

CULTIVO POLIALGAL (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. Y *Tetraselmis chuii*) EN MEDIOS NUTRITIVOS NO CONVENCIONALES

POLYALGAL CULTURE (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. AND *Tetraselmis chuii*) IN NONCONVENTIONAL NUTRIENT MEDIA

OLGA GÓMEZ¹, ROELIA RODRÍGUEZ², SONIA SUBERO¹

¹Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias

²Universidad de Oriente, Nueva Esparta, Escuela de Ciencias Aplicadas al Mar

E-mail: elelea2001@yahoo.com

RESUMEN

Uno de los obstáculos en la producción masiva de microalgas es la formulación y selección de un medio de cultivo química y económicamente adecuado. En cultivos microalgales de grandes volúmenes, se realizan esfuerzos por desarrollar fertilizantes de bajo costo, y que a su vez aseguren altas concentraciones celulares y buena calidad de las células que van a constituir el alimento de los organismos cultivados. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento, concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y carotenos) y proteínas en cultivos polialgales de las microalgas: *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*. Empleando como fuente nutritiva tres medios de cultivo alternativos: (Gallinaza, Melaza y Organina), y comparando los resultados con los obtenidos en un medio control (Guillard f/2). Se obtuvo el mayor crecimiento ($1,5 \times 10^7$ cel/mL), mayor concentración de clorofila *a* y carotenos (2,53; 1,06 µg/L, respectivamente) en el medio gallinaza. Mientras que, la concentración de proteínas (69,87 µg/ml) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el medio convencional f/2. Los resultados indican que los nutrientes alternativos Gallinaza y Organina pueden ser empleados para el cultivo microalgal.

PALABRAS CLAVE: Microalgas, medios de cultivo, policultivo algal.

ABSTRACT

One important constraint to massive microalgae production is the design and selection of culture media chemically and economically adequate. In microalgal cultures of large volume, efforts are made to develop low – cost fertilizers that ensure high cells concentration and good quality of the cell that will be used as food for cultured animals. In this work, the growth rate, photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and carotenenes) and protein content were evaluated in an integrated algal polyculture of *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp and *Tetraselmis chuii*. Three alternative nutritive sources were tested: ‘Gallinaza (chicken feces), ‘Melaza’ (molasses) and ‘Organina’, and compared with a control source (Guillard f/2). The highest growth (1.5×10^7 cel/mL), chlorophyll *a* and carotene contents (2.53; 1.06 µg/L, respectively) were achieved with the medium ‘Gallinaza’. However, the protein content (69,87 µg/mL) was significantly higher ($p < 0,05$) with the control medium. The results show that the alternative nutritive sources ‘Gallinaza’ and ‘Organina’ can be used in the culture of microalgae.

KEY WORDS: Microalgae, culture media, algal polyculture.

Son muchas las especies de microalgas que pueden ser utilizadas como alimento de organismos acuáticos en cultivo. Obviamente que antes de disponer de cultivos apropiados de una sola especie hay que conocer las condiciones de cultivo en las que dichas algas pueden alcanzar densas poblaciones (Velásquez 1982). Las microalgas como el resto de los microorganismos, sólo tienen una capacidad limitada para controlar su entorno, ellas responden a las variaciones en la concentración de nutrientes ajustando su composición celular para obtener un crecimiento óptimo y equilibrado (Leal y Bonachea 1994). La concentración de un nutriente puede afectar la producción fotosintética, la tasa de división celular y también la composición bioquímica. Esto contribuye a que el crecimiento de una población se haga dependiente no sólo de factores físicos, sino además de la presencia de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos,

tanto a nivel traza como de macronutrientes (Uribe 1996, Ponne 2001).

Unos de los obstáculos en la producción de microalgas, es la formulación, preparación y selección de un medio de cultivo químico y económicamente apropiado (Abalde *et al.* 1998). Son numerosas las formulaciones para el enriquecimiento del agua a utilizar en los diferentes volúmenes del sistema de obtención masiva de microalgas. Tradicionalmente, se han utilizado los medios nutritivos analíticos convencionales como Provasoli, Walne, Guillard entre otros. Sin embargo, éstos tienen costos elevados, lo que constituye un límite de la capacidad productiva en laboratorios (Egge y Aksnes 1992), creando la necesidad de evaluar otros medios que brinden buena calidad nutricional, permitan mejorar el rendimiento microalgal

y a la vez disminuyan los costos de producción en cultivos masivos (Hoff y Snell 1993).

Entre los trabajos realizados en Venezuela con cultivos de varias especies de microalgas y medios nutritivos diferentes se pueden citar: Velásquez (1982) quien utilizó medios enriquecidos para el cultivo de *Phaeodactylum tricornotum*, *Dunaliella salina* y *Tetraselmis suecica*; Buitrago *et al.* (1989) en cultivos de *Isochrysis galbana* empleó los fertilizantes agrícolas sulfato de amonio, urea y superfosfato triple; Rodríguez (1995) cultivó *Isochrysis galbana* en dos medios convencionales (Walne y f/2 Guillard) y uno no convencional (fertilizante agrícola); Gómez y Gómez (1996) cultivaron *Tetraselmis chuii* con urea y T₁₅ (fertilizante agrícola); Brito (2000) utilizó el fertilizante comercial Nitrofoska Foliar en el crecimiento de *Nitzschia cf. closterium*; a su vez empleado para el cultivo de *Tetraselmis chuii* por Ponne (2001).

A pesar de la variedad de alternativas y ventajas que presentan los fertilizantes agrícolas sobre la amplia gama de formulaciones convencionales se desconoce las concentraciones exactas de estos medios no convencionales a utilizar; así como también los efectos negativos secundarios causados por su uso (McAnallys *et al.* 1992). En el presente trabajo se evaluó el crecimiento, la producción de pigmentos y el contenido de proteínas en cultivos polialgales de microalgas marinas, empleando tres medios de cultivo no convencionales usados en la industria camaronera para fertilizar los estanques de cultivo, con la finalidad de optimizar la producción masiva de microalgas durante la fase de engorde.

A partir de cultivos unialgales discontinuos en fase exponencial de crecimiento, de 4,5 L de las especies *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii* (cepas pertenecientes al Laboratorio de Fitoplancton del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Oriente) se tomaron los volúmenes necesarios para inocular 16 botellones de 18 L de capacidad, manteniendo una concentración inicial de células igual a 2×10^4 cél/mL de cada especie en particular, para un total de 6×10^4 cél/mL de cultivo polialgal, tratando de imitar las condiciones naturales de población microalgal, cada tratamiento y tres réplicas se llevaron a cabo en ambiente exterior techado transparente, empleando luz natural, agua de mar filtrada, salinidad de 30 y aireación continua suministrada por un aireador de 4,4 Hp a través de tubería P.V.C. y mangueras plásticas.

Los medios de cultivo fueron preparados usando las alternativas diferentes y en las concentraciones empleadas en las granjas camaroneras para fertilizar las piscinas de

cultivo; 1,25 g/L de organina (Tratamiento 1); 6,67 g/L de gallinaza (Tratamiento 2) y 2 mL/L de melaza (Tratamiento 3). El medio convencional Guillard f/2 (Tratamiento 4) se empleó a razón de 0,5 mL/L de agua de mar filtrada. A todos los medios se les adicionó silicato a razón de 0,5 mL/L de agua de mar y fueron esterilizados en autoclave.

Para llevar un monitoreo más preciso de los cultivos, diariamente se determinó el crecimiento, concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y carotenos) y el contenido de proteínas.

El crecimiento celular se determinó diariamente por conteo directo a través de un hematocitómetro (Tipo Neubauer), en muestras fijadas con formalina al 5%. Los datos obtenidos fueron utilizados para determinar la tasa de crecimiento relativo K expresados en div/días, siguiendo las recomendaciones propuestas por Stein (1973), y las curvas de crecimiento en términos de densidad (cél/mL) en función del tiempo de cultivo.

Las concentraciones de clorofila a, y carotenoides totales (µg/L), se obtuvieron diariamente empleando las propuestas descritas por Jeffrey y Humphrey (1975 y Lorenzen (1967 en Strickland y Parsons 1972). Mientras que las proteínas totales (µg/mL) se determinaron por el método espectrofotométrico según Lowry (1951), utilizando BSA como estándar.

Los análisis de amonio, nitrito, nitrato y fosfato, se realizaron según la metodología descrita por Strickland y Parsons (1972) utilizando un volumen de 25 mL de muestra de cada réplica, una vez transcurrido el período de reacción entre la muestra y los reactivos, se tomaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro MILTON ROY, modelo Spectronic 501.

La existencia de diferencias significativas entre las variables (crecimiento, concentración de pigmentos y proteínas) en relación a los medios de cultivo fueron determinadas mediante un análisis de varianza sencillo, previo cumplimiento de los supuestos de varianza, mientras que las relaciones entre las diferentes variables fueron realizadas mediante un análisis de correlación múltiple (Zar 1996).

El crecimiento del cultivo entre los diferentes medios de cultivo no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). La mayor densidad celular promedio alcanzada fue $1,50 \times 10^7$ cel/mL al emplear el medio Gallinaza, al décimo tercer día de cultivo, mientras que se obtuvieron densidades celulares menores al emplear Organina $9,30 \times 10^6$ cel/mL (día

12). La máxima tasa de crecimiento se alcanzó en el medio Guillard ($K= 0,58$ div/día) y la menor $0,31$ div/día con Organina.

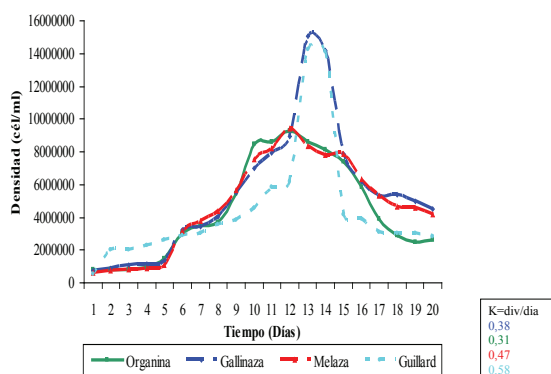


Figura 1. Densidad celular del cultivo polialgal en los medios no convencionales (Gallinaza, Melaza y Organina) y en el medio convencional Guillard (f/2).

Con respecto al crecimiento individual de cada especie se encontró que la microalga *Chlorella* sp. fue la que presentó mayor densidad celular alcanzando hasta un máximo de $7,93 \pm 0,68 \times 10^6$ cél/mL; seguido de la especie *Chaetoceros gracilis* $4,68 \pm 0,36 \times 10^6$ cél/mL y finalmente *Tetraselmis chuii* con un máximo de $2,83 \pm 0,27 \times 10^5$ cél/mL.

En este estudio las mayores concentraciones celulares se obtuvieron al emplear el medio Gallinaza ($1,50 \times 10^7$ cél/mL), concentración superior a las obtenidas por otros autores al emplear este componente como medio para cultivo monoalgal, Machuca y Buckle (1983) obtuvieron una densidad máxima de $4,49 \times 10^5$ cél/mL al cultivar *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum*, igualmente, Zavala (1988) quien cultivó la microalga *Tetraselmis suecica* con extracto de estiércol de gallina, obteniendo una máxima densidad celular de $3,32 \times 10^5$ cél/mL. También son superiores a las obtenidas por Ponne (2001), al cultivar *Tetraselmis chuii* ($1,48 \times 10^6$ cél/mL) y Brito (2000) en cultivo de *Nitzschia* cf. *closterium* ($2,96 \times 10^6$ cél/mL) al emplear como medio de cultivo el fertilizante agrícola Nitrofoska

Foliar. Con relación al crecimiento polialgal obtenido en este trabajo y tomando en cuenta que estos nutrientes y las concentraciones utilizadas son de uso normal en las granjas camaroneras, sería posible el uso de estos fertilizantes en cultivos masivos ya que provocan un incremento celular similar o superior al del medio control (f/2).

La producción algal en policultivo no se ha reseñado suficientemente, pudiéndose mencionar trabajos específicos como los de Kroes (1971) y De la Cruz (1985), sobre la interacción de dos especies en cultivo y el crecimiento en cultivo bialgal. Sin embargo cuando se mezclan en un cultivo más de dos especies de microalgas se evidencia la influencia que sobre cada una tienen las condiciones del cultivo y además, la influencia beneficiosa o perjudicial que cada especie puede ejercer sobre la otra (De la Cruz 1985). Según Su *et al.* (1997) hay que tener en cuenta que en los cultivos polialgales puede haber especies, que prosperan con facilidad aunque estén presentes otras especies de microalgas; pero hay otras que crecen bien por separado mientras que juntas alcanzan muy poco crecimiento. Lo anterior se evidencia en este estudio ya que la microalga que tuvo mayores concentraciones celulares fue *Chlorella* sp. debido quizás a su pequeño tamaño (3-6 μ m) y su alta tasa de crecimiento, que le permite aprovechar mejor las condiciones de cultivo empleadas. Cabe señalar que *Chlorella* sp. es una especie fuerte ante la competencia interespecifica, mientras que *Tetraselmis chuii* es una especie débil (De la Cruz 1985).

Las concentraciones de clorofila *a* y carotenos totales en el cultivo polialgal presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los distintos tratamientos ($p < 0,05$). Las concentraciones máximas promedio de clorofila *a* y carotenos totales se obtuvieron al emplear gallinaza durante el décimo tercer día de cultivo (2,53 y 1,06 μ g/L) mientras que las menores se observaron al utilizar Guillard (1,34 y 0,64 μ g/L respectivamente) (Figuras 2 a y b).

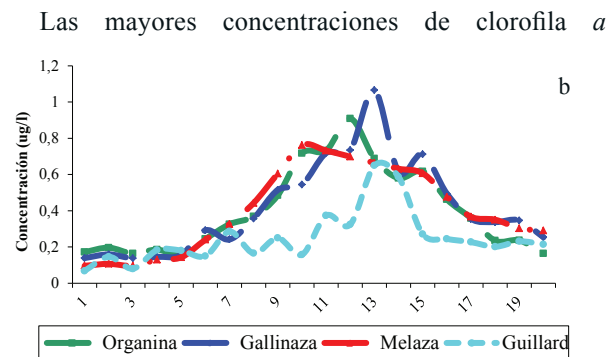
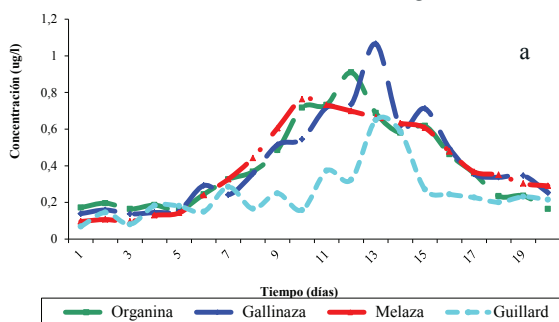


Figura 2 a Concentración de clorofila *a* (μ g/L), b Concentración de carotenos (μ g/L) del cultivo polialgal en los medios no convencionales (Gallinaza, Melaza y Organina) y en el medio convencional Guillard (f/2).

alcanzadas en este estudio, no son comparables a las obtenidas por otros autores empleando como medio nutritivo fertilizantes agrícolas, ya que no hay precedente de comparación porque en el cultivo polialgal las condiciones no son las mismas que en los cultivos monoalgales. Por lo tanto para comparar los resultados obtenidos en este estudio se recurre a trabajos de cultivos monoalgales en medios de cultivos no convencionales, a este respecto, Ponne (2001) reporta una concentración máxima de clorofila *a* en el medio Guillard de 1,31 µg/L, la cual es equiparable a la mayor cantidad de clorofila *a* obtenida en este estudio. Velásquez (1995) obtuvo valores de clorofila *a* de 2,09 y 3,89 µg/L; Romero (2003) en cultivos de *Chlorella* sp. en medio inorgánico obtuvo valores de 13 y 11,9 µg/L. la formación clorofila *a* va a depender directamente de la asimilación de nitrógeno (Lehninger 2005) así como se diversos nutrientes entre los que encuentran el hierro y el magnesio, de esta manera la síntesis y acumulación de clorofila *a* puede ser inhibida por la deficiencia de hierro, nitrógeno y magnesio al igual que por la abundancia de carbono orgánico en el medio y la alta intensidad luminosa (Avalde *et al.* 1998). Los bajos valores de clorofila *a* encontrados en este estudio podrían atribuirse a algunos de estos factores. Según Cedeño (1980), el contenido de clorofila *a* puede ser usado como un indicador del patrón de crecimiento en cultivos de microalgas, lo que se evidenció al encontrar las máximas concentraciones de clorofila *a* en los días y en los cultivos en que se alcanzaron las densidades celulares más altas.

La concentración de carotenos siguió el mismo patrón de comportamiento de la clorofila *a*. Conviene acotar que en este caso los resultados tampoco son comparables con otros autores, ya que no existe bibliografía sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos en cultivo polialgal.

La concentración de proteínas para el cultivo polialgal en los diferentes medios presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos ($p < 0,05$). Las máximas concentraciones fueron de 69,87µg/mL en el medio Guillard, el día 4 después de la siembra; y las menores con Gallinaza 56,15 µg/mL (día 6). El comportamiento observado en el contenido de proteínas representa una prueba de la importancia que tiene las proporciones en los diferentes micro y macronutrientes que componen un medio de cultivo. Las menores concentraciones de proteínas en las microalgas cultivadas con gallinaza permiten suponer sus deficiencias en las concentraciones de nitrógeno (a

pesar de haberse utilizado en mayor concentración).

El valor nutricional de cualquier especie de microalga para consumo de un organismo acuático, depende del tamaño de la célula, digestibilidad, producción de componentes tóxicos y la composición bioquímica (Toro 1989); aunque existe una marcada diferencia en la composición de clase y especies de microalgas, la proteína es siempre el mejor constituyente orgánico (Lavens y Sorgeloos 1996). En general, la variación del contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos, depende del medio nutritivo y de las condiciones de cultivo (Whyte 1987); siendo el nitrógeno el principal constituyente de la estructura de las proteína estando su asimilación por parte de la microalga, afectada directamente por la salinidad y la temperatura (Fábregas *et al.* 1985).

Fabregas *et al.* (1989), trabajando con diferentes especies de microalgas determinaron que el contenido de proteínas básicamente se ve afectado por las concentraciones de nutrientes utilizados en los cultivos. En este trabajo se observó que las mayores concentraciones se registran durante los primeros días de cultivo, disminuyendo gradualmente a medida que el cultivo envejece y se agotan los nutrientes.

Erazo *et al.* (1989), refieren que un bajo contenido de proteína puede ser atribuido a una deficiencia de nutrientes, específicamente nitratos. Esta tendencia corrobora la influencia fundamental del nitrógeno sobre la proteína. En tal sentido Abalde *et al.* (1998) refieren que el contenido proteico puede disminuir dependiendo de la fuente de nitrógeno suministrada al cultivo o si el mismo disminuye en el medio, lo que sugiere que para el empleo de cualquiera de estos fertilizantes como medio de cultivo para microalgas, se hace necesaria una evaluación de sus componentes tanto cualitativa como cuantitativamente.

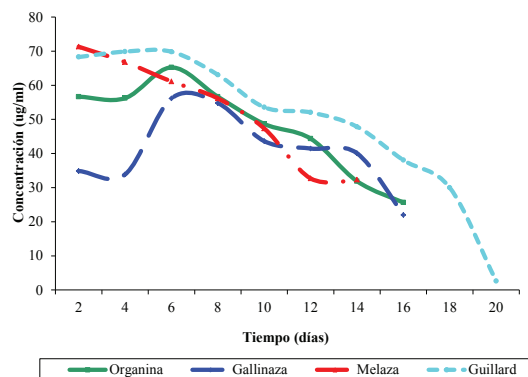


Figura 3. Concentración de proteínas (µg/mL) del cultivo polialgal en los medios no convencionales (Gallinaza, Melaza y Organina) y en el medio convencional Guillard (f/2).

Las variaciones en las concentraciones de nutrientes se deben a los días de cultivo y no a los diversos nutrientes empleados, exceptuando al nitrato y al fosfato. Estos resultados hacen suponer que las variaciones se deban a los procesos de asimilación y degradación; ya que al morir las células los compuestos orgánicos se descomponen hasta generar de nuevo las formas inorgánicas de nitrógeno lo que permite incorporarse a su ciclo natural respectivo (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración inicial y final de nutrientes nitrogenados (Nitrato, Nitrito, Amonio) y fosfato ($\mu\text{mol/L}$) en medios de cultivo no convencionales y Guillard.

| Organina | Gallinaza | Melaza | Guillard | |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Nitrato | 20 - 0,3 | 21 - 0,1 | 14 - 0,1 | 19 - 19 |
| Nitrito | 1 - 0,2 | 0,8 - 0,1 | 1,2 - 0,1 | 1,3 - 1,1 |
| Amonio | 3 - 2,0 | 1,7 - 1,2 | 1,5 - 0,9 | 3 - 1,8 |
| Fosfato | 2,9 - 2,0 | 2,0 - 1,8 | 2 - 1,5 | 4,5 - 2,0 |

En todos los cultivos existe una correlación positiva para la densidad celular y la concentración de clorofila *a*, proteínas y carotenos, y negativa con las formas nitrogenadas y el fosfato. Esto es indicativo del crecimiento activo de la población microalgal y el uso de estos nutrientes por parte de las microalgas. Otras relaciones a considerar son proteínas amonio y con fosfato, las cuales resultaron negativas, lo que evidencia el uso de estos nutrientes en la conformación molecular de estas estructuras.

Tabla 2. Análisis de correlación múltiple para las diferentes variables del cultivo polialgal en los medios no convencionales (Gallinaza, Melaza y Organina) sin adición de nitrato y en el medio convencional Guillard (f/2).

| Combinación | r | Combinación | R |
|--------------------|---------|------------------|---------|
| Clorofila-densidad | 0,5622 | Proteína-nitrato | 0,3347 |
| Clorofila-caroteno | 0,1988 | Proteína-nitrito | 0,2013 |
| Clorofila-proteína | 0,2796 | Proteína-amonio | -0,0388 |
| Clorofila-nitrato | -0,2846 | Proteína-fosfato | -0,6053 |
| Clorofila-nitrito | 0,1928 | Nitrato-densidad | -0,4616 |
| Clorofila-amonio | -0,1130 | Nitrato-nitrito | -0,1207 |
| Clorofila-fosfato | -0,6063 | Nitrato-amonio | -0,4605 |
| Caroteno-densidad | 0,4723 | Nitrato-fosfato | -0,7011 |
| Caroteno-proteína | 0,2588 | Nitrito-densidad | -0,1382 |
| Caroteno-nitrato | -0,2786 | Nitrito-amonio | -0,0363 |
| Caroteno-nitrito | 0,1914 | Nitrito-fosfato | -0,7706 |
| Caroteno-amonio | -0,0943 | Amonio-densidad | -0,3585 |
| Caroteno-fosfato | -0,5785 | Amonio-fosfato | -0,5910 |
| Proteína-densidad | 0,2985 | Fosfato-densidad | -0,0046 |

CONCLUSIONES

Las máximas densidades celulares y pigmentos fotosintéticos de los cultivos polialgales se encontraron en el medio no convencional Gallinaza ($1,50 \times 10^7$ cél/mL., 2,53 $\mu\text{g/L}$ de clorofila *a* y 1,06 $\mu\text{g/L}$ de caroteno).

La concentración máxima de proteínas en el policultivo se encontró en el medio Guillard (f/2) (69,87 $\mu\text{g/L}$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALDE J., CID A., FIDALGO P., TORRES E., HERRERO C. 1998. Microalgas, cultivo y aplicaciones. Editado por la Universidad de Coruña. Coruña, España. 210 pp.
- ARREDONDO B., CORDERO B., HERRERO C., ABALDE J. 1997. Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. Editado por la Universidad de Coruña. Coruña, España.
- BRITO A. 2000. Efecto de dos salinidades y dos temperaturas en el crecimiento y composición química proximal de *Nitzschia cf. closterium* (Bacillariophyceae) cultivada con un fertilizante agrícola comercial. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Boca del Río, Venezuela. 59 pp.
- BUITRAGO E., NORCINI C., ARRAGE M. 1989. Evaluación de tres medios nutritivos empleados en el cultivo masivo de *Isochrysis aff galbana* Green. Bol. Inst. Oceanog. Venez. Univ. de Oriente, 28 (1-2): 197-201.
- CEDENO G. 1980. Influencia del nitrógeno en el crecimiento y biosíntesis de aminoácidos en *Tetraselmis chuii*. Bol. Inst. Oceanog. Vzla. Univ. de Oriente 19 (1-2): 3-7.
- DE LA CRUZ A. 1985. Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. Rev. Inv. Mar. 6 (2-3): 109-117.
- EGGE J., AKSNES D. 1992. Silicates as regulating nutrient in phytoplankton competition. Mar. Ecol. Prog. Ser. 83: 281-289.
- ERAZO S., PROSA P., VIANI M., MULLER K. 1989. Estudio de la biomasa y de los pigmentos carotenoides en una especie nativa de la microalga *Dunaliella salina* sp. Rev. Agroquím. Tecnología de Alimentos, 29 (4): 538 -547.

- FÁBREGAS J., HERRERO C., ABALDE J., CABEZAS B. 1985. Growth chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* Parke in batch cultures with different salinities and high nutrients concentrations. *Aquaculture*, 50: 1 – 11.
- FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83: 289-304.
- GÓMEZ O., GÓMEZ A. 1996. Cultivo de la microalga marina *Tetraselmis chuii* con fertilizantes agrícolas. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2° Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile. Libro de Resumen: 45 (Resumen).
- HOFF F., SNELL T. 1993. *Plankton Culture Manual*. Third Edition. Florida Aqua Farm, Inc. Florida, EE.UU. 147 pp.
- JEFFREY S., HUMPHREY G. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a,b, and c in higher plants, algae and phytoplankton. *Biochem. Physiol.* 167:191-194.
- KROES H. 1972. Growth interactions between *Chlamydomonas globosa* Snow and *Chlorococcum ellipsoideum* Deason and Bold: The role of extracellular products. *Limnol. Oceanogr.* 17 (3): 423-432.
- LAVENS P., SORGELOOS P. 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Editado por Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bélgica, Belgium. 375 pp.
- LEAL S., BONACHEA I. 1994. Concentración óptima de microalgas marinas en cultivo. *Rev. Inv. Mar.* 15 (1): 73-79.
- LEHNINGER A. 2005. *Principios de Bioquímica*. 4ta ed. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1119 pp.
- LOWRY O., ROSEBROUGH H., FARR A., RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the folin-phenolreagent. En: Arredondo, B.; Cordero, B., Herrero, C.; y Abalde, J. 1997. *Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología*. Universidad de Coruña. Coruña, España. p. 210.
- MCANALLY L., OCAMPO F., GARCÍA L. 1992. Efecto de la microalga *Pavlova lutheri* (Drop) Hibberd cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y supervivencia de las post-larvas de mejillón *Mytilus edulis*. *Cs. Mar.* 18 (4): 57-74.
- MACHUCA C., BUCKLE F. 1983. Cultivo de las microrlagas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidas por estiércoles degradados. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.* 1:16-21.
- PARSONS T., MAITA Y., LALLI C. 1984. *A Manual de Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Editado por Pergamon Press Ltd. Oxford, EE.UU. 210 pp.
- PONNE G. 2001. Crecimiento y asimilación de compuestos nitrogenados y fosfatos de *Tetraselmis chuii* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Nitrofoska Foliar. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Boca del Río, Venezuela.
- RODRIGUEZ P. 1995. Valor nutritivo de *Isochrysis galbana* cultivada masivamente en tres medios nutritivos bajo condiciones semicontroladas. Trabajo de grado, Departamento de Biología Marina, universidad de Oriente, Boca del Rio, Venezuela 78 pp.
- STEIN J. 1973. *Handbook of Phycological Methods*. Editado por Cambridge University Press. Florida, EE.UU. 446 pp.
- STRICKLAND, J., PARSONS T. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. *J. Fish.* 167: 1-130.
- SU H. SU M., LIAO I. 1997. Collection and culture of live foods aquaculture in Taiwán. *Hydrobiology*, 358: 37-40.
- TORO J. E. 1989. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquac. Fish Manag.* 20: 249-254.
- URIBE E. 1992. *Cultivo de microalgas*. Editado por la Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile. 43 pp.

- URIBE E. 1996. Tecnología de cultivos de microalgas. Curso Internacional en Cultivo de Moluscos. Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile. 44 pp.
- VELÁSQUEZ A. 1982. Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella salina*, y *Tetraselmis suecica* en medio de cultivo enriquecido. Trabajo para ascender a la categoría de Profesor Asistente. Universidad de Oriente. Boca del Río, Venezuela. 53pp.
- WHYTE J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.
- ZAR J. 1996. *Bioestatal Analysis*. Prentice Hill. Barcelona, España. 662 pp.
- ZAVALA J. 1988. Producción de biomasa de *Tetraselmis Suecica* (Kylin) Butch y *Artemia franciscana* Kellog a partir del estiércol de gallina. Trabajo de Grado. Universidad Autónoma de Guadalajara. Ciudad de México, Mexico. 62 pp.