

Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial.

Carlos Enrique Medina-Reyna *
Beatriz Cordero-Esquivel **

Resumen

La diatomea central *Chaetoceros muelleri* se mantuvo en un cultivo estático con el fin de evaluar su crecimiento durante el escalamiento desde el nivel matraz de 100 ml hasta columna de 300 l y relacionar la composición química celular con las diferentes fases de crecimiento. Se ensayó el medio de cultivo f/2 y f/2 de Fritz en el nivel matraz de 100 ml para seleccionar el medio de cultivo más conveniente para el escalamiento. Se obtuvo un adecuado crecimiento con el medio Fritz el cual rindió tasas diarias de crecimiento semejantes en cada nivel del escalamiento. La composición bioquímica de esta diatomea dependió de su fase de crecimiento. La fracción de carbohidratos y proteínas no fueron diferentes entre las fases exponencial y estacionaria mientras que las porciones lipídica y mineral fueron mayores en la fase estacionaria.

Palabras clave: crecimiento, composición bioquímica, diatomea marina, *Chaetoceros muelleri*.

Abstract

The Marine diatom, *Chaetoceros muelleri* was grown in batch culture in order to assess growth rates during scale-up to 300 L-column level and test the effects of growth phase on biochemical composition. Guillard's f/2 and Fritz's f/2 were compared in 100 ml flask. Fritz's medium gives equal growth rate in each scaling level. Diatom biochemical composition depend on growth phases. Carbohydrate and protein contents were not different in the log and stationary phase but lipid and mineral contents were greater during the latter

Key words: Growth, biochemical composition, marine diatom, *Chaetoceros muelleri*

Introducción

El fitoplancton, constituido por las microalgas, por ser el medio de entrada de la energía solar a los ecosistemas conforma la base de las cadenas alimenticias acuáticas. Con su maquinaria fotosintética produce nutrimentos que, en la mayoría de las veces, los organismos superiores no pueden sintetizar, tal es el caso de los ácidos grasos poli-insaturados y las vitaminas (Tacon, 1990).

* Instituto de Industrias. Universidad del Mar. Puerto Angel, Oaxaca. E-mail: peneion@angel.umar.mx

** Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, B. C. E-mail: bcordero@cicese.mx

Las microalgas juegan un papel preponderante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo que soporta el crecimiento de las fases tempranas de vida de casi todos los organismos cultivados (Brown *et al.*, 1989, 1997).

Dentro de los grupos de microalgas utilizadas en acuicultura, se distinguen las diatomeas centrales, ya que han demostrado ser un buen alimento (Brown *et al.*, 1989). Sin embargo, su cultivo masivo se dificulta debido a la cuantificación precisa y oportuna de nutrientes, a pesar de que se conocen algunos aspectos de los parámetros de crecimiento relacionadas con la limitación de

nutrientes en condiciones naturales y controladas (Regan, 1988).

Por su uso obligado en muchos laboratorios de producción de larvas para acuicultura, el cultivo de *Chaetoceros* spp. y de otras microalgas representa un esquema cotidiano, formulado y mecánico en el cual se conjugan aspectos relacionados con un manejo inconsistente y variable que disminuye la calidad bioquímica sostenible, que al final se traduce en el valor nutricional (Bustillos-Hurtado y López-Elías, 1994). El conocimiento de esta manipulación no intencional da pauta para proponer esquemas de manejo con cotas que permitan predecir al larvicultor el valor nutricional de la microalga bajo condiciones típicas hasta cierto punto controlables. Este trabajo intenta describir un manejo típico y su consecuencia en la calidad bioquímica de una microalga, como indicador de su valor nutricional.

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar el crecimiento de la diatomea central *Chaetoceros muelleri* Lemmerman en cada nivel del escalamiento del cultivo estático desde el nivel de tubo de ensayo hasta columna de 300 l y relacionar las fases de crecimiento de esta diatomea en el nivel carboy con su respectiva composición bioquímica.

Materiales y métodos

A. Escalamiento del cultivo

Se siguió el esquema propuesto por Paniagua-Michel *et al.* (1989) con el fin de caracterizar un ciclo de producción de microalgas para acuicultura. Este escalamiento involucra el cultivo estático desde tubo de ensayo hasta la producción masiva, por lo que se considera como representativo para la diatomea empleada.

1. Obtención de cepa. La microalga *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1) se obtuvo de la colección de microalgas del CICESE (Trujillo-Valle, 1995).

¹ Fritz Industries Inc. Aquaculture Division. Dallas, TX. USA. El uso de la marca no implica retribución por su uso.

2. Cultivo estático en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Con el objetivo de seleccionar un medio de cultivo adecuado para el escalamiento, se empleó al medio f/2 de Guillard y al medio f/2 producido comercialmente por Fritz Chemical Inc.¹ En ambos casos se siguió, en lo posible, el protocolo descrito por Paniagua-Michel *et al.* (*op. cit.*); y las indicaciones del fabricante. Los tratamientos se realizaron por triplicado. El monitoreo de la población se realizó simultáneamente empleando la técnica del conteo directo y densidad óptica (Guillard, 1973; Paniagua-Michel *et al.*, 1989).

3. Cultivo en matraces Fernbach de 2 l. Una vez seleccionado el medio de cultivo, se procedió a la preparación de 2 l. de cultivo, esterilizando los matraces y vidriería con autoclave a 20 psi por 15 minutos y preparando los estantes de cultivo. Se emplearon dos matraces de vidrio y uno de plástico, mantenidos a 15 cm. de tres series de tubos alternados con luz fluorescente tipo Cool-White y Day-Light de 40 w. Las microalgas se mantuvieron por espacio de nueve días y diariamente se monitoreó su población de acuerdo a Paniagua-Michel *et al.* (*op. cit.*).

4. Cultivo en carboys de 18 l. En el cultivo anterior se seleccionó a la población de microalgas con mejor crecimiento para inocular a dos carboys. Estos recipientes son semejantes a lo descrito por Paniagua-Michel *et al.* (*op. cit.*) y fueron tratados al igual que al agua de mar por esterilización química en la forma descrita por los autores citados. Se inocularon 5×10^4 cél.ml⁻¹. Se inyectó CO₂ para mantener un valor de pH no mayor de 8. En este nivel se continuó el monitoreo de la manera descrita en el nivel precedente. Se obtuvieron filtraciones de alicuotas de 10 y 5 ml para análisis gravimétrico y bioquímico.

5. Cultivo en columna de 300 l. Se seleccionó al carboy con mejor crecimiento y menor grado de bacterización para inocular una columna vertical con fondo cónico de 300 l, hecha con una lamina de fibra de vidrio, y soportada por una base metálica de solera de 3/8" adaptada por cuatro pares equidistantes de lámparas fluorescentes Cool-White de 40w. El agua de

mar empleada en este nivel fue esterilizado químicamente como en el nivel precedente. La columna fue llenada hasta 150 l y se inoculó 1×10^5 cél. ml⁻¹. Se siguió el monitoreo de la población mediante el conteo estimado por densidad óptica.

6. Equipos empleados. El monitoreo diario consistió en determinaciones de temperatura, potencial de Hidrogeno y población. En cada respectivo caso se empleó un termómetro de cubeta con un intervalo de 0 a 50°C $\pm 1^\circ\text{C}$, un medidor de pH marca Cole-Parmer modelo pH-Tester, y una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Para la estimación de la población microalgal se usó un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1201.

7. Condiciones de mantenimiento. Durante el escalamiento se obtuvieron las siguientes condiciones: Salinidad: 33-34 UPS, Temperatura: 22 - 30°C, pH: 7.9 - 9, Iluminación: 140- 191 me m⁻² s⁻¹, Aireación: Constante, CO₂: <1% del volumen de aire para agitación por 2 minutos cada 24 horas.

B. Análisis gravimétrico y bioquímico

1. Análisis gravimétrico. Se determinó el peso seco (PS), peso de cenizas (PC) y peso seco libre de cenizas (PSLC) utilizando el protocolo de Sorokin (1973). Las muestras se secaron a peso constante en una estufa de convección a 50°C e incinerado a 470°C en una mufla.

2. Análisis bioquímico. El contenido de proteínas se determinó de acuerdo a Lowry *et al.* (1951), usando al suero de albúmina de bovino como estándar, de acuerdo con Lopez-Elías y Voltolina (1993). El contenido de carbohidratos se determinó con el método de fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), usando Glucosa como estándar, previa extracción según el método de White (1987). El contenido de lípidos se determinó colorimétricamente con la técnica de Pande *et al.* (1963), empleando tripalmitina como estándar, previa extracción con el método de Bligh y Dyer (1959).

C. Análisis estadístico

Para las calibraciones de las estimaciones de la biomasa celular, por medio de la densidad óptica, y las determinaciones bioquímicas se utilizó el análisis de regresión lineal simple. Se empleó un análisis de varianza de una vía para probar la significancia de los efectos de los cuatro diferentes niveles del escalamiento de cultivo sobre los logaritmos binarios de las tasa medias diarias de crecimiento, que se obtuvieron según Guillard, (1973); y Paniagua-Michel *et al.* (1989). Al aplicar logaritmo se atenuó el efecto de heterocedacidad de varianza, normalidad y aditividad (Zar, 1984). Se realizó una prueba de independencia para probar la significancia del efecto de las fases de crecimiento en la composición bioquímica del nivel carboy. Se aplicó una prueba t de Student para encontrar diferencias entre el porcentaje de cada componente bioquímico entre las dos fases del crecimiento. En todas las pruebas se utilizó una significancia nominal de 5%.

Resultados

En el nivel matraz Erlenmeyer de 100 ml se observó rápido crecimiento y mayor producción de biomasa de la microalga con el medio Fritz, aunque al final del cultivo se evidenció que el medio f/2 mantuvo la producción de biomasa hasta aproximadamente 5×10^6 cél. ml⁻¹ (Figura 1). La tasa diaria de crecimiento fue de 1.310 y 1.73 para el medio f/2 y Fritz, respectivamente. En relación a la producción de biomasa, en términos de rendimiento, la concentración de células obtenida con el medio Fritz fue casi el doble que la obtenida por el medio f/2 al cabo de seis días.

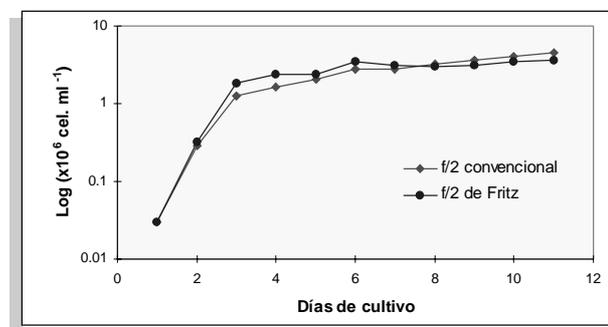


FIGURA 1: CRECIMIENTO DE *Chaetoceros muelleri* EN NIVEL MATRAZ ERLERMAYER DE 100 ML CON EL MEDIO DE CULTIVO F/2 CONVENCIONAL Y F/2 DE FRITZ.

En el nivel Fernbach, solo se presenta la información obtenida del crecimiento y biomasa de la microalga obtenida en los matraces de vidrio debido a que en el matraz de plástico se observó una menor tasa diaria de crecimiento. La biomasa alcanzó un máximo de 2.5×10^6 cél. ml^{-1} en cinco días de cultivo. La tasa diaria de crecimiento varió de 0.32 a 3.03 con un valor promedio de 1.42.

En el nivel carboy o botellón se obtuvo la mayor biomasa de la diatomea al octavo día de cultivo con una población de 8.98×10^6 cél. ml^{-1} . La tasa diaria de crecimiento osciló de 0.21 a 3.96 con un valor medio de 1.25 divisiones. El potencial de Hidrógeno afectó negativamente el cultivo, ya que al presentarse situaciones alcalinas ($\text{pH} < 9.5$), la población sufrió un decremento en su crecimiento.

El cultivo realizado en la columna de 150 l. tuvo una mayor producción de biomasa al sexto día de cultivo, con una concentración de 3.48×10^6 cél. ml^{-1} . La tasa diaria de crecimiento varió de 0.31 a 2.05 con un valor medio de 0.97 divisiones. El efecto del aumento del pH (> 9.5) en el sexto día se reflejó en un decremento de la tasa de crecimiento del día siguiente.

Nivel	Parámetros de crecimiento			Rendimiento	
	Tasa diaria media	Desviación estandar	Intervalo observado	Biomasa	Tiempo (Días)
Matraz 100ml	1.72	1.24	0.585 -3.115	3.5	6
Matraz Fernbach	1.42	1.20	0.32 -3.03	2.6	5
Carboy 18l	1.25	1.42	0.21 -2.05	8.98	8
Columnas 150l.	0.97	0.60	0.31 -2.05	3.48	6

TABLA I: SUMARIO DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO ($\text{DIV} \cdot \text{D}^{-1}$) Y RENDIMIENTO EN BIOMASA (10^6 CÉL. ML^{-1}) DE *CHAETOCEROS MUELLERI* EN CADA NIVEL DEL ESCALAMIENTO CULTIVADAS CON EL MEDIO F/2 DE FRITZ.

Al comparar las tasas medias de crecimiento de cada nivel no se encontraron diferencias significativas entre ellas ($F_{3,15} = 0.69$, $p < 0.05$), por lo que se concluye que la microalga se dividió con la misma tasa de crecimiento en cada nivel del escalamiento (Tabla I).

La constitución bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* cultivada en el nivel carboy mostró un patrón característico de esta especie. Durante los días estudiados, la dominancia del porcentaje de cenizas fue evidente. Su proporción

varió de 41.05 al 63.38%. El porcentaje de carbohidratos no mostró una tendencia y tuvo un intervalo de 10.41 a 28.78%. El constituyente lipídico se incrementó hacia el final del cultivo, en el cual osciló de 6.94 a 21.74%. El componente

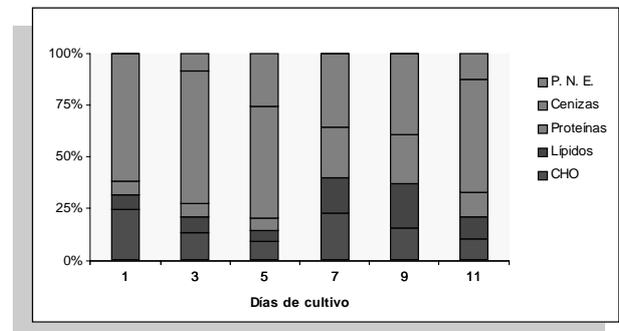


FIGURA 2 PORCENTAJE DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA (COMO % DE PSLC) DE *Chaetoceros muelleri* CULTIVADA EN EL NIVEL CARBOY. CHO: CARBOHIDRATOS. P. N. E. INDICA LA DIFERENCIA ENTRE EL PESO SECO Y LAS CONCENTRACIONES DE LAS DIFERENTES FRACCIONES CELULARES MEDIDAS CON LOS ANÁLISIS QUÍMICOS CORRESPONDIENTES MÁS LAS CENIZAS.

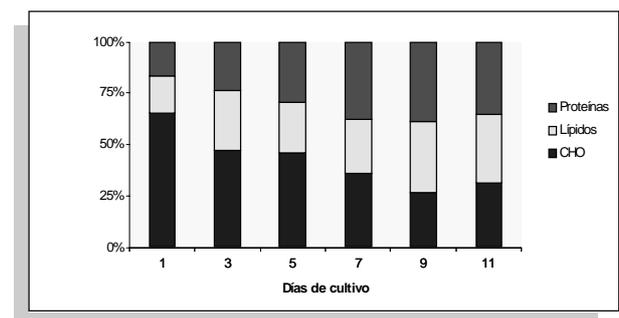


FIGURA 3 PORCENTAJE DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA (COMO % DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA) DE *Chaetoceros muelleri* CULTIVADA EN EL NIVEL CARBOY. CHO: CARBOHIDRATOS.

protéico se comportó de la misma forma que los lípidos y su proporción varió de 6.15 a 30.24% (Figura 2 y 3). Con la fracción no explicada por las técnicas empleadas en tres determinaciones el total explicado excedió el 100% y en tres casos representó del 8.82 al 25.58% (Figura 2).

La composición bioquímica de *Ch. muelleri* mantenida en el nivel carboy dependió de la fase de crecimiento ($c^2_{\text{obs.}} = 48.45$, $c^2_{0.05,3} = 7.815$) por lo que se compararon los porcentajes obtenidos por cada constituyente celular entre las dos fases de crecimiento. De esta manera, se encontró que la proporción de carbohidratos y proteínas no fue-

Biomasa				Constituyentes (%)			
Día de cultivos	Fasa	Población 10 ⁶ cél.ml	PSLC	Carbohidratos ¹ n.s	Lípidos ² s.	Proteínas ³ n.s	Cenizas ⁴ s.
1	Exponencial	0.05		24.95	6.94	6.26	62.48
3		2.49	179.81	13.14	8.14	6.52	63.38
5		4.05	228.68	9.42	5.07	6.15	53.78
7	Estacionaria lento crecimiento	6.56	40.78	28.78	21.30	30.24	44.82
9		7.80	40.38	16.63	21.74	24.72	41.05
11		9.07	102.54	10.41	10.87	11.69	54.07
1: $t_{0.05(1)} = -0.34, p = 0.38$		2: $t_{0.05(1)} = -3.07, p = 0.04$		3: $t_{0.05(1)} = -2.89, p = 0.051$		4: $t_{0.05(1)} = 2.68, p = 0.02$	

TABLA II: BIOMASA Y COMPONENTES BIOQUÍMICOS CELULARES (EN PORCENTAJE DE PESO SECO LIBRE DE CENIZAS) DE *CHAETOCEROS MUELLERI* CULTIVADA EN CARBOY DE 18 L. PSLC INDICA EL PESO SECO LIBRE DE CENIZAS (MG) POR MILLÓN DE CÉLULAS. S: SIGNIFICANTE MAYOR Y N.S. NO SIGNIFICANTE.

ron significativamente diferente entre las fases de crecimiento mientras que las proporciones de lípidos y cenizas resultaron significativamente mayores en la fase estacionaria que en la fase exponencial (Tabla II).

Discusiones y conclusiones

El crecimiento de *Chaetoceros muelleri* se manifestó dentro del intervalo de la especie (Trujillo-Valle, 1995). En los cuatro escalamientos realizados se presentaron tres factores que determinaron la gran variación en la estimación de la tasa de crecimiento diario (Tabla I). Dos factores aleatorios provocados por las condiciones ambientales interiores y exteriores pudieron seguirse: la temperatura y el potencial de Hidrógeno (pH). De éstos, el pH afectó adversamente la tasa diaria de crecimiento, situación que se solventó en lo posible con la inyección de CO₂. La variación sistemática se le atribuye a los errores en las estimaciones de densidad. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de este parámetro poblacional en cada nivel del escalamiento.

La producción de biomasa de *Ch. muelleri* fue mayor con el medio Fritz que con el medio f/2 a nivel matraz de 100 ml. Este rendimiento permitió seleccionar al primero para su posterior uso en el escalamiento (Tabla I). En términos de tiempo, el uso de este medio se traduce en un ahorro debido a los cálculos y preparación de los constituyentes del medio f/2. La tasa diaria de creci-

miento de *Ch. muelleri* en el nivel Fernbach, Carboy y Columna fue menor en comparación a lo reportado por Trujillo-Valle (1995). Estas diferencias son atribuibles al uso de una concentración diferente del medio f.

En relación a la producción de biomasa por *Chaetoceros muelleri* se observó que en el nivel carboy fue mayor, lo que concuerda con lo reportado para otras especies de *Chaetoceros* (Aquacop, 1983).

La composición bioquímica de las microalgas depende, en mayor grado, de la concentración de los nutrimentos en el medio de cultivo y del estado fisiológico (Myklestad y Haug, 1972). Se ha reportado que para las diatomeas, la mayor porción lo constituyen las cenizas (Parsons *et al.*, 1984; Cordero-Esquivel *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo reflejaron este patrón (Tabla II), el cual es atribuible a la formación y constitución de la frústula de las diatomeas (Paasche, 1973).

Parsons *et al.* (1984), consideraron que la constitución orgánica es similar entre las microalgas y observaron la predominancia de las proteínas. En este reporte, solo se halló esta tendencia en los últimos tres días del experimento (Tabla II).

Se observó que la composición bioquímica depende de la fase de crecimiento, lo que concuerda con lo reportado por Myklestad (1977). En el presente caso, se estudió la fase exponencial

y la estacionaria, que coincide con tres días del experimento, respectivamente. Esto permitió evidenciar que los carbohidratos y proteínas conservaron su proporción en estas dos fases, aunque es evidente una fracción mayor en el primer día de cultivo (Tabla II). Este valor probablemente reflejó un almacenamiento inducido en la fase estacionaria logrado en el nivel anterior.

La fracción lipídica y mineral fue mayor en la fase estacionaria que en la exponencial. Esta tendencia es semejante a lo reportado para *Chaetoceros gracilis* (Bustillos-Hurtado y López-Elías, 1994, Brown *et al.*, 1997). Este comportamiento refleja la producción de carbohidratos como sustancia de reserva y la liberación de polisacáridos extracelular como respuesta a una limitación de nutrientes, que ocurre en la fase estacionaria (Myklestad, 1977).

Se concluye de este trabajo que el medio Fritz soporta adecuadamente el crecimiento de *Chaetoceros muelleri*, dando como resultado tasas diarias de crecimiento homogéneas en cada nivel del escalamiento y la mayor biomasa en el nivel carboy. La composición bioquímica depende de la fase de crecimiento. La proporción inorgánica es mayor que la orgánica. Esta última guardó la tendencia descrita para las microalgas. La proporción de carbohidratos y proteínas fue semejante en la fase exponencial y estacionaria, en tanto que la fracción lipídica y mineral fue mayor en la fase estacionaria.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Lourdes Trujillo-Valle, Patricia Ascencio, Norberto Flores, Ana Calero y Cecilia Flores (Acuicultura-CICESE) por su asistencia técnica en la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Aquacop, 1983. *Algal Food Cultures at the Centre Océanologique du Pacifique*. pp. 3-14. En: McVey, J. P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture Vol. 1. *Crustacean Aquaculture*. CRC Press Inc. Boca Raton, FLA. USA. 442 pp.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. 1959. «A rapid method of total lipid extraction and purification». *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. y Garland, C. D. 1989. *Nutritional Aspects of Microalgae used in Mariculture: A literature review*. CSIRO Marine Laboratories Rep.205. CSIRO Australia. 42 pp.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., J. K. Volkman y Dunstan, G. A. 1997. «Nutritional properties of microalgae for mariculture». *Aquaculture* 151: 315-331.
- Bustillos-Hurtado, C.A. y López-Elías, J. A. 1994. «Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento, cultivadas en medios simplificados». *Oceanología* 2:133-148.
- Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D. y Correa-Sandoval, F. 1993. «The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques». *Comp. Biochem. Physiol.* 105B(2):369-373.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. «A colorimetric method for determination of sugars and related substances». *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Guillard, R.R. I. 1973. *Division rates*. 289-312 p.. En: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 pp.
- Myklestad, S. y Haug, A. 1972. «Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* Var». *Willei* (Gran) Hustedt. I. «Effect of the concentration of nutrients in the culture medium». *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 9:125-136.
- Myklestad, S. 1977. «Production of carbohydrates by the marine planktonic diatom. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var». *Willei* (Gran) and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 29:161-1179.
- López-Elías, J. A. y Voltolina, D. 1993. «Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional». *Ciencias Marinas* 19 (2): 169-180.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. I. y Randall, R. J. 1951. «Protein measurement with Folin phenol reagent». *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Paasche, E. 1973. «Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. II. Silicate-uptake kinetics in five diatom species». *Mar. Biol.* 19: 262-269.

Pande, S. V., Khan, R. P. y Venkitesubra, T.A. 1963. «Microdetermination of lipids and serum total fatty acids». *Anal. Biochem.* 6:415-423.

Paniagua-Michel, J., Buckle-Rámirez, I. F., Granados-Machuca, C. y Loya-Salinas, D. 1989. *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas*. 2a. Ed. CICESE, Ensenada, B. C. México. 50 pp.

Parsons, T. R., Takahashi, M. y Hargrave, B. 1984. *Biological Oceanographic Processes*. 3a. Ed. Pergmon Press Ltd. Oxford, England. 330 pp.

Regan, D. I. 1988. *Other micro-algae*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, I. J. (Ed.). *Microalgal Technology*. Cambridge University Press. Cambridge, MA. USA. 477 pp.

Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343 p. En: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. Cambridge, MA. USA. 448 pp.

Tacon, A. 1990. *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimps*. Argent Lab. Press. Redmond, WA. USA. 117 pp.

Trujillo-Valle, M.I. 1995. *La Colección de Microalgas del CICESE. Inf. Técnico CIACT9301. Com. Acad. Ser. Acuicultura*. CICESE. 103 pp.

White, J. N. C. 1987. «Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves». *Aquaculture* 60:231-241.

Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2a. Ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. USA. 718 pp.