Energéticamente, para las algas resulta más barato el primero puesto que aquél penetra por difusión en la célula, mientras que el bicarbonato lo hace por transporte activo (RAVEN, 1980). Por ello, cuando se trata de optimizar la producción, parece más aconsejable el añadir CO_2 .

Generalmente, en el cultivo masivo de microalgas con medio sintético se aporta dióxido de carbono mezclado con aire, ya que el contenido del

aire en CO_2 es muy bajo (0,036 % en volumen). Las proporciones del nutriente varían según los distintos autores, pero suelen situarse entre el 0,3 y el 5 % en volumen (WEISSMAN et al., 1978; HEUSSLER, 1985). Los estudios que se han realizado sobre la forma de administración del CO_2 a los cultivos masivos son varios (GOLDMAN et al., 1981; MÄRKL & MATHER, 1985; VÁSQUEZ & HEUSSLER, 1985) y no parece haberse propuesto todavía un sistema eficaz y de bajo coste económico. El método más comúnmente empleado consiste en inyectar CO_2 mezclado con aire en tuberías que desembocan en tubos perforados situados en el fondo de estanques de cultivo, pero parece ser que, dependiendo de la perforación de dichos tubos, pueden presentarse problemas porque las burbujas pequeñas inducen la flotación de las algas y la reducción, por tanto, de la producción y las grandes con un 1 % de CO_2 en aire producen narcosis en las células (GOLDMAN et al., 1981).

Aunque la mayor parte de las algas prefiere el dióxido de carbono como fuente inorgánica para el ciclo de Calvin, pueden usar alternatively el bicarbonato, ya que se ha comprobado que poseen anhidrasa carbónica, enzima catalizadora de la reacción $\text{CO}_2 - \text{CO}_3\text{H}^-$ en sistemas biológicos, habiéndose observado un transporte facilitado de $\text{CO}_3 - \text{H}^-$ a través de las membranas de las microalgas (SHELP & CANVIN, 1980). En el caso de escasez de CO_2 y presencia de bicarbonato, las algas no verían limitado su crecimiento porque: 1) el aprovisionamiento de CO_2 a los cultivos es más rápido de lo que ellas necesitan (GOLDMAN et al., 1974a), 2) la anhidrasa carbónica se produce en mayor cantidad cuando la presión parcial de CO_2 es baja (REED & GRAHAM, 1977).

Todo lo precedente se refiere al caso de un medio sintético de cultivo para crecimiento masivo de microalgas. Si el medio fuere agua residual, muy rica en carbono orgánico, la mineralización del mismo debida a las bacterias genera el CO_2 necesario para las algas. Hay un género de algas ampliamente utilizado en cultivos masivos que, sin embargo, prefiere el bicarbonato como fuente de carbono inorgánico. Se trata de *Spirulina*, grupo de organismos residente en ambientes con elevada concentración salina, aunque no de cloruros, como las masas de agua circundantes al lago Chad (ILTIS, 1974), los lagos carbonatados etíopes (TALLING et al., 1973) o el evaporador solar situado en el lago Texcoco de México («El Caracol»: SANTILLAN, 1982). *Spirulina* precisa unos $16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de bicarbonato para crecer óptimamente (ZARROUK, 1966).

BECKER & VENKATARAMAN (1982) han usado como fuente de carbono suplementaria los residuos de factorías azucareras y, aunque su efecto sobre el crecimiento es inferior al del CO_2 , podría ser una buena fuente adicional a la par que una manera de reutilizar dichos residuos. Otra fuente de carbono que han usado dichos autores ha sido la bosta de las vacas, transformada en CO_2 mediante un digestor anaerobio. En Perú (HEUSSLER et al., 1978a) se han usado los residuos de las alcoholeras -ctanol de

pobre calidad— como fuente de carbono tras su transformación en CO_2 en un digestor anaerobio.

Algunas cepas de microalgas del género *Chlorella* también se han cultivado masivamente en la oscuridad, teniendo como fuente de carbono ácido acético o glucosa (SOONG, 1980).

En los cultivos masivos de algas microscópicas marinas esta cuestión del carbono no ha sido muy estudiada (DE BUSK & RYTHER, 1984), pero las investigaciones precedentes indican que la aportación de carbónico y bicarbonato (controlando el pH mediante ácido clorhídrico) multiplica la producción por cinco respecto a los controles en *Gracilaria tikvahiae* (DE BUSK & RYTHER, 1984). De todos modos, dado el pH del agua de mar y el gran poder tamponador de ésta, la mayor parte de la especiación carbonada se encuentra en forma de bicarbonatos (STUMM & MORGAN, 1981) y los problemas con el CO_2 anteriormente reseñados para las microalgas no es verosímil que se produzcan.

Nitrógeno y Fósforo

De nuevo aquí queremos hacer la distinción entre si el medio de cultivo es sintético o no. En el primer caso, tenemos una enorme variedad de medios de cultivo aptos para casi cualquier grupo de algas que deseemos cultivar. Para esta clase, la fuente de nitrógeno más usada suele ser el nitrato, pero en aquéllos que se emplean para el cultivo masivo de microalgas tiene preferencia la urea. En efecto, a pesar de que la fuente preferida de nitrógeno por las algas es el amonio sobre el nitrato (MORRIS, 1974), el consumo de uno u otro desplaza el pH hacia la acidez o la alcalinidad, respectivamente, y si se desea tener un óptimo del pH para el crecimiento, parece más aconsejable la urea, la cual en ese sentido es inocua (GOLDMAN et al., 1982).

Si el medio de cultivo no es artificial, lo más probable es la presencia de amonio y urea simultáneamente, puesto que esa clase de medios suelen ser aguas residuales de distintos orígenes orgánicos y la degradación de las proteínas presentes en ellas producirá, entre otros compuestos, dichas fuentes de nitrógeno en gran cantidad. En ese caso, debe tenerse cuidado con las concentraciones de amonio debido a la toxicidad del amoniaco para las algas a concentraciones superiores a los 2 mM y pHs por encima de 8 (ABELIOVICH & AZOV, 1976), valores frecuentes en las aguas residuales. Normalmente suele solventarse dicho problema cultivando las algas que crecen espontáneamente en las mismas, mejor adaptadas a las peculiares condiciones de aquel medio que otras cepas provenientes de colecciones de cultivo. En relación con esto, RODULFO et al. (1982) han observado que las cepas autóctonas producen más que las importadas de alguna colección.

Para las algas macroscópicas marinas en cultivo masivo se usa preferentemente el nitrato, que es la forma nitrogenada más abundante en el mar (SVERDRUP et al., 1942), aunque no se desdeñe el amonio. SHACKLOCK et al. (1975) añaden nitrato amónico a los cultivos masivos de *Chondrus crispus*. PARKER (1974) observa aumentos del crecimiento de *Eucheuma spinosum* del 40-50 % respecto a los controles, añadiendo sulfato amónico en la zona de cultivos. Y la acuicultura a gran escala de *Laminaria japonica* ha usado intensivamente el sulfato amónico como fertilizante (ZENG, 1981).

Un caso especial de fuente nitrogenada es el nitrógeno molecular presente en el aire, utilizado por las Cianofíceas fijadoras. Que sepamos, al aire libre han sido cultivadas en USA (WEISSMAN et al., 1978), URSS (GROMOV & PINEVICH, 1972), India (BECKER & VENKATARAMAN, 1982), China (SHANG, 1988) y España (GARCÍA FONTES et al., 1987).

En cuanto al fósforo, poco se puede decir en relación con lo que nos ocupa. En los medios sintéticos la forma más usada es el ortofosfato. En algas bentónicas marinas este aspecto tampoco se ha considerado demasiado.

Pero más importante que el nitrógeno y el fósforo aislados es la relación entre ellos, sobre todo si se trabaja con cultivos discontinuos o con tiempos de retención largos. Hace tiempo ya se descubrió el balance de nutrientes considerado óptimo para el crecimiento de las algas planctónicas (REDFIELD, 1958), situándose en 16:1 (N:P, en átomos); sin embargo, más recientemente se ha observado que cada especie precisa de un valor propio (RHEE & GOTHAM, 1980) aunque, quizá, no excluyente.

Para algas bentónicas marinas se sabe poco de la importancia del cociente nutritivo N:P en cultivos masivos. Sin embargo, fertilizaciones $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ en la proporción molar 10:1 permiten a *Eucheuma uncinatum* crecer óptimamente en el verano, a pesar de las altas temperaturas, perjudiciales para ella (ZERTUCHE et al., 1987).

Interacciones bióticas

La de un cultivo masivo de algas tiene lugar con: zooplancton, parásitos, epiflora, epifauna, bacterias y otras algas.

El zooplancton puede ser un factor importante en la producción masiva por su consumo de las microalgas. Según BENEMANN et al. (1978), los tiempos de retención cortos inhiben el desarrollo del mismo, pero dichos autores suelen usar además pantallas con poros de 150 micras para eliminarlo de sus estanques de cultivo. LINCOLN et al. (1983) controlan la presencia de Rotíferos (*Brachionus rubens*) y Cladóceros (*Diaphanosoma brachiurum*) añadiendo una solución de hidróxido amónico hasta alcanzar concentraciones de $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ en nitrógeno, las cuales matan a los ani-

males, pero no afectan a las algas. Por otro lado, se sabe que las amebas destruyen los cultivos de *Spirulina* en poco tiempo (WAGENER & de LUCA, 1987). ARAD (1988) comprueba que incluso un Dinoflagelado (*Gymnodinium sp.*) preda sobre *Porphyridium* en cultivos masivos de esta Rodoficea. Otro fenómeno que puede reducir la producción masiva de microalgas es el desarrollo de parásitos de las mismas en los cultivos. BENEMANN et al. (1978) detectan la presencia de flagelados incoloros infectando las colonias de un cultivo masivo de *Scenedesmus*, cuyo resultado es la práctica eliminación de toda la población del alga. HEUSSLER et al. (1978b) mencionan también una infección por el mismo organismo, un hongo del género *Aphelidium*, y proponen un modelo matemático basado en la dinámica predador-presa para predecir el momento en que debe aplicarse un pesticida al cultivo. SOEDER (en HEUSSLER et al., 1978b) indica que en Dortmund se les presentaron infecciones del hongo *Chytridium* y de bacterias en cultivos masivos de *Scenedesmus*. MERINO et al. (1985) recomiendan karatane, antracol y maneb (distintos tiocarbamatos) como los pesticidas mejores, más económicos e inocuos para las algas que inhiben el desarrollo de parásitos.

En el caso de las algas bentónicas marinas, la presencia de epifauna y epiflora sobre los talos en cultivo ocasiona una serie de trastornos al crecimiento del cultivo. Así, en *Gracilaria verrucosa* se ha comprobado que la epifauna afecta negativamente al crecimiento, pero mejora la calidad del agar producido (CANCINO et al., 1987). En *Gracilaria tikvahiae* la colonización de los frondes por epifitos y epizoos acaba con el crecimiento masivo del alga cuando el cultivo se realiza a bajas intensidades luminosas (ZERTUCHE et al., 1988).

Las enfermedades debidas a bacterias se han investigado en *Laminaria japonica*, donde hasta la fecha se han identificado dos distintas (ZENG, 1981). La primera incide sobre las esporas produciendo esporofitos malformados que, cuando son adultos, se desprenden de las cuerdas de cultivo; la enfermedad se debe a la presencia de SH_2 en el medio de cultivo, el cual permite el desarrollo de bacterias reductoras de sulfatos y productoras de sulfuros, como *Micrococcus*. El remedio ha sido esterilizar el cultivo de esporas antes del trasplante a mar abierto.

La otra enfermedad de *L. japonica* está producida por micoplasmas, los cuales determinan la aparición de talos con rizoides insuficientemente desarrollados y frondes anormalmente entrelazados (ZENG, 1981). El tratamiento con tetraciclinas parece controlar la enfermedad.

En *Eucheuma* también se ha detectado otro trastorno diferente, llamado «ice-ice», que consiste en la deposición de un polvillo blanco sobre los frondes de la planta, con la consiguiente pérdida de pigmentos y descomposición y fragmentación ulteriores de los talos. La causa de esta enfermedad no se conoce bien aún, pero las bacterias no parecen ser el factor principal, sino uno coadyuvante (UYENCO et al., 1981).

La competencia con otras algas en el cultivo masivo de un alga determinada ha sido escasamente estudiada, pero también se produce. Por ejemplo, una cepa de *Chlorella* se instala en los cultivos masivos de *Spirulina* y reduce la producción de ésta al competir por los nutrientes. El remedio para evitarlo consiste en mantener el pH a valores elevados (11 aprox.), lo cual inhibe el crecimiento de dicha cepa de *Chlorella* (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986).

LA PRODUCCIÓN MASIVA DE ALGAS

Hay un hecho importante que debe resaltarse en relación con la producción masiva de algas (Fig. 4), el cual se desprende en buena parte de todo lo anterior: la producción es el resultado de un proceso sinérgico entre distintos factores que interactúan entre sí y con las algas, como, por ejemplo, la turbulencia y la luz, la fuente de nitrógeno y el pH, el zooplankton y el tiempo de retención, la luz y los epifitos, etc. Por lo tanto, si se desea cultivar algas en cantidades masivas, es preciso atender no sólo a cada factor concreto, sino también a las interacciones entre ellos.

Las producciones de algas en cultivo masivo varían considerablemente (Tabla 1). Los avances tecnológicos no han hecho sino incrementar dicha producción paulatinamente hasta un límite definido por un factor: la eficiencia de la transformación fotosintética (GOLDMAN, 1979b). En el aumento de este factor se basa en buena medida el futuro de la Biotecnología de las Algas (RICHMOND, 1987).

Los valores de producción mencionados en la bibliografía son muy dispares (Tabla 1), buena parte de ellos han sido conseguidos durante periodos breves y en las épocas más favorables del año (GOLDMAN, 1979a). El promedio mundial de producción masiva de microalgas se halla entre los 15 y 25 g (peso seco) $\cdot m^{-2} \cdot día^{-1}$ y las eficiencias máximas, en torno al 4-6 % (BENEMANN et al., 1978), aunque haya autores que citen valores de hasta el 10 % (GOH, 1986).

Comparativamente, el número de datos de producción masiva de algas macroscópicas es menor porque la estimación de la producción se realiza de otro modo. Las cifras disponibles, sin embargo, indican rangos comparables con los de las microalgas. No hemos encontrado datos sobre eficiencias.

La Tabla 2 presenta las producciones promedio de distintos productores primarios de la Biosfera, incluyendo la producción masiva de algas con objeto de permitir comparaciones. Aparentemente, las algas cultivadas se encuentran entre los vegetales más productivos, aunque deben hacerse notar las unidades usadas aquí ($Tm \cdot Ha^{-1} \cdot año^{-1}$) con las cuales se han uniformizado los valores de la tabla. En efecto, conocidos son los problemas de escala que impiden —por ahora— cultivar las algas en grandes

TABLA 2. Producción de distintos productores primarios [Tm. (peso seco) · Ha⁻¹ · año⁻¹] presentes en diferentes ecosistemas comparados con la producción de algas en cultivo masivo.

TABLE 2. Productivity of primary producers [Tm (dry weight) · Ha⁻¹ · y⁻¹] living in different ecosystems as compared with algal mass productivity.

Productor	Producción	Referencia
Cultivos masivos de algas	30-60	GOLDMAN (1979a)
Fitoplancton marino	1- 7	WASSINK (1975)
Fitoplancton dulceacuicola	0.5-1.5	WASSINK (1975)
Algas bentónicas marinas	12-15	WASSINK (1975)
Fanerógamas dulceacuicolas	7-11	WASSINK (1975)
Plantas del desierto	0.1-0.2	WASSINK (1975)
Tundra	2.2-4.5	WASSINK (1975)
Praderas	4-13	WASSINK (1975)
Bosque templado	5-20	WASSINK (1975)
Bosque tropical	25-70	WASSINK (1975)
Arroz	20-22	LOOMIS & GERAKIS (1975)
Trigo	18-30	LOOMIS & GERAKIS (1975)
Maíz	16-29	LOOMIS & GERAKIS (1975)
Cereales (Comunidad de Madrid)	2- 4	CABELLOS & SANCHO (1983)

superficies (RICHMOND, 1987); por ello, los datos de dicha tabla han de considerarse aún preliminares en cuanto concierne a la producción masiva de algas.

RECOLECCIÓN DE LA BIOMASA PRODUCIDA

Una vez alcanzado el estado estacionario de la producción, suele recolectarse parte de la biomasa producida. La proporción de biomasa que se retira del proceso depende de las condiciones de cultivo, fundamentalmente de los tiempos de retención utilizados.

En el caso de las algas bentónicas la recolección es muy simple, puesto que las algas están ligadas a un sustrato y, retirando éste del mar, se recogen las algas adheridas. Si no estuviesen fijas, como es el caso de *Gracilaria* o *Chondrus* en los cultivos a pequeña escala, la recogida se realiza manualmente.

El proceso se complica cuando se trata de algas planctónicas y se pretende separarlas del agua donde han crecido. Existen múltiples métodos de separación, pero ninguno de ellos resulta idóneo, bien por su ineficacia, la duración del proceso, bien por su coste. Los métodos propuestos hasta la fecha son los siguientes: filtración, centrifugación, floculación y sedimentación.

Normalmente, la biomasa obtenida se encuentra en el agua en una concentración que oscila entre 200-500 mg (peso seco) \cdot l⁻¹. Las técnicas habituales consiguen, como máximo, concentrarla dos órdenes de magnitud más (RICHMOND & BECKER, 1986).

La filtración requiere mano de obra abundante y cambio frecuente de los filtros (BECKER & VENKATARAMAN, 1982). La filtración es algo más eficiente si el cultivo era de algas filamentosas, como *Spirulina*.

La centrifugación es, quizá, el método más eficaz, aunque sigue siendo el método más caro, si bien se han propuesto recientemente sistemas de centrifugación de menor coste (RICHMOND & BECKER, 1986).

La sedimentación puede ser un método utilizable en el caso de las Diatomeas, cuya densidad es apreciablemente mayor que la del resto de las algas planctónicas (REYNOLDS, 1984), pero el resto de las algas cultivadas masivamente no sedimenta con facilidad y el método es poco eficaz (RICHMOND & BECKER, 1986). De todos modos, el método está insuficientemente explorado, ya que se sabe que los cultivos envejecidos sedimentan más deprisa (OLIVER et al., 1981), habiendo sido este hecho experimentado ya en cultivos masivos de *Scenedesmus* (LAVOIE & DE LA NOÛE, 1987).

La floculación es, por ahora, el método más aceptado. Esta floculación puede ser espontánea (autofloculación) o inducida por algún agente químico (floculación química). La autofloculación suele conseguirse mediante cambios súbitos en el ambiente que rodea a las células; un aumento en el pH, por ejemplo, induce una rápida sedimentación en cultivos masivos de *Scenedesmus* (RICHMOND & BECKER, 1986). El uso de algas más genuinamente bentónicas permite sedimentaciones más veloces, precedidas o no de floculación: es el caso de *Oscillatoria amphibia* (ÁLVAREZ COBELAS et al., 1984) o *Phormidium* sp. (DE LA NOÛE & PROULX, 1988).

La floculación química se ha conseguido mediante múltiples floculantes distintos. El mayor inconveniente de la misma, aparte del coste de la sustancia, radica en el uso posterior de la biomasa, pues suele impedirlo (caso de usos nutritivos o como fertilizantes). Las sustancias que se han probado han sido muy variadas: sulfato de aluminio, cloruro férrico, distintos polielectrolitos y quitosán (RICHMOND & BECKER, 1986). Este último ha sido usado en las experiencias realizadas en la India (BECKER & VENKATARAMAN, 1982) y tiene como ventaja el ser un producto de origen orgánico y, por tanto, digerible en nutrición animal o útil para la fertilización.

Por otro lado, un medio donde la floculación no parece eficaz es el agua marina, donde se ha comprobado que las dosis de floculante precisas para decantar el 90 % de la biomasa deben aumentar linealmente con la salinidad del medio (SUKENIK et al., 1988). El inconveniente se obvia usando polielectrolitos y floculantes inorgánicos o un pretratamiento en ozono seguido de floculación inorgánica.

INMOVILIZACIÓN

Como ya hemos visto, la separación de las microalgas respecto al medio en que viven es el aspecto menos logrado de toda la Biotecnología de las Algas. Por ello, a semejanza de los bacteriólogos (FLETCHER & MARSHALL, 1985), en microalgas ha comenzado a emplearse recientemente la inmovilización de las algas sobre (o en el interior) de una matriz sólida —orgánica o inorgánica—. Los materiales de soporte son muy variados, pero en general tienden a ser de escasa densidad y amplia superficie de contacto. Los principales utilizados han sido: agares, alginatos (Fig. 5), carrageninas y poliuretano, entre los orgánicos (ROBINSON et al., 1986), y sílice (DARNALL et al., 1986a) o silicatos micronizados (sepiolita: FIESTAS et al., 1988), entre los inorgánicos. Las algas que se han inmovilizado sobre soporte orgánico pertenecen a los principales grupos de algas planctónicas usados en Biotecnología (ROBINSON et al., 1986); sobre sílice se ha inmovilizado *Chlorella* (DARNALL et al., 1986a); sobre silicatos, sólo *Phormidium*, pero no *Chlorella* o *Scenedesmus* (datos inéditos). FATTOM & SHILO (1984), muestran que la hidrofobicidad es la causa de la adhesión en las Cianofíceas bentónicas *Phormidium* u *Oscillatoria*, pero la causa de la adhesión en algas planctónicas aún no se conoce bien (TAMPONNET et al., 1988). Las técnicas más habituales de inmovilización en agar o alginatos se describen en LUKAVSKY et al. (1986) o en LARA & GARCÍA GUERRERO (1985).

Los usos que se han propuesto para las algas inmovilizadas son análogos a los de las algas sin inmovilizar (ROBINSON et al., 1986), es decir, producción de sustancias, depuración de aguas, uso como fertilizantes, etc. El crecimiento de las algas inmovilizadas es similar al de las no inmovilizadas (datos inéditos en *Phormidium* inmovilizado sobre sepiolita) o ligeramente más lento (ROBINSON et al., 1988). Otros aspectos comparativos los revisa CODD (1987).

La separación de las algas inmovilizadas es muy rápida por decantación, cuando deja de airearse el cultivo.

Un inconveniente de la inmovilización suele ser que al cabo de varios meses, aunque siguen ejecutando eficazmente sus funciones vitales, las algas empiezan a desprenderse espontáneamente del soporte, fenómeno conocido con el nombre de «goteo» y que no se cita en las revisiones sobre el tema, aunque quienes trabajen en él lo comenten.

DESHIDRATACIÓN DE LA BIOMASA

Como es bien sabido, las algas pueden presentar un 90 % o más de su peso total en forma de agua. Antes de cualquier aplicación comercial, es preciso deshidratarlas, obtener biomasa seca. El método más antiguo y el más barato es el secado solar, que viene tradicionalmente siendo utilizado

desde la antigüedad con las algas marinas (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980). Este sistema también se ha usado con las algas microscópicas del género *Spirulina* (BECKER & VENKATARAMAN, 1982). Pero el método más empleado, aunque más costoso, es el de tambores de secado en caliente, en el cual el líquido que contiene las algas previamente concentrado es vertido sobre unos rodillos calentados artificialmente que van desecando paulatinamente la biomasa y la convierten en fino polvillo (RICHMOND & BECKER, 1986).

PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS DE INTERÉS QUÍMICO-FARMACÉUTICO

El que las algas poseen y producen gran cantidad de sustancias aprovechables por el Hombre es un lugar común en los textos de Botánica General y dicha producción se halla bien documentada en la monografía de CHAPMAN & CHAPMAN (1980). Aquí nos ocuparemos de las sustancias que se originan en condiciones controladas de cultivo masivo.

Un problema que debe sopesarse en el cultivo orientado hacia la producción de sustancias es que buena parte de éstas se maximizan en situaciones de «stress», es decir, suele haber una relación inversa entre producción del alga y producción de la sustancia de interés, por lo cual la estrategia debe ser una solución de compromiso si desea optimizarse la producción de una sustancia concreta.

Las algas bentónicas marinas producen tres tipos principales de polisacáridos: alginatos (Feofíceas), agares y carrageninas (Rodofíceas) (Tabla 3). La química de estos compuestos no la revisaremos aquí; el lector interesado puede consultar los trabajos de PERCIVAL (1979), PAINTER (1983) y MILLER (1987) en lo concerniente a este aspecto.

Las proporciones y la calidad de dichos compuestos en las algas cultivadas varían dependiendo de la especie (de la cepa, incluso), de las condiciones de cultivo y de la estación del año en que se haga la recolección de las algas (COIE & HANISAK, 1986). Así, por ejemplo, la producción de agar en *Gracilaria sp.* es mayor a salinidades del 17 ‰ que en salinidades más genuinamente marinas y menor cuando las plantas crecen a 32° C que cuando lo hacen a 24° C (BIRD, 1988). La fuerza del agar (su calidad) resulta mayor, sin embargo, a 32° C y salinidades del 33 ‰; el enriquecimiento de los cultivos con nitrógeno mejora la calidad del agar originado (cf. también BIRD et al., 1981, para *G. tikvahiae*), pero las salinidades bajas inhiben el efecto beneficioso del enriquecimiento del medio con nitrógeno. En general, la calidad del agar es mayor cuando las variaciones ambientales son menores (DAUGHERTY & BIRD, 1988). El enriquecimiento en nitrógeno también aumenta la calidad del gel en otras *Gracilariaceae* (CRAIGIE et al., 1984). Incluso se ha obtenido un mutante de *G. tikvahiae* con mejor calidad de agar que el de las poblaciones naturales (CRAIGIE et al., 1984). En cuan-

TABLE 3. Porcentaje de polisacáridos de interés comercial (respecto al peso seco) y fuerza del gel (en gr. cm⁻²) de distintas algas marinas en cultivo masivo. La fuerza del gel de calidad comercial, en torno a 200 gr. cm⁻² (FRIEDLANDER & LIPKIN, 1982). (1): distintas cepas.

TABLE 3. Polysaccharide fraction (percentage dry weight) and gel strength (gr. cm⁻²) of marine algae growing in mass cultures. Commercial gel strength is around 200 gr. cm⁻² (FRIEDLANDER & LIPKIN, 1982). (1): different strains.

Alga	Porcentaje	Fuerza del Gel	Referencia
		Agar	
<i>Gracilaria bursapastoris</i>	17-19	123-163	HOYLE (1978)
<i>G. coronopifolia</i>	27-28	10- 16	HOYLE (1978)
<i>G. cf. conferta</i>	31-41	52-249	FRIEDLANDER et al. (1987)
<i>G. edulis</i>	28-44	128-182	DURAIRATMAN (1987)
<i>G. edulis</i>	31-40	31-119	THOMAS & KRISHNAMURTY (1976)
<i>G. tikvahiae</i> ⁽¹⁾	23-32	35-280	COTE & HANISAK (1986)
<i>G. cf. verrucosa</i>	17	204	FRIEDLANDER & LIPKIN (1982)
<i>Gracilaria</i> sp. cepa G-16	17-30	465-965	BIRD (1988)
<i>Pterocladia capillacea</i>	28,5	448	FRIEDLANDER & LIPKIN (1982)
		Alginatos	
<i>Sargassum muticum</i>	12-21	—	GELLENBECK & CHAPMAN (1986)
<i>Undaria pinnatifida</i>	35-40	—	PEREZ et al. (1988)
		Carrageninas	
<i>Chondrus crispus</i>	44-60	—	SHACKLOCK et al. (1985)
<i>Echeuma striatum</i>	52-53	—	TIAN et al. (1988)
<i>Hypnea cornuta</i>	33	36	FRIEDLANDER & LIPKIN (1982)
<i>H. musciformis</i>	31	49	FRIEDLANDER & LIPKIN (1982)

to a la influencia de la alternancia de generaciones, parece no haber diferencias en el porcentaje y la calidad del agar entre gametofito y esporofito en *Gracilaria* (HOYLE, 1978); sin embargo, en *Undaria pinnatifida* el porcentaje de polisacáridos es superior en el esporofito (PÉREZ et al., 1988).

En *Hypnea musciformis* el porcentaje de carrageninas es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento y menor cuando se fertilizan los cultivos (GUIST et al., 1982). Este fenómeno se conoce con el nombre de «Neish effect» y fue observado por primera vez en *Chondrus crispus* (SHACKLOCK et al., 1975), donde la acumulación de carragenina se ve favorecida a temperaturas superiores a las de su óptimo crecimiento (SIMPSON & SACKLOCK, 1979). El tamaño apreciable de las algas bentónicas marinas y, por tanto, su exposición al medio de cultivo determinan que los contenidos en polisacáridos de las distintas porciones de las mismas suelen ser diferentes (SACKLOCK et al., 1975; TIAN et al., 1988).

Otra Rodoficea, ésta planctónica y microscópica, que también produce polisacáridos es el género *Porphyridium*. La composición química de los mismos no se conoce aún con detalle (ARAD, 1988), pero se trata de compuestos sulfatados y tienen aplicaciones industriales análogas a las de los polisacáridos de las algas macroscópicas marinas (RAMUS, 1986). La producción de dichos compuestos se ve favorecida en condiciones de carencia de sustancias nitrogenadas, lo cual se ha comprobado tanto en cultivos de células libres (ARAD, 1988) como de células inmovilizadas (THEPENIER et al., 1985). La composición de los polisacáridos varía con la fase del cultivo (ARAD, 1988), pero en un cultivo en fase estacionaria su proporción se halla entre un 20-40 % de la biomasa (THEPENIER et al., 1988).

Porphyridium también puede producir otras sustancias de elevado interés económico: ácidos grasos (araquidónico y eicosapentanoico: AHERN et al., 1983) y ficoeritrinas (BOROWITZKA, 1986). Los primeros son precursores en la síntesis de prostaglandinas y de sustancias farmacológicas que se usan en el tratamiento de ataques cardiacos (THEPENIER et al., 1988), mientras que las segundas tienen aplicaciones en las industrias alimentaria y cosmética (COHEN, 1986). La optimización de la producción de unos u otros productos depende de las condiciones de cultivo. Así, en cultivos estacionarios y deficientes en nitrógeno, se optimiza la producción de polisacáridos (20-40 % de la biomasa); la concentración de pigmentos aumenta (5-10 % de la biomasa) en cultivos en crecimiento exponencial que crezcan a bajas intensidades luminosas y a temperaturas subóptimas (THEPENIER et al., 1988). Dependiendo de la temperatura y de la concentración de células en el cultivo se optimiza la producción de ácidos grasos, que puede llegar a un 2,5 % del peso seco del alga; con bajas concentraciones celulares predomina el eicosapentanoico y con elevadas, el araquidónico; a bajas temperaturas hay más eicosapentanoico y con altas temperaturas el ácido araquidónico es el dominante (COHEN et al., 1988).

Otros productos que se extraen de las algas marinas incluyen antibióti-

cos, manitol, yodo, potasa, vitaminas, etc. (véanse CHAPMAN & CHAPMAN, 1980; HOPPE et al., 1979; HOPPE & LEVRING, 1982), pero -que sepamos- siempre se han extraído a partir de poblaciones naturales, nunca en cultivo controlado.

Chlorella es producida masivamente en Taiwan y Japón por industrias privadas para la obtención de un factor de crecimiento que favorece el de las bacterias del ácido láctico; dicho factor viene dado por un conjunto de sustancias presentes en las células y se usa en la industria alimenticia (SONG, 1980). En el año 1977 Taiwan produjo más de 1.000 tm de *Chlorella* seca mediante crecimiento masivo autótrofo y heterótrofo. Gran parte de dicha producción se utiliza en la industria dietética y para ciertos tratamientos médicos (SOONG, 1980).

El alga microscópica más cultivada para la obtención de sustancias químico-farmacéuticas es, sin duda, *Spirulina*. El motivo de ello es la elevada concentración de proteínas que contiene (hasta más del 70 % de la biomasa seca: DURAND-CHASTEL, 1980). El cultivo masivo de *Spirulina* ha sido muy estudiado en muchos lugares del mundo, aunque la información más completa la ofrecen los israelíes (VONSHAK & RICHMOND, 1988). Las mayores factorías que se hallan operando en la actualidad se encuentran en México (Sosa Texcoco), California (Earthrise Farms), Japón (Nippon-Spirulina), Taiwan (Blue Continent Chlorella), Bangkok (Siam Algae) y Hawaii (Cyanotech: VONSHAK & RICHMOND, 1988); la producción de las mismas se cifra entre las 30 y las 300 tm anuales de peso seco y la superficie dedicada al cultivo entre 2-12 ha (FOX, 1986). Pero *Spirulina*, además, contiene ficocianina como pigmento accesorio en concentraciones que pueden alcanzar el 20 % de su peso seco; este pigmento favorece la supervivencia de las ratas con cáncer de hígado (RICHMOND, 1986a). *Spirulina* es también una buena fuente del ácido graso llamado linolénico (1 % de su peso: BECKER & VENKATARAMAN, 1982).

Otra microalga que está siendo muy cultivada masivamente es la Cloroficea *Dunaliella*. Los principales productos originados por este alga son el glicerol y el β -caroteno. El primero lo produce *D. bardawil* en condiciones hipertónicas (BEN-AMOTZ et al., 1982) y puede llegar a acumularlo en un 40 % de su peso seco. El β -caroteno se produce en situaciones de deficiencia nutritiva y elevada radiación incidente (véanse los comentarios al fenómeno de fotooxidación mencionado más arriba: BEN-AMOTZ & AVRON, 1983). En *D. salina*, sin embargo, las máximas producciones de β -caroteno se obtienen con adición de nutrientes (MOULTON et al., 1987). El β -caroteno es un precursor de la vitamina A y se emplea, además, en la industria alimentaria como colorante.

Otra Cloroficea que produce sustancias valiosas es *Botryococcus braunii*, la cual acumula hidrocarburos hasta en un 80 % de su peso seco (BACHOFEN, 1982). Que sepamos, aún no se ha cultivado masivamente (cf. CASADEVALL et al., 1985), pero sí ha sido inmovilizada (BAILLIEZ et al., 1985). El

mayor inconveniente para su biotecnología reside en su lento crecimiento (BELCHER, 1968).

La obtención de amonio se ha experimentado en cultivos masivos de Cianofíceas fijadoras de nitrógeno. En efecto, *Anabaena variabilis*, por ejemplo, reduce el nitrógeno molecular a amonio, pero el bloqueo de la incorporación del amonio a los aminoácidos mediante un inhibidor de la glutamino-sintetasa induce la expulsión del amonio al medio de cultivo donde se encuentran creciendo las Cianofíceas (GARCÍA GUERRERO et al., 1982). El inhibidor más usado es la L-metionina D,L-sulfoximina (MSX), pero el inconveniente del proceso es que resulta caro a escala industrial por el elevado precio del bloqueante y, además, es tóxico para las algas (KERBY et al., 1988). Este inconveniente ha sido resuelto por KERBY et al. (1988) mediante la selección de mutantes no sensibles a la MSX y que son resistentes a la etilendiamina, un análogo del amonio; su nitrogenasa no se halla reprimida por el amonio y el que producen lo excretan. Estas experiencias también se han efectuado con *Anabaena azollae*, un simbiote del helecho *Azolla caroliniana* (BROUERS et al., 1988) y en Cianofíceas inmovilizadas (LARA & GARCÍA GUERRERO, 1985).

Una parte del proceso fotosintético finaliza con la producción del agua. Recientemente ha comenzado la fotoproducción de hidrógeno en cultivos de algas en los cuales el oxígeno se combina con algún agente químico, desactivando la hidrogenasa y produciendo hidrógeno. Este efecto se ha conseguido en *Spirulina* (GU & WANG, 1984), *Anabaena* (SPILLER & SHANMUGAM, 1986) y *Scenedesmus* (ROSENKRANS & KRASNA, 1984).

Otra sustancia que se ha obtenido de las algas es el metano, introduciendo la biomasa en un digestor anaerobio y permitiendo la reducción del carbono orgánico de la misma a metano. La digestión de *Sargassum muticum*, por ejemplo, origina $0,02-0,18 \text{ m}^3$ (metano) $\cdot \text{kg}^{-1}$ de biomasa volátil de algas (peso seco sin cenizas). *Gracilaria tikvahiae* en digestión anaerobia produce $0,4 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ de gas (60 % de metano: HANISAK, 1981) y *Enteromorpha prolifera*, $0,6 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ (57 % de metano: SCHRAMM & LEHNBERG, 1984). Estas cifras son comparables a las de la digestión de otros tipos de biomasa (KLASS, 1984).

Finalmente, hay un gas cuya producción por las algas es enorme, pero que hasta ahora apenas se ha aprovechado (BENOIT, 1964); el oxígeno. En China un cultivo de *Scenedesmus* de 31 l puede producir $30 \text{ l} \cdot \text{d}^{-1}$ de oxígeno (SHANG, 1988).

DEPURACIÓN DE AGUAS

Las algas, además de radiación solar, necesitan nutrientes para crecer. En las aguas residuales de origen orgánico (urbanas, agrícolas, ganaderas)

las sustancias nutritivas de carbono, nitrógeno y fósforo son muy abundantes, bien en forma orgánica o ya mineralizadas por las bacterias y convertidas en inorgánicas. Muchas algas pueden usar la materia orgánica como sustancia nutritiva, pero la materia inorgánica en las aguas residuales suele ser un componente importante. Por todo ello, es factible el crecimiento masivo de muchas especies de algas en agua residual pretratada (VELASCO et al., 1986) o no (ABELIOVICH, 1986). De hecho, esta clase de tratamiento lleva utilizándose en condiciones controladas desde hace más de treinta años (OSWALD & GOTAAS, 1957) y paulatinamente va siendo mejorado (DE PAUW & VAN VAERENBERGH, 1981). Se trata de un proceso barato y complementario a otras depuraciones; sería un tratamiento posterior al secundario aerobio (por bacterias de lodos activos) o anaerobio (por bacterias anaerobias en digestores cerrados) que generan algas como subproducto, susceptibles de aplicarse a otro uso.

El proceso, sin embargo, no se circunscribe sólo a la ingestión de nutrientes o materia orgánica por las algas. Estas indirectamente desencadenan otros procesos que contribuyen a la depuración. Su fotosíntesis origina oxígeno como uno de los productos finales, el cual contribuye a la oxidación de la materia orgánica. Además, la ingestión de carbono inorgánico desplaza el equilibrio carbónico-bicarbonatos hacia los carbonatos, aumentando el pH del medio y llegando éste en ocasiones hasta cifras próximas a 11. Dicho aumento del pH induce la formación de carbonato cálcico, poco soluble en agua (STUMM & MORGAN, 1981), el cual precipita formando un complejo con el fosfato (OTSUKI & WETZEL, 1972); de ese modo se retira fósforo del agua libre, depurándola. Además, los pH elevados inducen la disociación del ion amonio, formando amoniaco y un protón (TRUSSEL, 1972); el amoniaco -gas- pasa a la atmósfera, con lo cual también se elimina nitrógeno del agua residual.

Las algas empleadas en el tratamiento de aguas residuales han sido tanto planctónicas como bentónicas, macroscópicas o microscópicas, marinas o dulceacuícolas, inmobilizadas o no (Tabla 4). La depuración es bastante rápida y efectiva y depende en gran medida del tiempo de retención, puesto que tiempos de retención largos (diez días) prácticamente agotan el ortofosfato y el amonio en el agua libre (VELASCO et al., 1986).

Las algas pueden adsorber también metales pesados, formando compuestos organometálicos (MOUCHET, 1986). En *Chlorella vulgaris* se ha demostrado la adsorción de cobre, zinc, mercurio, plata y oro (DARNALL et al., 1986b), pero el alga no los ingiere. Modificando el pH de la solución, es posible liberar los metales pesados de las células (DARNALL et al., 1986a), siendo éste un proceso que aún no se ha puesto en práctica en cultivos masivos, pero que puede ser muy útil para depuración de aguas residuales industriales o recuperación de metales nobles muy diluidos en aguas corrientes (GREENE, 1986).

TABLA 4. Depuración de aguas residuales mediante algas en porcentaje de reducción. C: carbono inorgánico. DBO: demanda bioquímica de oxígeno. DQC: demanda química de oxígeno. N: nitrógeno inorgánico. P: fósforo inorgánico. ST: sólidos totales. (1): algas inmovilizadas sobre quitosán.

TABLE 4. Algal sewage water treatment (as percent efficiency). C: inorganic carbon. DBO: biochemical oxygen demand. N: inorganic nitrogen. P: inorganic phosphorus. ST: total solids. (1): chitosan immobilized algae.

Alga	Tipo de agua	Depuración	Tiempo de retención	Referencia
Cianofíceas	Residuo de azucarera	87 DBO 70 N 100 P	8-10 días	BALLONI et al. (1980)
<i>Chaetoceros</i> + <i>Phaeodactylum</i>	Residual urbana + agua de mar (1:3)	94-95 N 52-64 P	2 días	GOLDMAN et al. (1974b)
<i>Chlorococcales</i>	Residual urbana	64 DBO 24 DQO 74 N	4 días	BENEMANN et al. (1980)
<i>Chlorococcales</i>	Residual porcino diluido	68 DQO 94 NH ₄ 93 PO ₄	5-10 días	GROENEWEG et al. (1980)
<i>Chlorococcales</i>	Residual urbano	73 N 96P	3-4 días	SHELEF et al. (1980)
<i>Chlorococcales</i> + Cianofíceas	Residual urbano con pretratamiento aerobio	51-60 C 81-90 NH ₄ 73-90 P	4 días	VELASCO et al. (1986)
<i>Chondrus crispus</i>	Residual cultivo de ostras	87-95 N 47-60 P	—	GOLDMAN et al. (1974b)

ALIMENTACIÓN ANIMAL Y HUMANA

Probablemente el primer uso de las algas fuera para alimentación humana (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980). En Japón las algas bentónicas marinas componen una parte importante de la dieta (NISIZAWA et al., 1987). Las algas de agua dulce no son consumidas masivamente como alimento más que en algunas zonas de África o América, pero las cultivadas apenas se emplean con ese objeto (BECKER, 1986). En general, su valor nutritivo es elevado, pero presentan problemas de digestibilidad debido a su pared celular de celulosa (BECKER & VENKATARAMAN, 1982), aunque el tipo de deshidratación (véase más arriba) puede favorecer la digestibilidad; así, las algas secadas en tambores calientes se digieren mejor que las secadas al sol (BECKER & VENKATARAMAN, 1982). De todos modos, la importancia de las algas microscópicas en la dieta no debe menospreciarse; en especial, *Spirulina* se considera como una posible gran fuente de proteínas para los países hambrientos del globo (FOX, 1988). En el primer mundo *Spirulina* se consume bastante en pastillas para reducir el apetito. *Scenedesmus*, por otro lado, se ha probado con niños desnutridos a razón de 11 g diarios en la dieta sin ningún tipo de rechazo corporal y con una ganancia neta de 28 gramos de peso diarios frente a una dieta sin *Scenedesmus* (GROSS et al., 1978).

Las algas microscópicas se han usado en alimentación animal abundantemente. En particular, la alimentación de primeros estadios de consumidores primarios en acuicultura marina (Rotíferos, Moluscos, Crustáceos) se realiza a base de microalgas (WEBB & FU LIN, 1982; LUBIÁN, 1986) pertenecientes a distintos grupos taxonómicos: *Phaeodactylum* (Diatomea), *Isochrysis* (Crisofícea), *Tetraselmis* (Prasinofícea), *Nannochloris* (Clorofícea) son los principales géneros dedicados a este menester (DE PAUW, 1981). La mayor parte de los cultivos de microalgas continúan realizándose en bolsas cerradas y nunca en sistemas de mayores dimensiones al aire libre; este aspecto se considera como el principal «cuello de botella» de la acuicultura de Moluscos, ya que impide la extensión de la misma a superficies mayores (PERSOONE & CLAUS, 1980). El crecimiento de los Moluscos en fases post-larvarias debe, pues, realizarse con fitoplancton natural y no cultivado, pues las necesidades de biomasa algal son tan grandes que los cultivos masivos no son aún competitivos (DE PAUW, 1981); otra alternativa aún escasamente desarrollada consiste en inducir florecimientos de fitoplancton natural mediante adición controlada de nutrientes en las balsas donde engordan los Moluscos (DE PAUW, 1981).

Las algas microscópicas de agua dulce (*Scenedesmus*) también se han producido en sistemas integrados para alimentar carpas (SHELEF & AZOV, 1987) y parecen reunir las características que se esperan de ellas (SAND-BANK & HEPHER, 1978), siempre y cuando se hallen en concentraciones del 50-80 % de la dieta total (MESKE & PFEFFER, 1978), la digestibilidad de

las proteínas de las algas está en torno al 70-80 % del pienso de peces (SANDBANK & HEPHER, 1978).

También se han usado las microalgas en la alimentación de ganado porcino (BECKER, 1986). *Anabaena* y *Spirulina* se han dado como alimento a gallinas; los animales crecían más que los controles y los huevos presentan una yema más roja (SHANG, 1988). YANNAI & MOKADI (1985) demuestran que los pollos alimentados con una dieta con el 15 % de *Micractinium* que ha crecido en agua residual urbana crecen y se reproducen bien y son perfectamente seguros para el consumo humano. La administración de *Spirulina* a ratas en proporciones de hasta el 30 % de la dieta no supuso cambios en el crecimiento, el peso o la fertilidad durante tres generaciones respecto a los controles (CHAMORRO et al., 1985).

Por otro lado, las algas pardas *Ecklonia* y *Ascophyllum* se han administrado como complementos de la dieta a gallinas y cerdos con resultados negativos (MURAKAMI et al., 1984).

FERTILIZANTES

El uso de las algas bentónicas marinas como fertilizante es también antiguo (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980), aunque ya hace tiempo que se haya abandonado este uso en las agriculturas industrializadas.

Las algas planctónicas no han sido excesivamente utilizadas en este sentido, pero resultan un fertilizante barato y de simple aplicación, ya que concentran en su interior nitrógeno y fósforo y pueden administrarse a los cultivos mediante riego.

La mayor parte del uso como fertilizante se ha llevado a cabo en Asia. Las experiencias se han realizado con Cianofíceas fijadoras de nitrógeno atmosférico, cultivadas masivamente e inoculadas en los campos de arroz donde siguen viviendo y añaden nitrógeno orgánico a los cultivos. En China se han obtenido incrementos del 10-20 % respecto a los campos no fertilizados de este modo (SHANG, 1988). En la India se han obtenido resultados similares (VENKATARAMAN, 1986).

LA BIOTECNOLOGÍA DE LAS ALGAS EN ESPAÑA

El desarrollo de la Biotecnología de las algas en España es aún incipiente, pero a nuestro juicio el futuro parece halagüeño debido al clima favorable de que se goza en muchas porciones de la Península Ibérica y a que el rendimiento económico es evidente.

El principal uso de las algas cultivadas masivamente en España ha sido la acuicultura marina. Las microalgas se llevan usando varios años para la alimentación de Moluscos (GUERRERO et al., 1981), Crustáceos y

Rotíferos, tanto en Organismos de la Administración como en Empresas Públicas y Privadas. En los Centros del Instituto Español de Oceanografía (La Coruña, Vigo, Mar Menor), en los Institutos de Investigaciones Pesqueras del CSIC (Torre de la Sal, Puerto Real, Vigo) y en el Centro Experimental de Vilaxoán (Xunta de Galicia, Villagarcía de Arosa, Pontevedra) se producen masivamente microalgas marinas con dicho objetivo. Existe, además, una buena colección de cepas susceptibles de utilizarse en cultivos masivos que conserva y mantiene Luis Lubián (del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC, en Puerto Real, Cádiz). Las principales empresas que cultivan masivamente microalgas para acuicultura marina son las siguientes: Acuinova (Almería), Culmarex (Murcia), Cupimar, Pemares (Cádiz, cf. LUBIÁN, 1988 y LUBIÁN & CAÑAVATE, 1987), Esteros de Canela, Maresa (Huelva), Pescanova (Pontevedra), Prodemar (La Coruña) y Tinamenor, S. A. (Santander) (CENTRO DE DOCUMENTACIÓN EN ACUICULTURA, 1987).

Las algas bentónicas marinas, cuyas arribazones se emplean masivamente en la industria de agares, alginatos y carrageninas (Gomas Marinas, S. A., La Coruña; Hispanoagar, Burgos), no se han cultivado masivamente hasta ahora. Existe una patente para cultivos de algas estoloníferas, como *Gelidium*, en el mar (SEOANE, 1984), cuyos primeros resultados resultan alentadores.

En cuanto a producción de sustancias, sólo se ha intentado en Sevilla en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, en el cual se ha cultivado masivamente *Anabaena variabilis* para producir amonio (GARCÍA FONTES et al., 1987); la producción de amonio también la han conseguido en algas inmovilizadas sobre alginatos (LARA & GARCÍA GUERRERO, 1985). Además, en la actualidad se encuentran en las pruebas preliminares para el cultivo masivo de *Anabaenopsis*, otra Cianofícica fijadora de nitrógeno atmosférico, alga muy rica en el pigmento ficoeritrina. También poseen una importante colección de cepas.

La depuración de aguas residuales con microalgas se ha intentado a escala masiva en el Centro de Investigaciones del Agua (CSIC, VELASCO et al., 1985, 1986) con fondos de la extinta CAICYT. Los resultados fueron buenos y se disponía de una planta-piloto cuando se acabó la financiación. A escala de laboratorio, en el Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC, Sevilla) se han usado microalgas –inmovilizadas sobre silicatos– para depuración de aguas residuales pretratadas anaeróbicamente, con resultados también meritorios (FIESTAS et al., 1988).

AGRADECIMIENTOS

Un trabajo sobre un tema tan amplio como el presente no puede por menos que dejar olvidados multitud de detalles. Además, la orientación del mismo, la selección de aspectos e incluso la interpretación de los resultados son muy perso-

nales y, por tanto, discutibles. Por todo ello, nos gustaría agradecer el apoyo, la información y el consejo de las siguientes personas: José Luis Velasco, Luis Lubián, Miguel García Guerrero, José Antonio Fiestas, Amelia Gómez Garreta, Juan Antonio Seoane, Mercedes León, Lisette Trayieso, Wolfgang Becker y Joel de la Nouë. Los errores que pueda haber son enteramente nuestros. Santiago Pajarón ha leído una primera versión del manuscrito y sugerido numerosas mejoras. A Fernando Delgado se deben los dibujos.

APÉNDICE

ESPECIES DE ALGAS CITADAS EN LA REVISIÓN

Cyanophyceae

- Anabaena variabilis* Kütz. 1843.
A. azollae Strash. 1884.
Spirulina platensis (Nordst.) Geitl. 1925.
Tolypothrix tenuis Kütz. 1843.

Chlorophyceae

- Chlorella sorokiniana* Shih. et Krauss 1965.
Dunaliella bardawil Masyuk 1969.
D. primolecta Butcher 1957.
D. salina Teodoresco 1905.
D. tertiolecta Butcher 1959.
Enteromorpha linza (L.) J. Agardh 1883.
E. prolifera (O. F. Müll.) J. Agardh 1883.
Monostroma angicava F. R. Kjellman 1883.
Scenedesmus obliquus (Turp.) Kütz. 1833.

Diatomophyceae

- Chaetoceros gracilis* Schütt 1895.
Phaeodactylum tricorutum Bohlin 1897.

Haptophyceae

- Isochrysis galbana* Parke 1949.

Phaeophyceae

- Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt 1955.
Undaria pinnatifida (Harvey) Suringar 1873.

Prasinophyceae

- Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher 1959.

Rhodophyceae

- Chondrus crispus* Stackh. 1797.
Eucheuma cottonii Weber van Bosse 1928.
E. striatum Weber van Bosse 1928.
E. uncinatum Setch. et Gardn. 1924.
Gelidium pristoides (Turn.) Kütz. 1843.
Gracilaria bursapastoris (S. G. Gmelin) Silva 1952.
G.conferta (Schousb.) J. Feldm. et G. Feldm. 1942.
G. coronopifolia J. Agardh 1852.
G. edulis (S. G. Gmelin) Silva 1952.
G. foliifera (Forskaal) Boerg. 1932.
G. secundata Setch. et Gardn. 1937.
G. sjostedtii Kylin 1930.
G. tikvahiae McLachlan 1979.
G. verrucosa (Huds.) Papenfuss 1950.
Hypnea cornuta (Kütz) J. Agardh 1851.
H. musciformis (Wulfen) Lamour. 1813.
Laminaria japonica Areschoug 1851.
Palmaria palmata (L.) O. Kuntze 1891.
Porphyra yezoensis Ueda 1932.
Porphyridium cruentum (S. F. Gray) Näg. 1849.
Pterocladia capillacea (S. G. Gmelin) Papenfuss 1955.

Xanthophyceae

- Monallantus salina* Bourr. 1958.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELIOVICH, A. 1986. Algae in wastewater oxidation ponds. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 331-338. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- ABELIOVICH, A. & Y. AZOV. 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Environm. Microbiol.* 31: 801-806.
- AHERN, T. J., S. KATOH & E. SADA. 1983. Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1057-1070.
- ÁLVAREZ, M., J. L. VELASCO, F. PARRA, J. M. COLMENAREJO, A. RUBIO, M. RODRÍGUEZ, V. ALARIO, I. ORTIZ, N. MARTÍNEZ, P. GARCÍA & T. GALLARDO. 1984. Contribución al conocimiento autoecológico de *Oscillatoria amphibia* C.A. Ag. (Cyanophyceae). *Anales Biol.* 2 (Secc. Espec. 2): 39-44.
- ANSELL, A. D., J. E. G. RAYMONT, K. F. LANDER, E. CROWLEY & P. SHACKLEY. 1963. Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. II. The growth of *Phaeodactylum* and other species in outdoor tanks. *Limnol. Oceanogr.* 8: 184-206.
- ARAD, S. 1988. Production of sulfated polysaccharides from red unicellular algae. In M. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAFN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 65-87. Elsevier Applied Science, London and New York.

- BACHOFEN, R. 1982. The production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38: 47-49.
- BAILLIEZ, C., C. LARGEAU & E. CASADEVALL. 1985. Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 99-105.
- BALLONI, W., C. FILPI & G. FLORENZANO. 1980. Recent trends in the research of wastewater reclamation by photosynthetic bacterial and algal systems. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 217-227. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- BECKER, E. W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 339-419. CRC Press Inc., Boca Raton (Florida).
- BECKER, F. W. & L. V. VENKATARAMAN. 1982. *Biotechnology and Exploitation of Algae - The Indian Approach*. Central Food Technological Research Institute, Mysore, 216 pp.
- BEDDELL, G. W. 1985. Stimulation of commercial algal biomass production by the use of geothermal water for temperature control. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1063-1066.
- BEIJSCHER, J. H. 1968. Notes on the physiology of *Botryococcus braunii*, Kützing. *Arch. Mikrobiol.* 61: 335-346.
- BEN-AMOTZ, A., I. SUSSMAN & M. AVRON. 1982. Glycerol production by *Dunaliella*. *Experientia* 38: 49-52.
- BEN-AMOTZ, A. & M. AVRON. 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72: 593-597.
- BENEMANN, J. R., J. C. WEISSMAN, B. L. KOOPMAN, D. M. EISENBERG, R. P. GOEBEL & W. J. OSWALD. 1978. *Large scale freshwater Microalgal Biomass Production for Fuel and Fertilizer*. U.S. Dept. Energy SAN-0034-1, Washington, 186 pp.
- BENEMANN, J. R., B. L. KOOPMAN, J. C. WEISSMAN, D. M. EISENBERG & R. P. GOEBEL. 1980. Development of microalgae harvesting and high-rate pond technologies in California. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 457-495. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- BENOIT, R. J. 1964. Mass culture of microalgae for photosynthetic gas exchange. In D. F. JACKSON (Ed.), *Algae and Man*: 413-425. Plenum Press, New York.
- BIRD, K. T. 1988. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Bot. Mar.* 31: 33-39.
- BIRD, K. T., M. D. HANISAK & J. H. RYTHER. 1981. Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. *Bot. Mar.* 24: 441-444.
- BOCCI, F., G. TORZILLO, M. VINCENZINI & R. MATERASSI. 1988. Growth physiology of *Spirulina platensis* in tubular photobioreactors under natural light. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 219-228. Elsevier Applied Science, London and New York.
- BOROWITZKA, M. A. 1986. Microalgae as a source of fine chemicals. *Microbiol. Sci.* 3: 372-375.
- BROUERS, M., H. de JONG, D. J. SHI & D. O. HALL. 1988. Immobilized Cyanobacteria for sustained ammonia production. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 265-275. Elsevier Applied Science, London and New York.

- BURLEW, J. S. (Ed.). 1953. *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*. Carnegie Institute Publ. n. 600, Washington, 357 pp.
- BUSK, T. A. de & J. H. RYTHER. 1984. Effects of seawater exchange, pH and carbon supply on the growth of *Gracilaria tikvahiae* in large scale cultures. *Bot. Mar.* 27: 357-362.
- CABELLOS, N. & J. SANCHO. 1983. Madrid. Explotaciones agrarias: tipos y distribución espacial. *El Campo (Abril-Mayo)*: 59-65.
- CANCINO, J. M., M. MUÑOZ & M. C. ORELLANA. 1987. Effects of epifauna on algal growth and quality of the agar produced by *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. *Hydrobiologia* 151/152: 233-237.
- CARTER, A. R. & R. H. SIMONS. 1987. Regrowth and production capacity of Gelidium pristoides (Gelidiales, Rhodophyta) under various harvesting regimes at Port Alfred, South Africa. *Bot. Mar.* 30: 227-231.
- CASADEVALL, E., D. DIF, C. LARGEAU, C. GUDIN, D. CHAUMONT & O. DESANTI. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 286-295.
- CENTRO DE DOCUMENTACION EN ACUICULTURA. 1987. *Directorio Español de Acuicultura*. ICYT, CSIC, Madrid, 434 pp.
- CODD, G.A. 1987. Immobilized micro-algae and Cyanobacteria. *Brit. Phycol. Soc. Newslett.* 24: 1-5.
- COHEN, Z. 1986. Products from microalgae. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 421-454. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- COHEN, Z., A. VONSHAK, S. BOUSSIBA & A. RICHMOND. 1988. The effect of temperature and cell concentration on the fatty acid composition of outdoor cultures of *Porphyridium cruentum*. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 420-429. Elsevier Applied Science, London and New York.
- COTE, G. L. & M. D. HANISAK. 1986. Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. *Bot. Mar.* 29: 359-366.
- CRAIGIE, J. S., Z. C. WEN & J. P. van der MEER. 1984. Interspecific, intraspecific and nutritionally determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot. Mar.* 27: 55-61.
- CHAMORRO, G., M. SALAZAR, E. IZQUIERDO, S. SALAZAR & V. ULLOA. 1985. Multi-generation study on reproduction and lactation in rats fed with *Spirulina*. *Ergebn. Limnol.* 20: 165-171.
- CHAPMAN, V. J. & D. J. CHAPMAN. 1980. *Seaweeds and their Uses*. 3rd ed. Chapman and Hall, New York. 334 pp.
- CHENEY, D.P. 1986. Genetic engineering in seaweeds: applications and current status. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 22-29.
- DARNALL, D. W., B. GREENE, J. M. HOSEA, R. A. McPHERSON, M. T. HENZL & M. D. ALEXANDER. 1986a. Recovery of heavy metals by immobilized algae. *Proc. Symp. Trace Metal Removal from Aquaeus Solution Spec. Publ.* 61: 24 pp.
- DARNALL, D. W., B. GREENE, M. T. HENZL, J. M. HOSEA, R. A. McPHERSON, J. SNEDDON & M. D. ALEXANDER. 1986b. Selective recovery of gold and other metal ions from algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 20: 206-208.
- DAUGERTHY, B.K. & K. T. BIRD. 1988. Salinity and temperature effects on agar production from *Gracilaria verrucosa* strain G-16. *Aquaculture* 75: 105-113.

- DENFFER, D. von. 1949. Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. *Arch. Mikrobiol.* 14: 159-202.
- DILOV, C., D. GEORGIEV & M. BOZHKOVA. 1985. Cultivation and application of microalgae in the People's Republic of Bulgaria. *Ergebn. Limnol.* 20: 35-38.
- DODD, J. C. 1986. Elements of pond design and construction. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 265-283. CRC Press Inc., Boca Raton (Florida).
- DODGE, C. H. 1976. *Aquaculture in the Soviet Union*. Congressional Research Service, Library of Congress, Washington D.C. 237 pp.
- DREW, K. M. 1949. Conchocelis phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. *Nature* 164: 748-749.
- DROOP, M. R. 1983. 25 years of algal growth kinetics: a personal view. *Bot. Mar.* 26: 99-112.
- DURAIRATMAN, M. 1987. Studies on the yield of agar, gel strength and quality of agar of *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva from Brazil. *Hydrobiologia* 151/152: 509-512.
- DURAND-CHASTEL, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in México. In G. SHELF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 51-64. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- EL-FOULY, M. M., F. E. ABDALLA, A. M. SALEH, A. B. SHAHEEN & F. K. EL-BAZ. 1984. Technological and biochemical studies on mass production of algae in Egypt. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67: 461-478.
- FATTOM, A. & M. SHILO. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic Cyanobacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 47: 135-143.
- FIESTAS, J. A., M. ALVAREZ, R. BORJA & S. PERDIGUERO. 1988. Postratamiento de efluentes anaerobios mediante desarrollo de microalgas inmovilizadas sobre silicatos. *Actas IV Seminario sobre Depuración Anaerobia de Aguas Residuales*: 252-257.
- FLETCHER, M. & K. C. MARSHALL. 1985. Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria? *Adv. Microb. Ecol.*: 199-236. Plenum Press, New York.
- FOGG, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* 26: 3-14.
- FOGG, G. E. & B. THAKE. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. 3rd ed. Univ. Wisconsin Press, Madison. 269 pp.
- FOX, R. D. 1986. *Algoculture: la Spirulina, un Espoir pour le Monde de la Faim*. Edisud, Aix-en-Provence. 319 pp.
- FOX, R. D. 1988. Nutrient preparation and low cost basin construction for village production of *Spirulina*. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 355-364. Elsevier Applied Science, London and New York.
- FRIEDLANDER, M. & Y. LIPKIN. 1982. Rearing of agarophytes and carrageenophytes under field conditions in the Eastern Mediterranean. *Bot. Mar.* 25: 101-105.
- FRIEDLANDER, M., R. SHALEV, T. GANOR, S. STRIMLING, A. BEN-AMOTZ, H. KLAR & W. WAR. 1987. Seasonal fluctuations of growth rate and chemical composition of *Gracilaria cf. conferta* in outdoor culture in Israel. *Hydrobiologia* 151/152: 501-507.
- FUJITA, R. M. & J. C. GOLDMAN. 1985. Nutrient flux and growth of the red alga *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 28:265-268.

- GU TIAN QING & WANG FA ZHU. 1984. Studies on hydrogen evolution by *Spirulina platensis*. *Hydrobiologia* 116/117: 467-470.
- HANISAK, M. D. 1981. Methane production from the red seaweed *Gracilaria tikvahiae*. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 681-686.
- HANISAK, M. D. & J. H. RYTHER. 1986. The experimental cultivation of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae* as an «energy crop»: an overview. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 212-217.
- HARDER, R. & H. von WITSCH. 1942. Über Massenkultur von Diatomeen. *Ber. deutsche Bot. Ges.* 60:(146)-(152).
- HARRIS, G. P. 1986. *Phytoplankton Ecology. Structure, Function and Fluctuations*. Chapman and Hall Ltd., London. 384 pp.
- HARRIS, G. P. & B. B. PICCININ. 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton populations. *Arch. Hydrobiol.* 80: 405-457.
- GALLAGHER, J. C. 1986. Population genetics of microalgae. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 6-14.
- GARCIA FONTES, A., M. A. VARGAS, J. MORENO, M. GARCIA GUERRERO & M. LOSADA. 1987. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass* 13: 33-43.
- GARCIA GUERRERO, M., J. L. RAMOS & M. LOSADA. 1982. Photosynthetic production of ammonia. *Experientia* 38: 53-58.
- GELDENHUYS, D. J., R. D. WALMSLEY & D. F. TOERIEN. 1987. An investigation of a fertilizer-tap water medium for mass algal production in outdoor plastic-enclosed systems. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 153-156.
- GELLENBECK, K. W. & D. J. CHAPMAN. 1986. Feasibility of mariculture of the brown seaweed *Sargassum muticum* (Phaeophyta): growth and culture conditions, alginic acid content and conversion to methane. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 107-115.
- GOH, A. 1986. Production of microalgae using pig waste as a substrate. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 235-244.
- GOLDMAN, J. C. 1979a. Outdoor algal mass cultures. I. Applications. *Water Res.* 13: 1-14.
- GOLDMAN, J. C. 1979b. Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield. *Water Res.* 13: 119-136.
- GOLDMAN, J. C., J. H. RYTHER & L. D. WILLIAMS. 1975. Mass production of marine algae in outdoor cultures. *Nature* 254: 594-595.
- GOLDMAN, J. C., K. R. TENORE, J. H. RYTHER & N. CORWIN. 1974b. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment-marine aquaculture system. I. Removal efficiencies. *Water Res.* 8: 45-54.
- GOLDMAN, J. C., J. H. RYTHER & L. D. WILLIAMS. 1975. Mass production of marine algae in outdoor cultures. *Nature* 254: 594-595.
- GOLDMAN, J. C., M. R. DENNETT & C. B. RILEY. 1981. Inorganic carbon sources and biomass regulation in intensive microalgal cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 995-1014.
- GOLDMAN, J. C., M. R. DENNETT & C. B. RILEY. 1982. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 619-632.
- GREENE, B. 1986. Interaction of gold (I) and gold (II) complexes with algal biomass. *Environm. Sci. Technol.* 20: 627-632.

- GROENEWEG, J., B. KLEIN, F. MOHN, K. H. RUNKEL & E. STENGEL. 1980. First results of outdoor treatment of pig manure with algal-bacterial systems. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 255-264. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- GROMOV, B. V. & V. V. PINEVICH. 1972. Investigations of blue-green algae associated with some aspects of their mass cultivation. In T. V. DESIKACHARY (Ed.), *Taxonomy and Biology of Blue-Green Algae*: 574-584. Univ. Madras Press, Madras.
- GROSS, R., U. GROSS, A. RAMIREZ, K. CUADRA, C. COLLAZOS & W.FELDHEIM. 1978. Nutritional tests with green alga *Scenedesmus* with healthy and malnourished persons. *Ergebn. Limnol.* 11: 161-173.
- GUERRERO, S., T. FARINA & A. SILVA. 1981. Large-scale outdoor algal production for rearing feed oysters and clams to juvenile stage. In C. CLAUS, N. de PAUW & E. JASPERS (Eds.), *Nursery Culturing of bivalve Molluscs*: 117- 139. E.M.S. Spec. Publ. 7, Bredene.
- GUIST, G. G., C. J. DAWES & J. R. CASTLE. 1982. Mariculture of the red seaweed, *Hypnea musciformis*. *Aquaculture* 28: 375-384.
- GUMMERT, F., M. F. MEFFERT & H. STRATMAN. 1953. Non-sterile large-scale culture of *Chlorella* in greenhouse and open air. In J. S. BURLEW (Ed.), *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*: 166-176. Carnegie Institute Publ. n.º 600, Washington.
- GU TIAN QING & WANG FA ZHU. 1984. Studies on hydrogen evolution by *Spirulina platensis*. *Hydrobiologia* 116/117: 467-470.
- HANISAK, M. D. 1981. Methane production from the red seaweed *Gracilaria tikvahiae*. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 681-686.
- HANISAK, M. D. & J. H. RYTHER. 1986. The experimental cultivation of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae* as an «energy crop»: an overview. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 212-217.
- HARDER, R. & H. von WITSCH. 1942. Über Massenkultur von Diatomeen. *Ber. deutsche Bot. Ges.* 60:(146)-(152).
- HARRIS, G. P. 1986. *Phytoplankton Ecology. Structure, Function and Fluctuations*. Chapman and Hall ltd., London. 384 pp.
- HARRIS, G. P. & B. B. PICCININ. 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton populations. *Arch. Hydrobiol.* 80: 405-457.
- HARTIG, P., J. U. GROBBELLAAR, C. J. SOEDER & J. GROENEWEG. 1988. On the mass culture of microalgae: areal density as an important factor for achieving maximal productivity. *Biomass* 15: 211-221.
- HERRERO, C., B. CABEZAS, J. ABALDE & J. FABREGAS. 1985. *Avances en Tecnología de Microalgas para Nutrición Animal*. Univ. Santiago de Compostela, Monogr. Univ. 119. 100 pp.
- HEUSSLER, P. 1985. Development and results of Peruvian-German microalgae project. *Ergebn. Limnol.* 20: 1-8.
- HEUSSLER, P., J. CASTILLO, S. MERINO & F. MERINO. 1978a. Ecological balance of algal cultures in arid climates: major results of the Peruvian-German microalgae project at Trujillo. *Ergebn. Limnol.* 11:17-22.
- HEUSSLER, P., J. CASTILLO & F. MERINO. 1978b. Parasite problems in the outdoor cultivation of *Scenedesmus*. *Ergebn. Limnol.* 11: 223-227.
- HOPPE, H. A. & T. LEVRING (Eds.). 1982. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Vol. 2. Walter de Gruyter, Berlin. 309 pp.

- HOPPE, H. A., T. LEVRING & Y. TANAKA (Eds.). 1979. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. 807 pp.
- HOYLE, M. D. 1978. Agar studies in two Gracilaria species (*G. bursapastoris* (Gmelin) Silva and *G. coronopifolia* J. Ag.) from Hawaii. I. Yield and gel strength in the gametophyte and tetrasporophyte generations. *Bot. Mar.* 21: 343-345.
- ILTIS, A. 1974. *Le Phytoplancton des Eaux natronées du Kanem (Tchad)*. Thèse. Univ. Paris. 246 pp.
- JEWSON, D. H. & R. B. WOOD. 1975. Some effects on integral photosynthesis of artificial circulation of phytoplankton through light gradients. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 1037-1044.
- KAIN, J. M. & C. P. DAWES. 1987. Useful European seaweeds: past hopes and present cultivation. *Hydrobiologia* 151/152: 173-181.
- KERBY, N. W., G. W. NIVEN, P. ROWELL & W. D. P. STEWART. 1988. Ammonium and amino acid production by Cyanobacteria. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 277-286. Elsevier Applied Science, London and New York.
- KETCHUM, B. H. 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia closterium*. *Amer. J. Bot.* 26:399-407.
- KLASS, D. L. 1984. Methane from anaerobic fermentation. *Science* 223: 1021-1028.
- KOK, B. 1953. Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light. In J. S. BURLFELT (Ed.), *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*: 63-75. Carnegie Institute Publ. 600, Washington D.C.
- LAPOINTE, B. E., I. D. WILLIAMS, J. C. GOLDMAN & J. R. RYTHER. 1976. The mass outdoor culture of macroscopic marine algae. *Aquaculture* 8:9-21.
- LAPOINTE, B. E. & J. H. RYTHIER. 1979. The effects of nitrogen and seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* in mass outdoor cultures. *Bot. Mar.* 22:529-537.
- LARA, C. & M. GARCIA GUERRERO. 1985. Photosynthetic production of ammonia from atmospheric nitrogen by immobilized blue-green algae. *Actas Congr. C.O.M.P.L.E.S.* 23: 187-192.
- LAVOIE, A. & J. de la NOÛE. 1987. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewaters: auto- or bioflocculation? *Biotechnol. Bioeng.* 30: 852-859.
- LAWS, E. A., K. C. TERRY, J. WINKMAN & M. S. CHALUP. 1983. A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2319-2336.
- LEE, Y. K. & H. M. TAN. 1988. Genetic transformation through protoplast fusion in algae. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN, D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 101-109. Elsevier Applied Science, London and New York.
- LEHNBERG, W. & W. SCHRAMM. 1984. Mass culture of brackish-water-adapted seaweeds in sewage-enriched seawater. I. Productivity and nutrient accumulation. *Hydrobiologia* 116/117:276-281.
- LEVRING, T., H. A. HOPPE & O. J. SCHMID. 1969. *Marine Algae. A Survey of Research and Utilization*. Cram, De Gruyter & Co, Hamburg. 421 pp.
- LIGNELI, A. & M. PEDERSEN. 1986. Spray cultivation of seaweeds with emphasis on their light requirements. *Bot. Mar.* 29: 509-516.

- LIGNELL, A., P. EKMAN & M. PEDERSEN. 1987. Cultivation technique for marine seaweeds allowing controlled and optimized conditions in the laboratory and on a pilot scale. *Bot. Mar.* 30: 417-424.
- LINCOLN, E. P., T. W. HALL & B. KOOPMAN. 1983. Zooplankton control in mass algal cultures. *Aquaculture* 32: 331-337.
- LI REN ZHI, CHONG REN YI & MENG ZHAO CAI. 1984. A preliminary study of raft cultivation of *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria sjostedtii*. *Hydrobiologia* 116/117: 252-254.
- LI SHI YING. 1984. The ecological characteristics of monospores of *Porphyra yezoensis* Ueda and their use in cultivation. *Hydrobiologia* 116/117: 255-258.
- LOBBAN, C. S. & M. J. WYNNE (Eds.). 1981. *The Biology of Seaweeds*. Blackwell Sci. Publ., Oxford. 786 pp.
- LOBBAN, C. S., P. S. HARRISON & M. J. DUNCAN. 1985. *The physiological Ecology of Seaweeds*. Cambridge University Press, Cambridge. 242 pp.
- LOOMIS, R. S. & P. A. GERAKIS. 1975. Productivity of agricultural ecosystems. In J. P. COOPER (Ed.), *Photosynthesis and Productivity in different Environments*: 145-172. Cambridge University Press, Cambridge.
- LUBIAN, L. M. 1986. Cultivo de microorganismos para alimentación acuícola. *Experiencia* 90, Andalucía: 41-48.
- LUBIAN, L. M. 1988. Cultivo del fitoplancton. In J. JORDA (Ed.), *Curso de Acuicultura y Patología de Animales Acuáticos*: 9-19. Ed. Bilibis, Palma de Mallorca.
- LUBIAN, L. M. & J. P. CAÑAVATE. 1987. Producción masiva de microalgas en cultivos exteriores en la zona de Cádiz. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 12: 459-464.
- LUKAVSKY, J., J. KOMAREK, J. LUKAVSKA, J. LUDVIK & J. POKORNY. 1986. Metabolic activity and cell structure of immobilized algal cells (*Chlorella*, *Scenedesmus*). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73: 261-279.
- MAIRH, O. P., U. SOE HTUN & M. OHNO. 1986. Culture of *Euचेuma striatum* (Rhodophyta, Solieriaceae) in subtropical waters of Shikoku, Japan. *Bot. Mar.* 29: 185-191.
- MÄRKI, H. & M. MATHER. 1985. Mixing and aeration of shallow open ponds. *Ergebn. Limnol.* 20: 85-93.
- MARRA, J. 1978. Phytoplankton photosynthetic response to vertical movement in mixed layers. *Mar. Biol.* 46: 203-208.
- MATERASSI, R., M. TREDICI & W. BALLONI. 1984. Spirulina culture in seawater. *Appl. Environm. Biotechnol.* 19: 384-386.
- McLACHLAN, J. 1973. Growth media-marine. In J. R. STEIN (Ed.), *Handbook of Phycological Methods I*: 25-51. Cambridge University Press, Cambridge.
- MEER, J. P. van der. 1987. Using genetic markers in phycological research. *Hydrobiologia* 151/152: 49-56.
- MEER, J. P. van der. 1988. The development and genetic improvement of marine crops. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 1-15. Elsevier Applied Science, London and New York.
- MERINO, E., R. MOYA, A. RODRÍGUEZ & P. HEUSSLER. 1985. Control of the parasite *Aphelidium* sp. in mass cultures of *Scenedesmus obliquus* by chemical agents. *Ergebn. Limnol.* 20: 115-123.
- MESKE, C. & E. PFEFFER. 1978. Growth experiments with carp and grasscarp. *Ergebn. Limnol.* 11: 98-107.

- MICHANEK, G. 1975. *Seaweeds Resources of the Ocean*. F.A.O. Fisheries Techn. Paper 138: 1-127
- MILLER, I.J. 1987. Workshop on algal polysaccharides. *Hydrobiologia* 151/152: 189-191.
- MORGAN, K. C., P. F. SHACKLOCK & F. J. SIMPSON. 1980. Some aspects of the culture of *Palmaria palmata* in green house tanks. *Bot. Mar.* 23:765-770.
- MORRIS, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In W. D. P. STEWART (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*: 583-609. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- MORRIS, I. (Ed.). 1981. *The physiological Ecology of Phytoplankton*. Blackwell Sci. Publ., Oxford. 625 pp.
- MOUCHET, P. 1986. Revue des reactions des algues aux micro polluants minéraux et organiques; conséquences ecologiques et possibilites d'applications industrielles. *Water Res.* 20: 399-412.
- MOULTON, T. P., L. J. BOROWITZKA & D. J. VINCENT. 1987. The mass culture of *Dunaliella salina* for β -carotene: from pilot plant to production plant. *Hydrobiologia* 151/152: 99-105.
- MURAKAMI, Y., K. NISIZAWA, K. AWAYA, S. SUZUKI & S. IKEDA. 1984. Utilization of burst algal meal as feed for domestic animals and fowls. *Hydrobiologia* 116/117: 101-105.
- NICHOLS, H. W. 1973. Growth media - freshwater. In J. R. STEIN (Ed.), *Handbook of Phycological Methods I*: 7-24. Cambridge University Press, Cambridge.
- NISIZAWA, K., H. NODA, R. KIKUCHI & T. WATANABE. 1987. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia* 116/117: 5-29.
- NORTH, W., V. GERARD & R. McPEAK. 1981. Experimental fertilizing of coastal *Macrocystis* beds. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 613-618.
- NOÛE, J. de la & D. PROULX. 1988. Tertiary treatment of urban wastewater by chitosan-immobilized *Phormidium* sp. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 159-168. Elsevier Applied Science, London and New York.
- OLIVER, R. L., A. J. KINNEAR & G. G. GANF. 1981. Measurements of cell density of three freshwater phytoplankters by density gradient centrifugation. *Limnol. Oceanogr.* 26: 285-294.
- ORON, G. & G. SHELEF. 1982. Maximizing algal yield in high-rate oxidation ponds. *J. Environm. Eng. Div. ASCE* 108: 730-738.
- ORON, G., G. SHELEF & A. LEVI. 1981. Algal polymorphism in high rate wastewater treatment ponds. *Hydrobiologia* 77: 167-175.
- OSWALD, W. & H. B. GOTAAS. 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Amer. Soc. Civ. Engr.* 122: 73-105.
- OTSUKI, A. & R. G. WETZEL. 1972. Coprecipitation of phosphates with carbonates in a marl lake. *Limnol. Oceanogr.* 17: 763-767.
- PAINTER, T. J. 1983. Algal polisaccharides. In G. O. ASPINAL (Ed.), *The Polysaccharides*, Vol. 2: 195-285. Academic Press, London.
- PARKER, H. S. 1974. The culture of the red algal genus *Eucheuma* in The Philippines. *Aquaculture* 3: 425-439.
- PAUW, N. de 1981. Use and production of microalgae as food for nurserybivalves. In C. CLAUS, N. de PAUW & E. JASPERS (Eds.), *Nursery Culturing of bivalve Molluscs*: 35-69. E.M.S. Spec. Publ. 7, Bredene.
- PAUW, N. de & E. van VAERENBERGH. 1981. Microalgal wastewater treatment-systems:

- potentials and limits. *Atti Convegno Internat. Fittodepurazione e Impieghi delle Biomasse prodotte*: 211-287.
- PAYER, H. J., B. PITHAKPOL, M. NGUITRAGOOL, C. PRAHARAKSA, D. THANANUNKUL & S. CHAVANA. 1978. Major results of the Thai-German microalgae Project at Bangkok. *Ergebn. Limnol.* 11: 41-55.
- PERCIVAL, E. 1979. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Brit. Phycol. J.* 14: 103-117.
- PEREZ, R., P. DURAND, R. KAAS, O. BARBAROUX, V. BARBIER, C. VINOT, H. BOURGEAY-CAUSSE, M. LECLERCQ & J. Y. MOIGNE. 1988. *Undaria pinnatifida* on the French coasts cultivation method. Biochemical composition of the sporophyte and the gametophyte. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 315-327. Elsevier Applied Science, London and New York.
- PERSOONE, G. & C. CLAU. 1980. Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 265-285. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- PICARD, G. A., J. de la NOÛE, J. P. PIETTE & C. KIROUAC. 1980. Influence of cell efficiency and population of *Oocystis* sp. alga in the tertiary treatment of wastewater. *Arch. Hydrobiol.* 90: 75-89.
- PLATT, T. (Ed.). 1981. Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 1-346.
- POLNE-FULLER, M. 1988. The past, present and future of tissue culture and biotechnology of seaweeds. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 17-31. Elsevier Applied Science, London and New York.
- POLNE-FULLER, M., N. SAGA & A. GIBOR. 1986. Algal cell, callus, and tissue cultures and selection of algal strains. *Beih. Nova Hedwigia* 83:30-36.
- PROKOP, A. & M. FEKRI. 1984. Potential of mass algae production in Kuwait. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1282-1287.
- PROULX, D. & J. de la NOÛE. 1988. Removal of macronutrients from wastewaters by immobilized microalgae. In M. MOO-YOUNG (Ed.), *Bioreactor immobilized Enzymes and Cells*: 301-310. Elsevier Applied Science, Essex.
- RAMUS, J. 1981. The capture and transduction of energy. In C.S. LOBBAN & M. J. WYNNE (Eds.), *The Biology of Seaweeds*: 458-492. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- RAMUS, J. 1986. Rhodophytes unicells: biopolymers physiology and production. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 51-54.
- RAVEN, J. A. 1980. Nutrient transport in microalgae. *Adv. Microb. Physiol.* 21: 47-226.
- REDFIELD, A. C. 1958. The biological control of chemical control in the environment. *American Sci.* 46: 205-221.
- REED, M. L. & D. GRAHAM. 1977. Carbon dioxide and the regulation of photosynthetic enzymes and carbonate dehydratase (carbonic anhydrase) in *Chlorella* after growth or adaptation in different carbon dioxide concentrations. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 87-98.
- REYNOLDS, C. S. 1984. *The Ecology of freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. 384 pp.
- RHEE, G. Y. & I. J. GOTHAM. 1980. Optimum N-P ratios and the coexistence of planktonic algae. *J. Phycol.* 16: 486-488.
- RICHARDSON, K., J. BEARDALL & J. A. RAVEN. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 93: 157-191.

- RICHMOND, A. 1986a. Microalgae of economic potential. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 199-243. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- RICHMOND, A. 1986b. Outdoor mass cultures of microalgae. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 285-329. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- RICHMOND, A. 1987. The challenge confronting industrial microagriculture: high photosynthetic efficiency in large-scale reactors. *Hydrobiologia* 151/152: 117-121.
- RICHMOND, A. & E. W. BECKER. 1986. Technological aspects of mass cultivation: a general outline. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 245-263. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- RICHMOND, A. & J. U. GROBBELAAR. 1986. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass* 10: 253-264.
- RICHMOND, A. & A. VONSHAK. 1986. Management of *Spirulina* mass culture. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 222-223.
- ROBINSON, P. K., A. L. MAK & M. D. TREVAN. 1986. Immobilized algae: a review. *Proc. Biochemistry (Aug.)*: 122-127.
- ROBINSON, P. K., J. O. CHEEVE & K. H. GOULDING. 1988. Kinetics of phosphorus uptake by immobilized *Chlorella*. *Biotechnol. Lett.* 10: 17-20.
- RODRIGUEZ LOPEZ, M., M. L. MUÑOZ CALVO & M. VILLARROYA. 1981. Las microalgas: datos sobre su organización, estructura y biología. In *Productividad Vegetal*: 115-189. Ed. Universidad Complutense, Madrid.
- RODULFO, B. R., G. A. EMRALINO & N. H. MARMOL. 1982. Bench-scale production of *Chlorella* and *Scenedesmus*. *N.S.T.A. Technol. J.* 7 (3): 24-32.
- ROSENKRANS, A. M. & A. I. KRASNA. 1984. Stimulation of hydrogen photoproduction in algae by removal of oxygen by reagents that combine reversibly with oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1334-1342.
- RUENESS, J. & T. TANANGER. 1984. Growth in culture of four red algae from Norway with potential to mariculture. *Hydrobiologia* 116/117: 303-307.
- RYTHER, J. H., N. CORWIN, T. A. de BUSK & L. D. WILLIAMS. 1981. Nitrogen uptake and storage by the red alga *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan 1979). *Aquaculture* 26: 107-115.
- SAGA, N., M. POLNE-FULLER & A. GIBOR. 1986. Protoplasts from seaweeds: production and fusion. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 37-43.
- SANDBANK, E. & B. HEPHER. 1978. The utilization of microalgae as feed for fish. *Ergebn. Limnol.* 11: 108-120.
- SANTELICES, B. & R. UGARTE. 1987. Production of Chilean *Gracilaria*: problems and perspectives. *Hydrobiologia* 151/152: 295-299.
- SANTILLAN, C. 1982. Mass production of *Spirulina*. *Experientia* 38: 40-43.
- SCHRAMM, W. & W. LEHNBERG. 1984. Mass culture of brackish-water-adapted seaweeds in sewage-enriched seawater. II. Fermentation for biogas production. *Hydrobiologia* 116/117: 282-287.
- SFOANE, J. A. 1984. *Sistema de cultivo acuático de algas bentónicas marinas de tipo estolonífero*. Patente de Invención n. 527367: 11 pp. +3 pl.
- SHACKLOCK, P. F., D. R. ROBSON & F. J. SIMPSON. 1975. Vegetative propagation of *Chondrus crispus* (Irish moss) in tanks. *Techn. Rep. Atlantic Reg. Lab. NRCC* 21: 1-27.
- SHANG HAO LI. 1988. Cultivation and application of microalgae in People's Republic of China. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS,

- H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 41-54. Elsevier Applied Science, London and New York.
- SHARP, G. J. 1987. Growth and production in wild and cultured stocks of *Chondrus crispus*. *Hydrobiologia* 151/152: 349-354.
- SHELEF, G., R. MORAINÉ & G. ORON. 1978. Photosynthetic biomass production from sewage. *Ergebn. Limnol.* 11: 3-14.
- SHELEF, G., Y. AZOV, R. MORAINÉ & G. ORON. 1980. Algal mass production as an integral part of a wastewater treatment and reclamation system. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 163-189. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- SHELEF, G. & C. J. SOEDER (Eds.). 1980. *Algae Biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 852 pp.
- SHELEF, G. & Y. AZOV. 1987. HROP - The Israeli Experience. *Int. Conf. Waste Stabilization Ponds* 6: 13-19.
- SHELP, B. J. & D. T. CANVIN. 1980. Utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* 65: 774-779.
- SIMPSON, F. J. & P. F. SHACKLOCK. 1979. The cultivation of *Chondrus crispus*. Effect of temperature on growth and carrageenan production. *Bot. Mar.* 22: 295-298.
- SOEDER, C. J. 1976. The use of microalgae in nutrition. *Naturwissenschaften.* 63: 131-138.
- SOONG, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 97-113. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- SPECTOROVA, L. V., O. I. GORONKOVA, L. P. NOSOVA & O. N. ALBITSKAYA. 1982. High density culture of marine microalgae -promising items for mariculture. I. Mineral feeding regime and installations for culture *Dunaliella tertiolecta* Butch. *Aquaculture* 26: 289-302.
- SPILLER, H. & K. T. SHANMUGAM. 1986. Genetic modification of *Anabaena variabilis* for enhancement of H₂ evolution. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 3-5.
- STUMM, W. & J. MORGAN. 1981. *Aquatic Chemistry*. 2nd. ed. J. Wiley & Sons, New York. 780 pp.
- SUKENIK, A., D. BILANOVIC & G. SHELEF. 1988. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. *Biomass* 15: 187-200.
- SVERDRUP, H. U., M. W. JOHNSON & R. H. FLEMING. 1942. *The Oceans*. Prentice-Hall Inc., New York. 1087 pp.
- TALLING, J. F., R. B. WOOD, M. V. PROSSER & R. M. BAXTER. 1973. The upper limit of photosynthetic productivity by phytoplankton: evidence from Ethiopian soda lakes. *Freshwater Biol.* 3: 53-76.
- TAMIYA, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8: 309-334.
- TAMPONNET, C., J. N. BARBOTIN & R. CALVAYRAC. 1988. Conservation of photosynthetic cells immobilized in a calcium alginate gel: a calcium model? In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 255-264. Elsevier Applied Science, London and New York.
- THEPENIER, C., C. GUDIN & D. THOMAS. 1985. Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. *Biomass* 7: 225-240.
- THEPENIER, C., D. CHAUMONT & C. GUDIN. 1988. Mass culture of *Porphyridium cruentum*: a multiproduct strategy for the biomass valorization. In T. STADLER,

- J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 413-420. Elsevier Applied Science, London & New York.
- THOMAS, P. C. & V. KRISHNAMURTHY. 1976. Agar from cultured *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva. *Bot. Mar.* 19: 115-117.
- THOMAS, W. H., D. L. R. SEIBERT, M. ALDEN, A. NEORI & P. ELDRIDGE. 1984a. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. *Biomass* 5: 181-209.
- THOMAS, W. H., D. L. R. SEIBERT, M. ALDEN, A. NEORI & P. ELDRIDGE. 1984b. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. *Biomass* 5: 211-225.
- THOMAS, W. H., D. L. R. SEIBERT, M. ALDEN, A. NEORI & P. ELDRIDGE. 1984c. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. III. *Isochrysis* sp. and *Monallantus salina* experiments and comparative conclusions. *Biomass* 5: 299-316.
- TIAN MAO XIN, WEN ZONG CUN & WU CHAO YUAN. 1988. Effects of tissue age and season on the content and composition of carrageenan in *Eucheuma* species. In T. STADLER, J. MOLLION, M. C. VERDUS, Y. KARAMANOS, H. MORVAN & D. CHRISTIAEN (Eds.), *Algal Biotechnology*: 383-392. Elsevier Applied Science, London & New York.
- TOERIEN, D. F. & J. U. GROBBELAAR. 1980. Algal mass cultivation experiments in South Africa. In G. SHELEF & C. J. SOEDER (Eds.), *Algae Biomass*: 73-80. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- TOLBERT, N. F. 1974. Photorespiration. In W.D.P. Stewart (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*: 474-504. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- TOMASELLI, L., G. TORZILLO, L. GIOVANETTI, B. PUSHPARAJ, F. BOCCI, M. TREDICI, T. PAPPALÀ, W. BALLONI & R. MATERASSI. 1987. Recent research on *Spirulina* in Italy. *Hydrobiologia* 151/152: 79-82.
- TRAVIESO, I. & F. BENITEZ. 1987. Microalgae continuous culture on pretreated cane sugar mill wastes. *Wiss. Z. TH Lenna-Merseburg* 29:217-221.
- TRUSSEL, R. P. 1972. The percent of un-ionized ammonia in aqueous ammonia solutions at different pH levels and temperatures. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29: 1505-1507.
- TSUKADA, O., T. KAWAHARA & S. MIYACHI. 1977. Mass culture of *Chlorella* in Asian countries. In A. MITSUI, S. MIYACHI & A. SANPIETRO (Eds.), *Biological Solar Energy Conversion*: 363-365. Academic Press, New York.
- UYENCO, F. R., I. S. SANIEL & G. S. JACINTO. 1981. The «ice-ice» problem in seaweed farming. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 625-630.
- VASQUEZ, V. & P. HEUSSLER. 1985. Carbon dioxide balance in open air mass culture of algae. *Ergebn. Limnol.* 20: 95-113.
- VELASCO, J. L., M. ÁLVAREZ, F. PARRA, J. M. COLMENAREJO, A. RUBIO, M. ARAÚZO, M. RODRÍGUEZ & V. ALARIO. 1985. Producción de biomasa de microalgas a partir de aguas residuales urbanas en balsas al aire libre. *Actas Congr. Nac. Química* 6 (4): 587-594.
- VELASCO, J. L., J. M. COLMENAREJO, M. ALVAREZ & A. BUSTOS. 1986. Impacto ambiental de los vertidos de aguas residuales urbanas. I. Depuración integral con recuperación de nutrientes mediante tratamiento terciario con microalgas. *Química e Industria* 32: 475-478.

- VENDLOVA, J. 1969. Les problemes de la technologie de la culture des algues sur une grande echelle dans les installations au dehors. *Annali Microbiol.* 19: 1-12.
- VENKATARAMAN, L.V. 1986. Blue-green algae as biofertilizer. In A. RICHMOND (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*: 455-471. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).
- VONSHAK, A. & A. RICHMOND. 1985. Problems in developing the biotechnology of algal biomass production. *Plant and Soil* 89:129-135.
- VONSHAK, A. & A. RICHMOND. 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15: 233-249.
- WAALAND, J. R., L. G. DICKSON, E. C. S. DUFFIELD & G. M. BURZYCKI. 1986. Research on *Porphyra* aquaculture. *Beih. Nova Hedwigia* 83: 124-131.
- WAGENER, K. & A. de LUCA. 1987. The mass cultivation of *Spirulina platensis* in Brazil. *Hydrobiologia* 151/152: 69-70.
- WASSINK, E. C. 1975. Photosynthesis and productivity in different environments. In J. P. COOPER (Ed.), *Photosynthesis and Productivity in different Environments*: 675-687. Cambridge University Press, Cambridge.
- WATANABE, A., A. HATTORI, Y. FUJITA & T. KIYOHARA. 1959. Large scale culture of a blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*, utilizing hot spring and natural gas as heat and carbon dioxide. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5:51- 57.
- WEBB, K. L. & E. C. FU LIN. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. *World Maric. Soc. Spec. Publ.* 2: 272-291.
- WEISSMAN, J. C., D. M. EISENBERG & J. R. BENEMANN. 1978. Cultivation of nitrogen-fixing blue-green algae on ammonia-depleted effluents from sewage oxidation ponds. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 299-316.
- WOOD, A. 1987. A simple wastewater treatment system incorporating the selective cultivation of a filamentous algae. *Water Sci.Technol.* 19: 1251-1254.
- WU CHAO YUAN & LIN GUANG GHENG. 1987. Progress in the genetics and breeding of economic seaweeds in China. *Hydrobiologia* 151/152:57-61.
- YANNAI, S. & S. MOKADY. 1985. Short-term and multi-generation toxicity tests of algae grown in wastewater as a source of protein for several animal species. *Ergebn. Limnol.* 20: 173-180.
- YONESHIGUE, Y. & E. C. de OLIVEIRA. 1987. Preliminary experiments on the cultivation of the brown alga *Laminaria* (Phaeophyta) Lamouroux in Brazil. *Hydrobiologia* 151/152: 381-385.
- YOUNG MENG CHIANG. 1981. Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophycophyta, Gigartinales) in Taiwan. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 569-574.
- ZARROUK, C. 1966. *Contribution à l'étude d'une Cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch. et Gardn.) Geitl.* Thèse. Univ. Paris. 263 pp.
- ZENG CHENG KUI. 1981. Marine phycoculture in China. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 123-152.
- ZERTUCHE, J. A., Z. GARCIA EZQUIVEL & B. H. BRINKHUIS. 1987. Cultivo en tanques exteriores del alga roja *Euचेuma uncinatum* del Golfo de California. *Ciencias Marinas* 13: 4-18.
- ZERTUCHE, J. A., C. G. SCHLENK & B. H. BRINKHUIS. 1988. Cultivo de *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan) (Rhodophyta, Gigartinales) en aguas no protegidas. *Ciencias Marinas* 14: 15-29.