

***Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas AMTI-RAS: Influencia en su desarrollo del pH y de la reserva alcalina del medio de cultivo**

***Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas AMTI-RAS: Influencia no seu desenvolvemento do pH e da reserva alcalina do medio de cultivo**

***Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) as a biofilter in IMTA-RAS systems: Influence in its development of pH and alkaline reserve of the culture medium**

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Grupo de investigación en Biología Costera (BioCost)
Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)

Tutor: Javier Cremades Ugarte



Carla Lodeiros Chacón
A Coruña, 2017

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivo.....	7
4. Material y métodos.....	7
4.1 Descripción de la especie a estudiar.....	7
4.2 Determinación del peso húmedo, tasa de crecimiento y eficiencia biofiltradora.....	7
4.3 Determinación de nitratos y reserva alcalina.....	9
4.4 Estudio morfológico.....	9
4.5 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrógeno y proteínas.....	10
4.6 Sistema de cultivo en tanque.....	10
4.7 Diseño experimental.....	12
4.8 Análisis estadístico.....	12
5. Resultados y discusión.....	13
6. Conclusiones.....	20
7. Referencias bibliográficas.....	21

1. Resumen

El alga verde *Ulva ohnoi* (Ulvales, Chlorophyta) por su facilidad de cultivo, productividad, alto contenido proteico y en otros nutrientes esenciales, se considera una especie potencialmente ideal para la biofiltración de efluentes acuícolas o su incorporación en sistemas de AMTI, tanto abiertos como de recirculación de agua (RAS). Su empleo en este tipo de sistemas conlleva una serie de beneficios derivados de la reducción del impacto ambiental y el aumento de la eficiencia y rentabilidad económica.

Con el fin de establecer pautas para la optimización del cultivo de esta especie en sistemas de AMTI-RAS el objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio de la influencia en el mismo de las variaciones de pH y de la reserva alcalina del agua, variables que pueden modificarse mucho en este tipo de sistemas. Para ello se realizó una experiencia en que se comparaba un sistema con regulación de estos parámetros mediante la inyección automática de CO₂ frente a otro no regulado en el de manera natural se producen fuertes oscilaciones de pH en función de la actividad fotosintética y una pérdida paulatina de la reserva alcalina a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas tanto en las tasas de crecimiento como en la productividad de ambos sistemas, siendo estos parámetros significativamente mayores bajo condiciones de regulación de pH. Estos resultados parecen ser debidos más al agotamiento de la reserva alcalina del agua que a las oscilaciones del pH. En un sistema AMTI-RAS donde se integren peces y algas los primeros van a mantener la reserva alcalina por el aporte de CO₂ al agua, a su vez las algas consumirán CO₂ y oxigenarán el sistema, lo que sin duda es una prueba evidente del beneficio de la integración del cultivo de ambos organismos en sistemas AMTI-RAS.

2. Introducción

La acuicultura es el sector de producción animal de mayor crecimiento en los últimos años, representando el 50% de pescado y productos pesqueros destinados a la alimentación a nivel mundial (FAO, 2016). El aumento de los efluentes sobre las aguas costeras con altos contenidos en fósforo y nitrógeno es producto en parte de la acuicultura intensiva, generando la eutrofización del medio y la aparición de “mareas verdes” o “blooms” fitoplanctónicos dañinos para el ecosistema. Parte de este nitrógeno y fósforo suministrado en los piensos para la alimentación de peces es excretado por éstos en forma disuelta o particulada. El desarrollo de los sistemas productivos multitróficos integrados, entre otros avances de la investigación en la acuicultura, ayudan a mitigar los efectos ambientales de los cultivos marinos. Por ello los sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) son beneficiosos para una industria acuícola tanto ambiental como socioeconómicamente sostenible (Hernández *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2010). Con la finalidad de reducir costes de producción y uso de fertilizantes y, por ende, impacto medioambiental, se pueden emplear las macroalgas que funcionan como trampas de nitrógeno y carbono reduciendo la carga de nutrientes proveniente de los efluentes. (Jiménez del Río *et al.*, 1996). La optimización en la reducción de los nutrientes disueltos presentes en los efluentes acuícolas requiere por ello de la selección apropiada de las especies de algas a utilizar y del conocimiento de los nutrientes requeridos en particular para cada especie.

Estudios anteriores (Neori *et al.*, 1991; Neori, 1996; Schuenhoff *et al.*, 2003; Lüning & Pang, 2003; Wang *et al.*, 2007) indican que las especies del género *Ulva* Linnaeus son potencialmente ideales para la biofiltración de los efluentes acuícolas e inclusión en los sistemas de AMTI, tanto en sistemas abiertos como en los de recirculación de agua (RAS). Esto se debe a que las especies de este género: i) pueden desarrollarse en aguas de salinidades variables, ii) toleran altas concentraciones de nutrientes, iii) muestran una alta tasa de crecimiento y eficiencia biofiltradora y iv) son fácilmente cultivables por sencillas técnicas de propagación vegetativa. Pero no solo es interesante el uso de las especies de *Ulva* en sistemas de AMTI por su capacidad de biofiltración, sino que también lo es por el valor y potencialidad de uso de la biomasa obtenida en: i) la alimentación humana, debido a su alto contenido en proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales, compuestos bioactivos (antioxidantes, antibacteriales, antivirales, anticancerígenos, etc.) y bajo en lípidos (Plaza *et al.*, 2008) ii) la alimentación en acuicultura, lo que permite formular piensos menos grasos y con tasas de aceptación más altas (Valente *et al.*, 2006; Vizcaíno *et*

al., 2015) iii) la creación de nuevos materiales como biocauchos (Carrasco, 2008) o iv) la generación de biocombustibles (Montingelli *et al.*, 2015) entre otras aplicaciones. En los sistemas de recirculación de agua pueden tener además un importante papel en la reducción de costes operacionales debido a una mayor reutilización del agua.

El equipo de investigación en Biología Costera (BioCost) de la Universidade da Coruña lleva ya varios años trabajando dentro del proyecto de investigación “IntegRAS”: “Optimización del diseño y manejo de sistemas de cultivo multitróficos en recirculación peces-macroalgas (AGL2013-41868-R)”, financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 (MINECO), en la optimización del cultivo de distintas especies de *Ulva* para su integración en cultivos de lenguado (*Solea senegalensis*) en sistemas en tierra con recirculación de agua (IMTA-RAS). Estos estudios han concluido que por razones tanto de productividad, alto contenido proteico y en otros nutrientes esenciales, capacidad de biofiltración y valor de la biomasa obtenida que la especie de *Ulva* de elección entre todas las ensayadas es *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada, (Casais & Couce, 2016).

Entrando ya en la materia del presente trabajo se debe indicar que los diferentes niveles de pH juegan un papel muy importante en la fotosíntesis y la captación de carbono en plantas terrestres y algas. La mayoría de las algas pueden utilizar como fuente de carbono directamente el disuelto en el agua o el ion bicarbonato (HCO_3^-) a través de distintos procesos metabólicos (Hurd *et al.*, 2014). En ambientes confinados la asimilación de carbono en forma de CO_2 o HCO_3^- durante el proceso fotosintético eleva el pH del medio al alterar el equilibrio entre el CO_2 , HCO_3^- y CO_3^{2-} y puede ir agotando la reserva alcalina del agua. En líneas generales las especies propias de mar abierto son muy estenóicas frente al pH, debido a que éste se mantiene muy constante por el efecto tampón del equilibrio anterior, pero las especies propias de marismas o que suelen vivir en ambientes confinados durante la bajamar, como es el caso de las especies del género *Ulva*, pueden tolerar las amplias variaciones de pH propias de esos ambientes sin que ello aparentemente repercuta en su viabilidad, aunque podrían tener algún efecto desde el punto de vista productivo (Bidwell, 1993). Dado que los sistemas de cultivo en recirculación se comportan de alguna manera como ambientes confinados, en este trabajo se pretende profundizar en la importancia de las variaciones de pH o alteraciones de la reserva alcalina del agua en el

crecimiento y composición química de *Ulva ohnoi* con vistas a la optimización del diseño y manejo de este tipo de sistemas de cultivo.

3. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio de la influencia de las variaciones de pH y de la reserva alcalina del cultivo de *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada y, en su caso, establecer las pautas para la optimización del mismo en función de estos parámetros en sistemas de AMTI en recirculación.

4. Material y métodos

4.1 Descripción de la especie a estudiar

La especie empleada para este estudio fue *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada (Ulvales, Chlorophyta). Se trata de una especie con distribución meridional (aguas cálidas y alta intensidad lumínica), que se caracteriza por presentar talos laminares diestromáticos, de color verde brillante con brillo metálico y de forma orbicular, ovada u obovada, en ocasiones irregular, que se fijan al sustrato mediante un pequeño disco. El grosor de la lámina varía entre 30 y 55 μm en la zona apical-media y entre 80 y 90 μm en la zona basal. La lámina en su margen suele ser lisa, aunque puede presentar pequeñas protuberancias originadas por grandes células voluminosas o, incluso, prolongaciones celulares macroscópicas a modo de dientes o espinas romas. En visión superficial las células son poligonales o cuadrangulares con 1 a 3 pirenoides por célula (Hiraoka *et al.*, 2004).

La identificación de la especie se realizó en base a sus características morfológicas y moleculares (*rbcL* barcode). El análisis molecular fue realizado por la empresa AllGenetics.

4.2 Determinación del peso húmedo, tasa de crecimiento y eficiencia biofiltradora

El cálculo del peso húmedo inicial y final de cada experiencia se realizó retirando el exceso de agua mediante el empleo de una centrifugadora manual. El incremento de peso húmedo diario fue realizado por simple drenaje del agua en una malla durante 30 minutos, con el objeto de no someter al estrés y rotura mecánica a los ejemplares que hubiera supuesto su centrifugado diario. Todos los pesos fueron realizados con una báscula MOBBA Mod. MINI de precisión 0,001 kg.

La tasa de crecimiento (% de incremento de peso d-1), que permite estimar el potencial que tienen las especies para su cultivo, fue calculada según la siguiente expresión:

Tasa de crecimiento: $100 \times [\ln(\text{peso húmedo final/peso húmedo inicial}) / \text{tiempo}]$

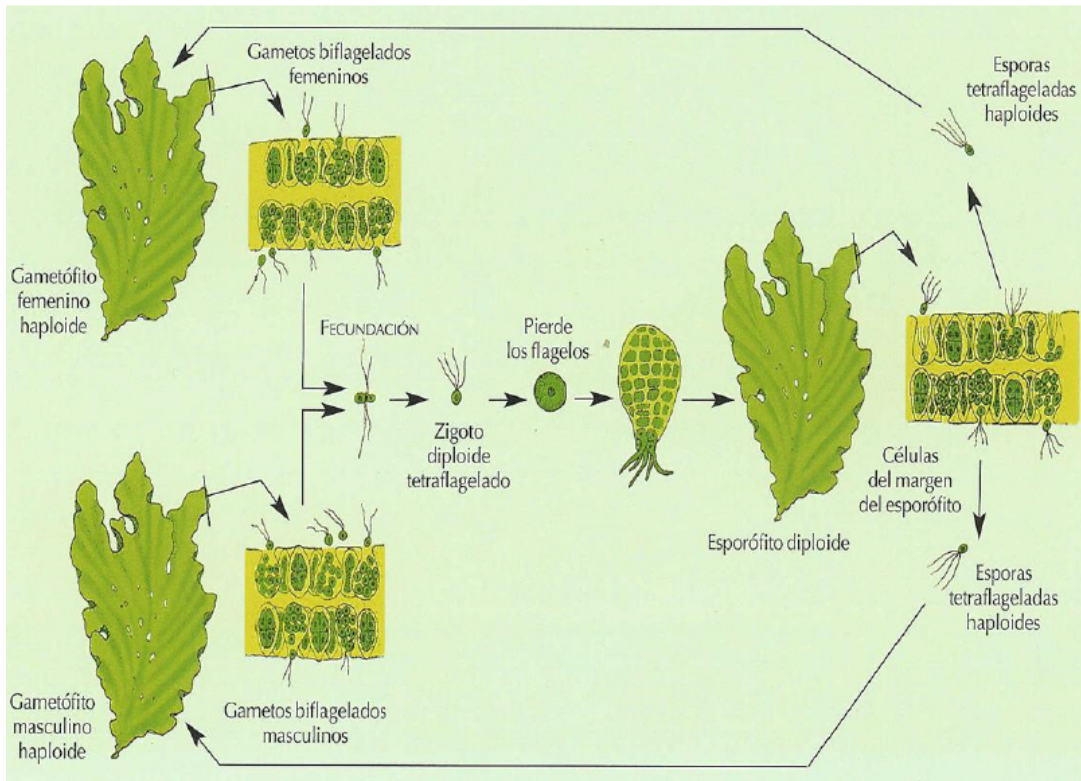


Figura 1: Ciclo biológico de *Ulva*.



Figura 2: Ejemplar silvestre de *Ulva ohnoi* (San Fernando, Cádiz).

La eficiencia de biofiltración de nitrato se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia biofiltradora} = [(\text{conc. inicial} - \text{conc. final}) / \text{conc. inicial}] \times 100$$

4.3 Determinación de nitratos y reserva alcalina

El análisis del nitrato se realizó con un espectrofotómetro HP 8433 UV-Visible (Figura 3) con el método de APHA (1992), basado en la medida de la absorción al UV del ión nitrato a 220 nm.

La reserva alcalina se analizó mediante una sonda de CO₂ marca OxyGuard (Figura 3). Este método se basa en la detección del carbono inorgánico total en la muestra de agua mediante el desplazamiento del equilibrio carbonato-bicarbonato-dióxido de carbono hacia el extremo del dióxido de carbono mediante la bajada del pH a 4,5 con la adición de ácido cítrico.



Figura3. Imagen de espectrofotómetro (izquierda), sonda y registrador de CO₂ (centro y derecha).

4.4 Estudio morfológico

El estudio de las posibles variaciones en la morfología intracelular (nº de pirenoides, tamaño y disposición del plasto, etc.) en las distintas condiciones experimentales se realizaron observaciones en vista superficial de la lámina de ejemplares seleccionados con un microscopio óptico Olympus BX50 asociado a una cámara fotográfica. Estas observaciones fueron hechas tanto en el *stock* inicial como al final de cada condición experimental.

4.5 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrógeno, proteínas y relación carbono/nitrógeno

Los análisis de composición química se realizaron a partir de la biomasa obtenida en las distintas condiciones experimentales al final de la experiencia. Se usaron 50 g de cada condición experimental, y se secaron en la estufa durante 24 horas a 45 °C. Posteriormente se homogenizó la biomasa para obtener una muestra media representativa del cultivo. Los análisis fueron realizados por la Unidad de Análisis Elemental de los SAI de la UDC.

Para la determinación del contenido en proteínas se empleó el siguiente factor de conversión (Angell *et al.*, 2016):

$$\text{Proteínas (\%)} = \% \text{ N} \times 6,25$$

4.6 Sistema de cultivo en tanque

Las experiencias realizadas en este trabajo fueron llevadas a cabo mediante un sistema de cultivo en tanque en suspensión. Para ello se emplearon tres tanques de 180 l de capacidad, con sistema de aireación constante e iluminación con lámparas Prilux ecSaver High Luminosity de 85 W y 6.400 °K (Figura 4). Uno de los tanques fue destinado para la producción de la biomasa *stock*, mientras que los otros dos tanques fueron los destinados a la realización de las experiencias.

Todos los cultivos mantuvieron una temperatura constante de $18 \pm 1,5$ °C con un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad y una salinidad del 34 ‰, compensando las pérdidas por evaporización añadiendo agua dulce.

La composición del medio de cultivo empleado consistió en agua marina bruta filtrada a 100 µm enriquecida con 20 ppm de nitrógeno (NO₃Na), 0,5 ppm de fósforo (PO₄H₂Na.2H₂O) y oligoelementos (Tabla 1).

Uno de los dos tanques usados en las experiencias tiene un sistema de regulación de pH mediante la inyección automática de CO₂ a través de una piedra difusora situada en el fondo del tanque. En ambos tanques se registraron mediante un *data-logger* las variaciones de pH cada 15 minutos (Figura 4). Este sistema de regulación de pH se basa en el aporte de CO₂ al medio para mantener en equilibrio el sistema tampón bicarbonato-carbonato-dióxido de carbono del agua marina.

Tabla 1. Composición química de la solución de oligoelementos.

	g l⁻¹
Na₂EDTA.2H₂O	14
Fe(NH₄)²(SO₄)².6H₂O	14
MnSO₄.4H₂O	1,6
FeCl₃.6H₂O	0,5
ZnSO₄.7H₂O	0,2
CoSO₄.7H₂O	0,05
NaOH	2 perlas



Figura 4. Tanques empleados en las experiencias, pH-metro y sonda en un tanque de cultivo.

4.7 Diseño experimental

La evaluación de la influencia de variaciones de pH y la reserva alcalina sobre el cultivo de *U. ohnoi* se realizó mediante una experiencia de tres semanas de duración, correspondiendo cada semana a una réplica experimental (n=3).

De los tres tanques utilizados para las experiencias, uno se empleó para el mantenimiento del *stock* inicial mientras que los otros dos se emplearon para establecer las dos condiciones experimentales del estudio. La primera condición consistió en el control (C) del pH (máx. 8,4) del cultivo mediante la difusión de CO₂ y la segunda condición en no control (NC) de pH. Tanto el *stock* como las dos condiciones experimentales mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica y composición química del medio de cultivo.

El *stock* se mantuvo en densidades bajas (< 3 kg m⁻³) para su óptimo mantenimiento, mientras que los tanques experimentales se mantuvieron densidades medias (> 4 kg m⁻³) para conseguir unas variaciones de pH y reserva alcalina suficientemente marcadas entre el tanque controlado y no controlado que permitieran obtener resultados concluyentes. Es por ello que cada experiencia semanal se inició en cada tanque con 200 g de biomasa de *U. ohnoi* obtenida por centrifugación de la biomasa *stock* en un volumen de 50 l de medio de cultivo.

A lo largo de cada experiencia semanal se determinó diariamente el peso húmedo escurrido en cada condición y al final de la misma la tasa de crecimiento (por centrifugación), reserva alcalina, consumo de nitrato, contenido medio de carbono, nitrógeno e hidrógeno y la morfología celular en las distintas condiciones de cultivo.

4.8. Análisis estadístico

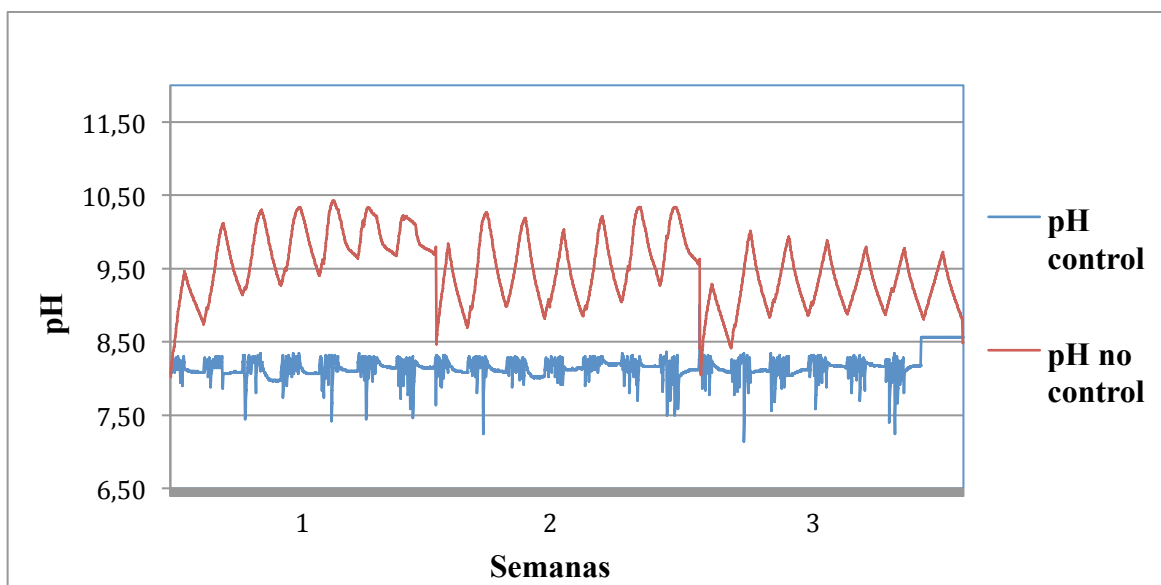
Para todos los parámetros analizados se calcularon las medias y las desviaciones estándar. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa R versión 3.3.3., y las gráficas se realizaron con el programa Microsoft[®] Excel para Mac (versión 14.2.2 2011).

La hipótesis de que la tasa de crecimiento, el peso final y la eficiencia de eliminación de nitrógeno no es diferente entre las distintas condiciones experimentales se analizó mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 90 % (p-valor > 0,1).

La hipótesis de que el pH medio y la reserva alcalina no es diferente entre las distintas condiciones experimentales se analizó mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 % (p-valor > 0,05).

5. Resultados y discusión

De todos los resultados obtenidos, en primera instancia se comprobó la eficiencia del sistema de control de pH, basada en la inyección de CO₂ en el tanque controlado, para comprobar que dicho sistema funcionó adecuadamente durante todo el período experimental (Gráfica 1).

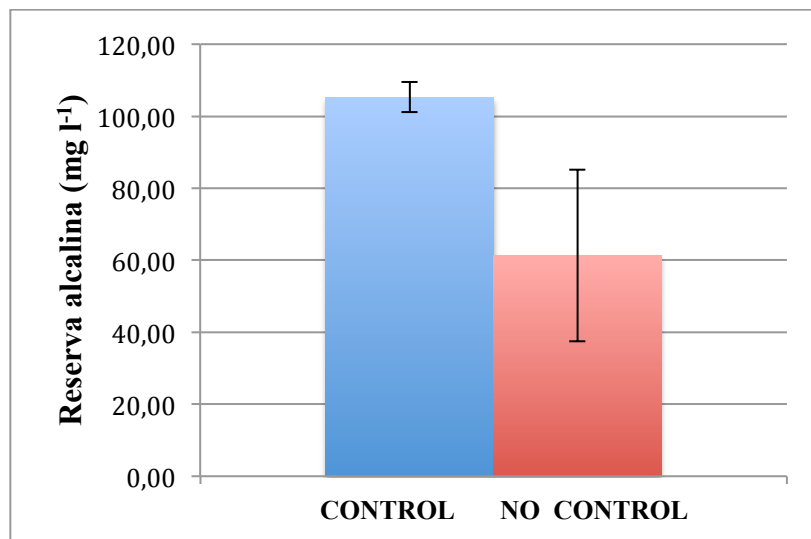


Gráfica 1. Evolución del pH a lo largo de las tres semanas experimentales. Se registró el pH de cada condición cada 15 minutos durante toda la experiencia. Los picos más pronunciados son debidos a los cambios semanales.

Las variaciones de pH observadas en la condición pH no controlado son debidas a la actividad fotosintética (alcalinización) y la respiración (acidificación) del medio por *U. ohnoi* durante el periodo de luz y oscuridad, respectivamente. Esta variación es debida a que la fotosíntesis precisa carbono procedente, principalmente, del bicarbonato del medio lo que ocasiona una pérdida de la capacidad tamponadora del medio y un aumento del pH. Durante la noche, la respiración de la biomasa de algas libera nuevamente al medio CO₂, lo que implica su acidificación. Se puede observar que a lo largo de los días en la primera y segunda semana hay un progresivo aumento del pH medio del cultivo, debido principalmente al consumo de la reserva alcalina (bicarbonato-carbonato), lo que implica

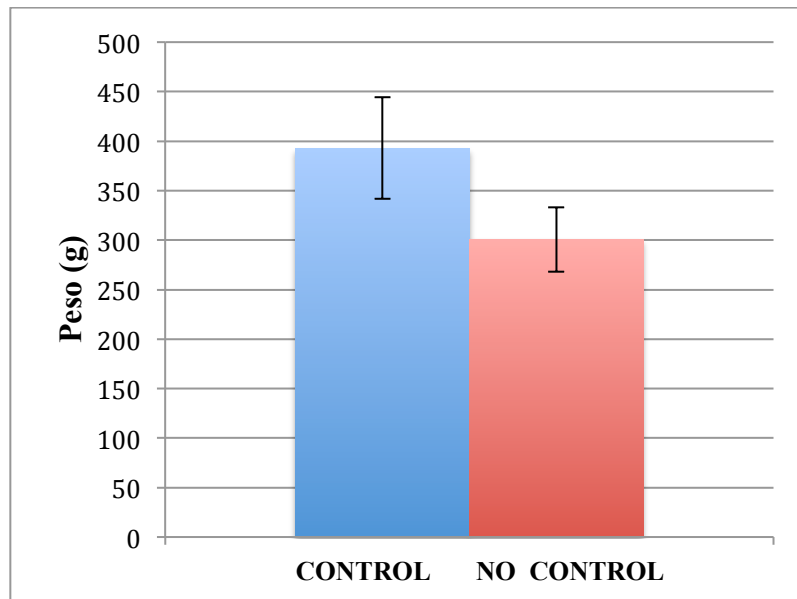
una reducción de la capacidad tamponadora del medio. Por el contrario, en la condición de pH controlado, las variaciones de pH son prácticamente nulas debido al aporte de CO₂ como sistema de regulación. Se observaron diferencias significativas (p-valor < 0,1) entre la condición de pH controlado y no controlado. El valor medio de pH en el tanque control fue de $8,16 \pm 0,3$ y el valor medio en el tanque no control fue de $9,45 \pm 0,5$.

En la gráfica 2 se puede observar que en la condición de pH controlado se mantuvo la concentración óptima de reserva alcalina mientras que en la condición de pH no controlado la reserva alcalina se redujo significativamente (p-valor < 0,05).

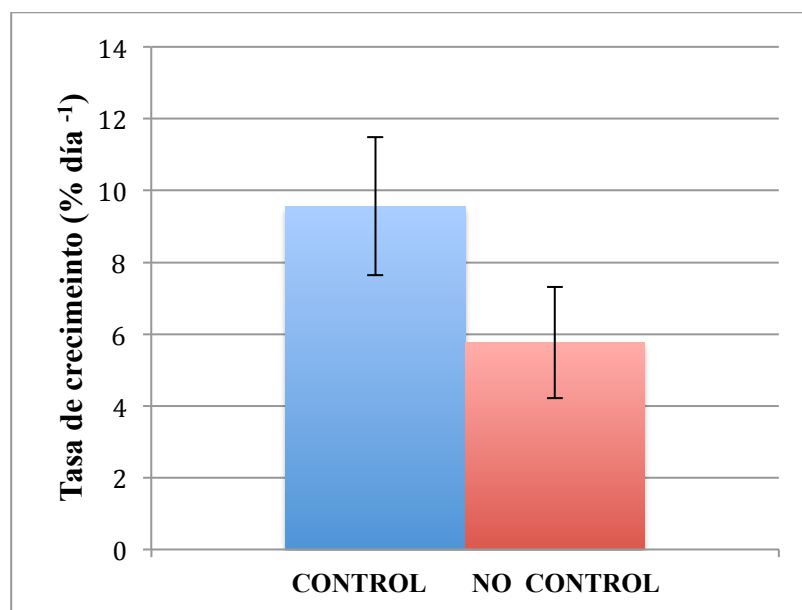


Gráfica 2. Medias y desviaciones estándar de la reserva alcalina en las distintas condiciones experimentales al final de la experiencia.

El peso final (Gráfica 3) y la tasa de crecimiento (Gráfica 4) fueron significativamente mayores (p-valor < 0,1) en la condición de pH controlado respecto de la condición de pH no controlado.



Gráfica 3. Peso final medio y desviaciones estándar de las diferentes condiciones experimentales.



Gráfica 4. Tasa de crecimiento media y desviaciones estándar de las distintas condiciones experimentales.

En las tres semanas experimentales la tasa de crecimiento diaria tuvo un comportamiento bastante caótico (Gráfica 5) hasta el cuarto día, tanto en la condición de pH no controlado como en de controlado, a partir de ese día se observa cómo las tasas de crecimiento son más estables, siendo claramente más altas las de condiciones controladas.

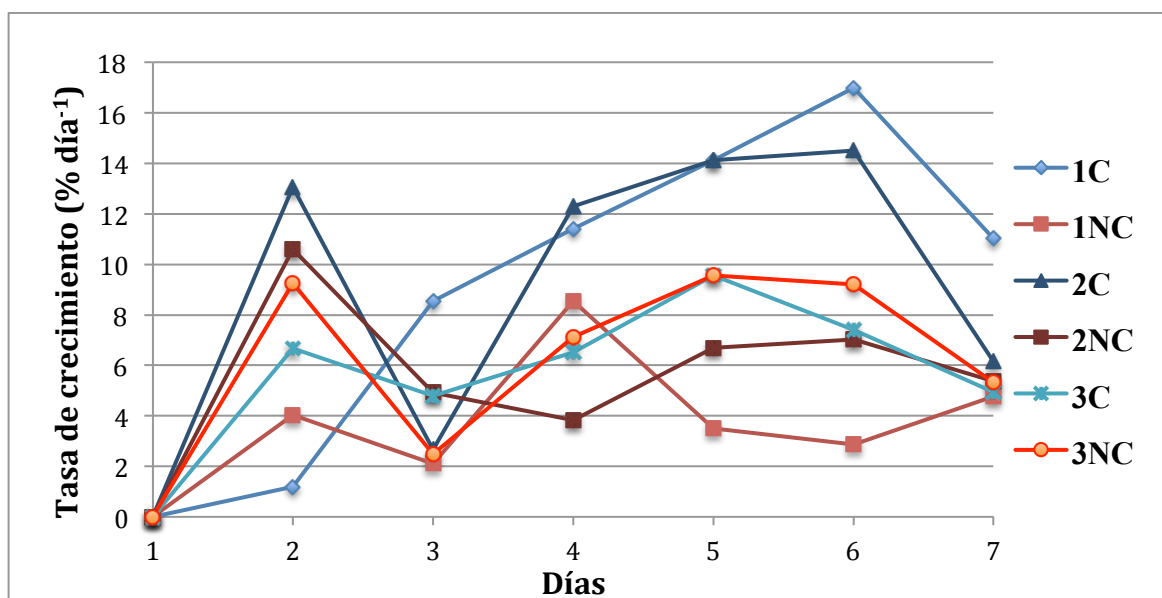
Esto es particularmente cierto en las dos primeras semanas, ya que la tercera semana mostró un comportamiento atípico por razones desconocidas. Por limitaciones de tiempo y recursos

no se pudo realizar una cuarta réplica y debido al tipo de diseño y análisis experimental se ha tenido que incluir esta réplica atípica en los resultados.

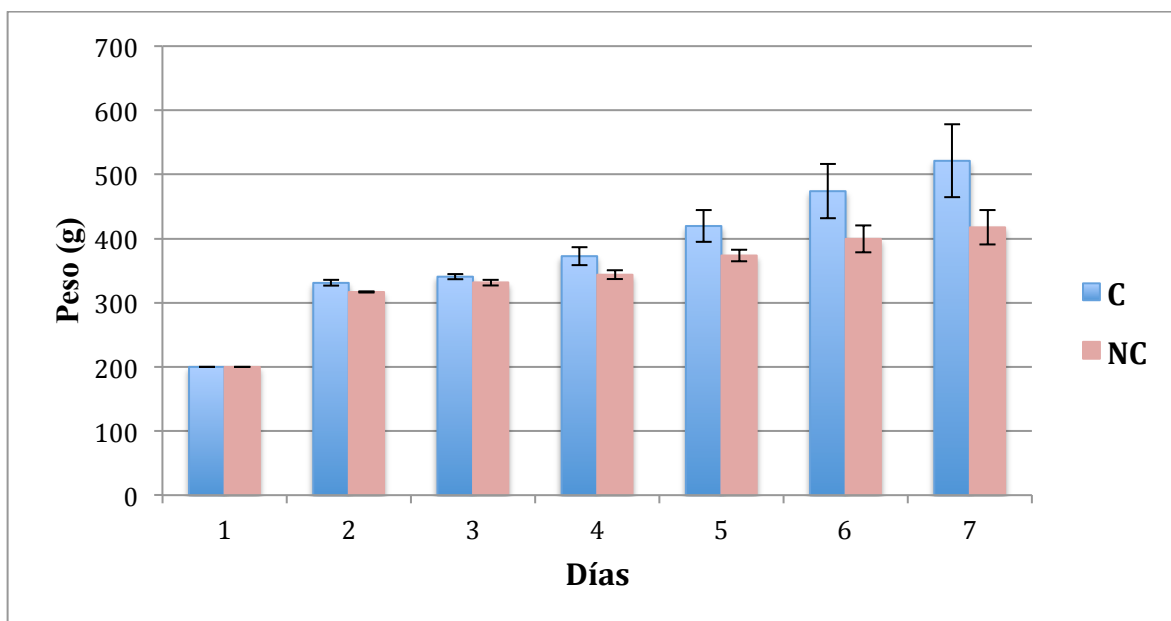
Esta estabilización a la baja de las tasas de crecimiento en el tanque de condiciones no controladas a medida que pasan los días, siendo las variaciones de pH análogas durante todo el período experimental (Gráfica 1), puede ser debida a que las variaciones de pH no influyen significativamente sobre el crecimiento, sino que el factor clave sería la disponibilidad de reserva alcalina, o dicho de otro modo, la disponibilidad de carbono (macronutriente principal) sería el factor que determina las diferencias significativas encontradas entre los datos finales de las distintas experiencias.

El último día muestra una caída de la tasa de crecimiento en la mayoría de las réplicas y condiciones experimentales (especialmente las que mostraron mayor crecimiento), posiblemente debido al aumento de la densidad de cultivo o el agotamiento de algún macronutriente u oligoelemento sumado a las limitaciones productivas del tipo de tanque empleado (principalmente la irradiación lumínica).

En la gráfica 6 nuevamente se observa cómo los cultivos que tuvieron un aporte constante de CO₂ incrementaron su biomasa de forma paulatina y finalmente significativa (p-valor < 0,1) respecto a aquellos cultivos que no tuvieron un aporte constante de carbono, a excepción de la tercera semana.



Gráfica 5. Tasas de crecimiento de las tres semanas experimentales para la condición de pH controlado (1C, 2C, 3C) y no controlado (1NC, 2NC, 3NC).



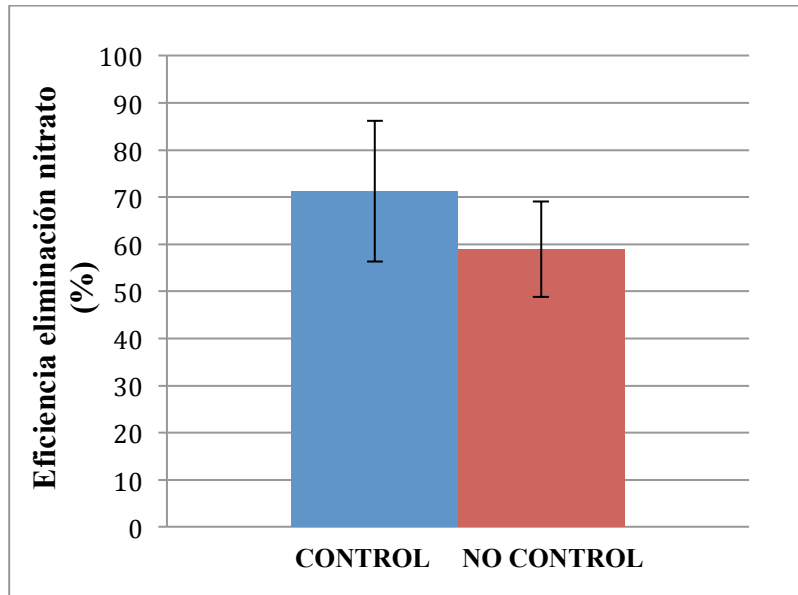
Gráfica 6: Evolución diaria media y desviación estándar del peso húmedo en el la condición de pH controlado C) y no controlado (CN).

El ratio carbono/nitrógeno puede emplearse como indicador del estado fisiológico y bioquímico ante estrés debido a factores como la alta o baja irradiancia (Figuerola *et al.*, 2009), por ello es interesante evaluar el contenido de carbono, nitrógeno e hidrógeno (Tabla 2). El porcentaje de nitrógeno nos permite calcular el contenido en proteínas, un aspecto clave a tener en cuenta para valorización de la biomasa cultivada, ya que a partir de contenidos superiores al 20 % se consideraría interesante y económicamente viable para su utilización en alimentación animal (peces). En este caso observamos que en las condiciones experimentales el contenido en proteínas de la biomasa fue superior al 20 %.

Tabla 2. Porcentaje del contenido en carbono (C), nitrógeno (N), hidrogeno (H), ratio carbono/nitrógeno (C/N) y proteínas de las distintas condiciones de cultivo de *U.ohnoi*.

Muestra	Proteínas (%)	N (%)	C (%)	H (%)	C/N
CONTROL	20,91	3,34	28,88	5,44	8,66
NO CONTROL	22,85	3,65	28,81	5,55	7,89

En cuanto a la eficiencia de biofiltración de nitrato, aunque fue mayor en la condición de control de pH, no se obtuvieron diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales (p-valor > 0,1).



Gráfica 7: Medias y desviaciones estándar de la eficiencia de la eliminación de nitrato del medio.

La figura 5 representa las distintas visiones superficiales de las células de la especie en su estado inicial (*stock*, comienzo de la experiencia) y estado final tras su cultivo en las dos condiciones experimentales: condición de pH controlado (C) y condición de pH no controlado (NC). Como se puede ver en la figura 5 no se observaron diferencias morfológicas entre las distintas condiciones experimentales con respecto tanto a la integridad y posición del plasto como en el número de pirenoides por célula.

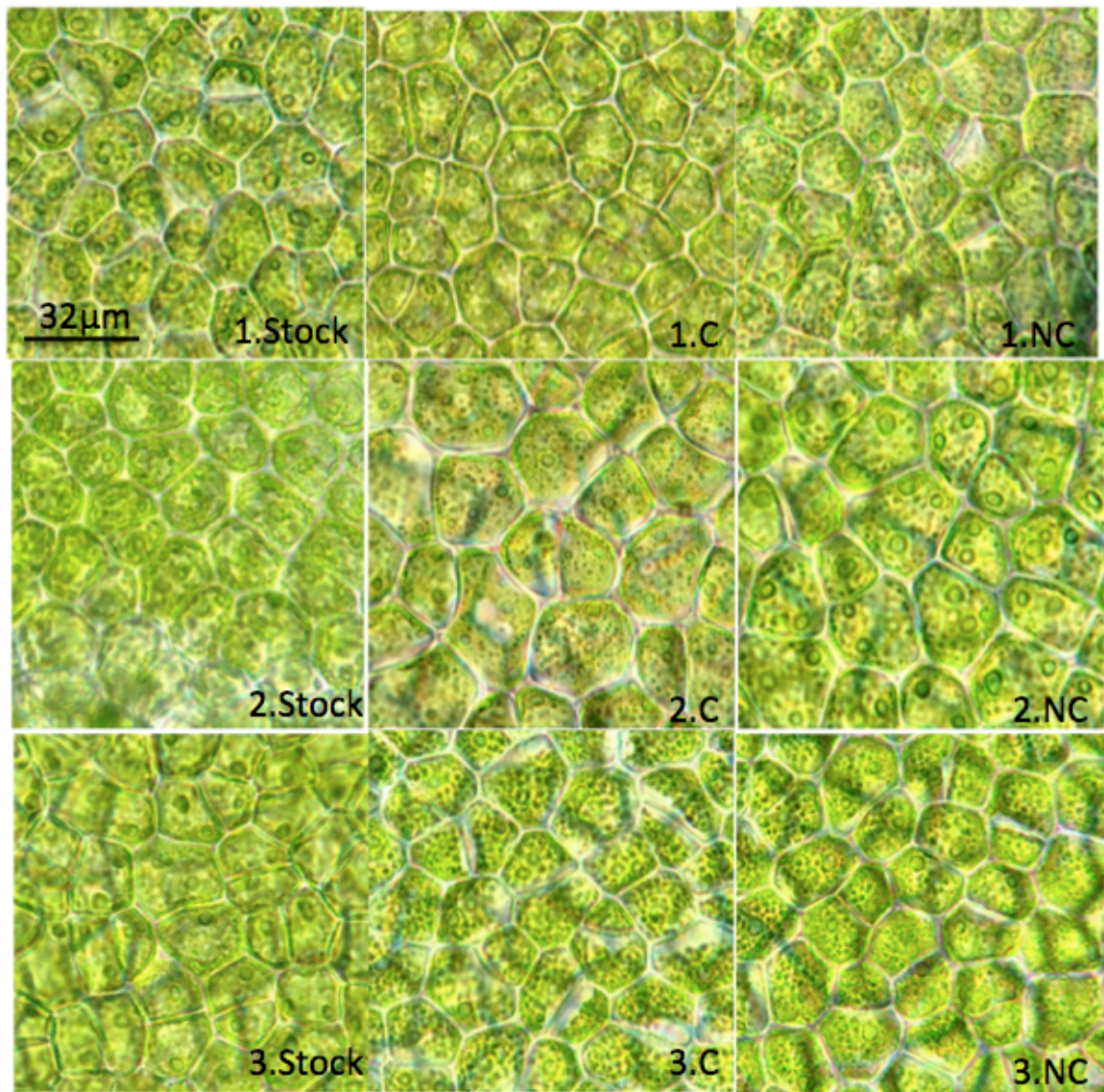


Figura 5: Estados morfológicos celulares de las láminas de *U.ohnoi* a lo largo del estudio.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio con *Ulva ohnoi* indican que el control del pH con la inyección de CO₂ tiene efectos positivos en su crecimiento en cultivo.

Este efecto positivo parece ser debido más al mantenimiento de la reserva alcalina del medio de cultivo que a la mitigación de las oscilaciones de pH, ya que en los primeros días de cultivo, a pesar de existir notorias diferencias en las variaciones del pH en las dos condiciones experimentales, no existen sin embargo diferencias en productividad. Estas diferencias no se establecen hasta después del quinto día de cultivo.

En un sistema AMTI-RAS en el que se integraran de forma balanceada peces y *U. ohnoi* la misión del mantenimiento de la reserva alcalina del agua la harán los peces con su aporte de CO₂ al medio. Las algas consumirán este CO₂ liberando oxígeno que beneficiará a los peces, lo que sin duda es una prueba del beneficio de su mutua integración.

7. Referencias bibliográficas

- Angell A. R., Mata L., de Nys R., and Paul N. A. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28, 511–524.
- APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition, American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington DC.
- Bidwell, R. G. S. (1993). Fisiología vegetal. AGT editor, S.A. Ontario, Canadá.
- Casais E. & A. Couce (2016). Desarrollo de cultivos de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI). *Algas, Boletín Informativo de la Sociedad Española de Ficología*, 52: 36-39.
- Carrasco F. (2008). Biocauchos que nacen en el mar. Informe de proyecto.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (2016). *Contribución a La Seguridad Alimentaria Y La Nutrición Para Todos. Roma.*, 224.
- Figuerola F. L., Israel A., Neori A., Martínez B., Malta E. Jan, Ang P. and Korbee N. (2009). Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): Responses to short-term stress. *Aquatic Biology*, 7: 173–183.
- Hernández I., Fernández-Engo M. A., Pérez-Lloréns J. L., and Vergara, J. J. (2005). Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus aurata* waste waters. *Journal of Applied Phycology*, 17: 557–567.
- Hiraoka M., Shimada S., Uenosono M., and Masuda M. (2004). A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycological Research*, 52: 17–29.
- Hurd C.L., Harrison P.J., Bischof K., and Lobban C.S. (2014). Seaweed ecology and physiology. Press, Cambridge Univ. Cambridge.
- Jiménez del Río M., Ramazanov Z., García-Reina G. (1996). *Ulva rigida* (Ulvales.Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *Hydrobiologia*, 326/327:61-65.
- Lüning K., & Pang S. (2003). Mass Cultivation of Seaweed: Current Aspects and Approaches. *Journal of Applied Phycology*, 15: 115–119.

- Montingelli M. E., Tedesco S., and Olabi A. G. (2015). Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43: 961–972.
- Neori A. (1996). The type of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 48: 19–27.
- Neori A., Cohen I., and Gordin H. (1991). *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents II. Growth rate, yield and C:N ratio. *Botanica Marina*, 34: 483–490.
- Nobre A. M., Robertson-Andersson D., Neori A., and Sankar K. (2010). Ecological-economic assessment of aquaculture options: Comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture*, 306: 116–126.
- Plaza M., Cifuentes A., and Ibáñez E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 31–39.
- Schuenhoff A., Shpigel M., Lupatsch I., Ashkenazi A., Msuya F. E., and Neori A. (2003). A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture*, 221: 167–181.
- Valente L. M. P., Gouveia A., Rema P., Matos J., Gomes E. F., and Pinto I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252: 85-91.
- Vizcaíno A. J., Mendes S. I., Varela J. L., Ruiz-Jarabo I., Rico R., Figueroa F. L., Abdala R., Morifiño M. A., Mancera J. M. and Alarcón F. J. (2015). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research*, 1-15.
- Wang H., Liu C. F., Qin C. X., Cao S. Q., and Ding J. (2007). Using a macroalgae *Ulva pertusa* biofilter in a recirculating system for production of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquacultural Engineering*, 36: 217–224.