

Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas

Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers

Enrique Valenzuela-Espinoza^{1*}
 Fabiola Lafarga-De la Cruz²
 Roberto Millán-Núñez²
 Filiberto Núñez-Cebrero¹

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas

² Facultad de Ciencias Marinas

Universidad Autónoma de Baja California

Apartado postal 453

Ensenada 22860, Baja California, México

* E-mail: evale@uabc.mx

Recibido en marzo de 2004; aceptado en septiembre de 2004

Resumen

Se evaluaron el crecimiento, el consumo de nutrientes (PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+) y la composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada durante siete días en cultivos estáticos con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas. El crecimiento resultó similar en ambos medios, con tasas medias de crecimiento de 0.37 y 0.38 día⁻¹. El contenido de proteínas de *Rhodomonas* sp. fue mayor en los cultivos con medio f/2 que en los cultivos con fertilizantes agrícolas, presentando valores medios de 10.7 y 8.96 pg célula⁻¹, respectivamente. Los carbohidratos y los lípidos disminuyeron durante la fase de crecimiento exponencial y no hubo diferencias ($P = 0.027$ y 0.08, respectivamente) entre tratamientos, mientras que en la fase de crecimiento lento los carbohidratos aumentaron resultaron mayores en las células cultivadas con medio f/2. Los lípidos presentaron poca variación durante la fase estacionaria, pero resultaron ser mayores en las células cultivadas con fertilizantes agrícolas. Durante los primeros cinco días de cultivo, el consumo total de fosfato por *Rhodomonas* sp. fue de 39.9 μM (94.3%) en medio f/2 y 40 μM (99%) en medio con fertilizantes. En los primeros cuatro días de cultivo en medio f/2 se consumió un total de 677.3 μM de nitrato (72.2%), mientras que en los primeros tres días en el medio con fertilizantes que contenía nitrato de amonio, el consumo de amonio (418.1 μM ; 78.7%) fue mayor que el consumo de nitrato (37.7 μM ; 7.3%). Sin embargo, cuando la concentración de amonio se redujo aproximadamente a 1.83 μM , el consumo de nitrato se incrementó. En ambos medios de cultivo la cantidad y calidad celular de *Rhodomonas* sp. obtenida fue similar, por lo que se concluye que los fertilizantes agrícolas pueden ser usados en programas de acuicultura marina.

Palabras clave: fertilizantes, consumo de nutrientes, composición proximal, *Rhodomonas* sp.

Abstract

We determined the growth, nutrient (PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+) uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured during seven days in batch culture using f/2 medium and agricultural fertilizers. The growth rate was similar with both media ($\mu = 0.37$ and 0.38 day⁻¹). Protein content in *Rhodomonas* sp. cultured with f/2 medium was higher than with agricultural fertilizers (10.7 and 8.96 pg cell⁻¹, respectively). Carbohydrate and lipid contents decreased during the exponential growth phase and there were no significant differences ($P = 0.027$ and 0.08, respectively) between both experiments. Carbohydrate content was higher during the slow growth phase in cultures using f/2 medium, whereas lipid content showed little variation during the slow growth phase, but was higher in cells cultured using agricultural fertilizers. During the first five days, total phosphate uptake by *Rhodomonas* sp. was 39.9 μM (94.3%) in the f/2 medium and 40 μM (99%) in the agricultural fertilizer medium. A total of 667.3 μM of nitrate (72.2%) was consumed during the first four days in the f/2 medium, whereas in the agricultural fertilizer medium formulated with ammonium nitrate, ammonium uptake (418.1 μM , 78.7%) in the first three days was higher than nitrate uptake (37.7 μM , 7.3%); however, when ammonium concentration decreased to 1.83 μM , the nitrate uptake increased. In conclusion, the cellular quantity and quality of *Rhodomonas* sp. was similar when both media were used and agricultural fertilizers can be used in marine aquaculture programs.

Key words: agricultural fertilizers, proximate composition, nutrient uptake, *Rhodomonas* sp.

Introducción

Rhodomonas sp. es un alga unicelular flagelada perteneciente a las criptofitas, cuyo diámetro celular varía entre 9.2 y 9.9 μm . Esta microalga marina es utilizada para alimentar larvas de erizo (Rogers-Bennett *et al.*, 1994), copépodos (Jónasdóttir, 1994), gasterópodos (Aldana-Aranda y Patiño-Suárez, 1998), larvas y juveniles de diferentes especies de ostión (Ferreiro *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999), y larvas de camarones peneidos (Støttrup y McEvoy, 2003). Para su cultivo se usa comúnmente alguna variante del medio f/2 (Guillard, 1975) que, en general, se prepara con sales de grado industrial o con fertilizantes, los cuales pudieran modificar el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas. Por esta razón, es necesario verificar el efecto de estas formulaciones de menor costo.

Existen estudios que han examinado el crecimiento de microalgas en medios de cultivo preparados con fertilizantes agrícolas (López-Elías y Voltolina, 1993; López-Ruiz *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 1996, 1998, 2000; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Simental-Trinidad y Sánchez-Saavedra, 2003). Otros han investigado como varía la composición bioquímica de diferentes especies de microalgas al cultivarlas en medios preparados con fertilizantes agrícolas (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). También se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento y la composición bioquímica del fitoplancton en cultivo (Lourenco *et al.*, 2002). Estos estudios mencionan que la cantidad y calidad de la biomasa producida no se afecta por el uso de esta fuente de nutrientes. Sin embargo, pocos investigadores han considerado el uso de estos medios para el mantenimiento de los primeros niveles de cultivo, desconociéndose, además, su efecto en el cultivo de *Rhodomonas* sp. Por esta razón es necesario verificar de qué manera se pueden ver modificados el crecimiento, la composición bioquímica y el consumo de nutrientes de estas microalgas en distintos medios de cultivo, con la finalidad de aplicar esta información para eficientizar los programas de acuicultura marina comercial.

En este trabajo se presenta un estudio comparativo entre dos medios de cultivo para evaluar los cambios diarios en el crecimiento, consumo de nutrientes y contenido bioquímico de *Rhodomonas* sp. cultivadas en medio f/2 y con fertilizantes agrícolas, considerando la hipótesis de que la fuente de nutrientes puede originar cambios en el crecimiento y contenido bioquímico de estas microalgas marinas.

Materiales y métodos

Cultivo de microalgas

Rhodomonas sp. se obtuvo del cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (México). Esta cepa se mantuvo en cultivo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura con medio f/2 (Guillard, 1975). El medio

Introduction

Rhodomonas sp. (Cryptophyta) is a unicellular flagellate alga, the cell diameter ranging from 9.2 to 9.9 μm . This marine microalga is used to feed sea urchin larvae (Rogers-Bennett *et al.*, 1994), copepods (Jónasdóttir, 1994), gastropods (Aldana-Aranda and Patiño-Suárez, 1998), larvae and juveniles of different oyster species (Ferreiro *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999), and penaeid shrimp larvae (Støttrup and McEvoy, 2003). Some variant of the f/2 medium (Guillard, 1975) is commonly used for its culture. These low-cost alternatives are generally prepared with industrial grade salts or fertilizers and it is important to verify whether they modify the alga's growth and biochemical composition.

Studies have been conducted on the growth (López-Elías and Voltolina, 1993; López-Ruiz *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 1996, 1998, 2000; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Simental-Trinidad and Sánchez-Saavedra, 2003) and biochemical composition (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002) of different species of microalgae using agricultural fertilizers as culture medium. The effect of different nitrogen sources on the growth and biochemical composition of phytoplankton in batch culture has also been studied (Lourenco *et al.*, 2002). These studies mention that the quantity and quality of the biomass produced is not affected by the use of this source of nutrients, but few researchers have considered using these media to maintain the first levels of cultures. As their effect on the culture of *Rhodomonas* sp. is not known, it is necessary to verify how the growth, biochemical composition and nutrient uptake of this alga may be modified by different culture media in order to determine how they can best be used in commercial marine aquaculture.

In this work we present a comparative study between two culture media to assess daily changes in growth, nutrient uptake and biochemical content of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers, considering the hypothesis that the nutrient source may be responsible for changes in the growth and biochemical content of this marine microalga.

Materials and methods

Culture of microalgae

Rhodomonas sp. was obtained from the strain bank at the Institute of Oceanological Research of the Autonomous University of Baja California (Mexico). This strain was cultured at a temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$ in f/2 medium (Guillard, 1975). The medium formulated with agricultural fertilizers was composed of 882 μM N-NH₄NO₃, 39.45 μM P-P₂O₅, 15.51 μM Fe-EDTA, 8.07 μM MnSO₄, 6.75 μM ZnSO₄, 13.92 μM CuSO₄, 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ biotine, 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ B₁₂ and 0.1 mg L⁻¹ thiamine-HCl (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). To prepare

con fertilizantes agrícolas estuvo constituido por 882 μM de $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$, 39.45 μM de $\text{P-P}_2\text{O}_5$, 15.51 μM de Fe-EDTA , 8.07 μM de MnSO_4 , 6.75 μM de ZnSO_4 , 13.92 μM de CuSO_4 , 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de biotina, 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de B_{12} y 0.1 mg L^{-1} de tiamina-HCl (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). Para preparar los medios de cultivo, el agua de mar se filtró a través de filtros tipo Cuno de 3 y 1 μm , y se irradió con un sistema de luz ultravioleta modelo H-50.

El crecimiento se verificó durante siete días en cultivos realizados en niveles de 0.15, 1.7 y 18 L de volumen, en todos los casos por triplicado. Para los dos primeros niveles de cultivo (Erlenmeyer y Fernbach) el medio y los recipientes se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.05 kg cm^{-2} de presión por 10 min. Se utilizaron inóculos de 6, 156 y 1.856 mL para cada nivel, y para el tercero, antes de la inoculación el agua de mar se irradió con lámparas de luz UV y se trató químicamente (Pruder y Bolton, 1978). La irradiancia en cada nivel de cultivo, medida con un irradiómetro escalar PAR modelo QSL-100 (4 π sensor, Biospherical Instruments) fue de 72.2, 99.3 y 110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las condiciones de cultivo en el caso del último nivel fueron: 4.5 L min^{-1} de flujo de aire, pH de 7.9–9.0 y salinidad de $32.5 \pm 0.5\%$. Estas condiciones de cultivo se mantuvieron por siete días, en los cuales se cuantificó, diariamente y por duplicado para cada tratamiento ($n = 3$), la densidad celular con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad, observando mediante un microscopio compuesto (Bausch and Lomb). El pH se midió diariamente con un potenciómetro (Chemcadet Jr.), la temperatura con un termómetro (Ertco) y la salinidad con un refractómetro (Reichert-Jung). De los resultados de densidad celular se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1973).

Métodos analíticos

Para determinar proteínas, carbohidratos, lípidos (peso fresco) y consumo de fosfato, nitrato y amonio, se recolectaron muestras diarias (250 mL) de microalgas, de densidad celular conocida, durante los primeros dos días de cada condición experimental ($n = 3$). De aquí en adelante, sólo se recolectaron muestras de 150 mL en el tercer día, de 100 mL del cuarto al sexto día y de 80 mL en el séptimo día. El filtrado fue a través de filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm y 47 mm de diámetro, previamente incinerados a 450°C durante 24 h. La biomasa retenida en los filtros se enjuagó con formato de amonio (2%) y se colocó en tubos de ensayo con rosca de 20 mL y el agua del filtrado se recolectó en botellas de plástico de 250 mL. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente a -60°C para su posterior análisis.

Previamente, se obtuvieron curvas de calibración para cada uno de los constituyentes celulares y los nutrientes. Fosfato y nitrato se analizaron de acuerdo con los métodos descritos por Parsons *et al.* (1985), mientras que el amonio se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Grasshoff *et al.*

the culture media, seawater was passed through 3- and 1- μm Cuno filters and irradiated with an ultraviolet light system (model H-50).

Growth was assessed during seven days in culture volumes of 0.15, 1.7 and 18 L, in all cases in triplicate. For the first two levels (Erlenmeyer and Fernbach), the medium and containers were sterilized by autoclave at 121°C and 1.05 kg cm^{-2} pressure for 10 min. Inocula of 6, 156 and 1.856 mL were used for each level and for the third, prior to inoculation, the seawater was UV-irradiated and chemically treated (Pruder and Bolton, 1978). Irradiance for each culture level, measured by a scalar PAR irradiance meter (4 π sensor, Biospherical Instruments model QSL-100), was 72.2, 99.3 and 110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The culture conditions for the third level were: air flow 4.5 L min^{-1} , pH 7.9–9.0 and salinity $32.5 \pm 0.5\%$. These culture conditions were maintained for seven days, during which cell density in each treatment ($n = 3$) was quantified daily, in duplicate, in a Neubauer chamber (0.1 mm deep), observing through a compound microscope (Bausch and Lomb). Daily measurements were taken of pH (Chemcadet Jr. pH meter), temperature (Ertco thermometer) and salinity (Reichert-Jung refractometer). The cell density results were used to calculate the specific growth rate (μ) with the equations described by Guillard (1973).

Analytical methods

To determine proteins, carbohydrates and lipids (fresh weight), as well as phosphate, nitrate and ammonium uptake, samples of microalgae (250 mL) were collected daily, of known cell density during the first two days of each experimental condition ($n = 3$). Then, samples of only 150 mL were collected on the third day, 100 mL from the fourth to the sixth day, and 80 mL on the seventh day. The samples were filtered through precombusted (450°C for 24 h) GF/C fiberglass filters 47 mm in diameter (1.2- μm pore size). The biomass retained by the filters was rinsed with ammonium format (2%) and placed in 20-mL screw-top test tubes and the filtered water was collected in 250-mL plastic bottles. The samples were stored immediately at -60°C until further analysis.

Calibration curves were obtained for each of the cell and nutrient constituents. Phosphate and nitrate were analyzed according to the methods described by Parsons *et al.* (1985), while ammonium was determined following the method of Grasshoff *et al.* (1983). For the cell constituents, the following were used: bovine albumin as standard for proteins, D-glucose for carbohydrates and stearic acid for lipids. A Spectronic 21 spectrophotometer was used for the determination. Proteins were extracted following the procedure described in Raush (1981) and quantified according to Bradford's (1976) method. Carbohydrates were determined as glucose by the phenol-sulphuric acid method (Kochert, 1978). Lipids were extracted according to Bligh and Dyer (1959) and quantified as described by Pande *et al.* (1963).

(1983). Para los constituyentes celulares se usaron: albúmina bovina como estándar para proteínas, D-glucosa para carbohidratos y ácido esteárico para lípidos. La determinación se realizó en un espectrofotómetro Spectronic 21. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo con el procedimiento descrito en Raush (1981) y cuantificadas por el método Bradford (1976). Los carbohidratos fueron cuantificados como glucosa por el método fenol-ácido sulfúrico (Kochert, 1978). Los lípidos fueron extraídos siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959), y cuantificados por el método de Pande *et al.* (1963).

Análisis estadístico

Dado que los datos no presentaron una distribución normal ni igualdad de varianzas, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.5$).

Resultados

El crecimiento medio de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas a nivel Erlenmeyer se observa en la figura 1. En ambos medios la densidad celular inicial fue 4.5×10^4 células mL⁻¹. A partir de ese momento inició el crecimiento exponencial, con una duración de cuatro días para ambos tratamientos, presentando tasas de crecimiento de 0.72 y 0.75 día⁻¹ en el medio f/2 y con fertilizante agrícola, respectivamente. Al quinto día inició la fase de crecimiento lento en ambos tratamientos. La máxima densidad celular se obtuvo al séptimo día con 1.33×10^6 y 1.43×10^6 células mL⁻¹ en el medio f/2 y con fertilizante agrícola, respectivamente. Los cultivos a nivel Fernbach iniciaron con 1.17×10^5 células mL⁻¹. El tratamiento con fertilizantes agrícolas presentó una fase de retardo de 24 h y, posteriormente, presentó crecimiento exponencial ($\mu = 0.72$ día⁻¹), mientras que en el medio f/2 el

Statistical analysis

Since the data did not present a normal distribution or equal variances, the Kruskal-Wallis non-parametric test ($\alpha = 0.5$) was applied.

Results

Figure 1 shows the mean growth of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers at Erlenmeyer level. In both media, initial cell density was 4.5×10^4 cells mL⁻¹, followed by the exponential growth phase that lasted four days, with growth rates of 0.72 and 0.75 day⁻¹ in the f/2 medium and agricultural fertilizer medium, respectively. On the fifth day, the slow growth phase began in both treatments and on the seventh day, maximum cell densities of 1.33×10^6 and 1.43×10^6 cells mL⁻¹ were observed in the f/2 medium and agricultural fertilizers, respectively. The cultures at Fernbach level initiated with 1.17×10^5 cells mL⁻¹. In the treatment using agricultural fertilizers, a 24-h lag phase was followed by exponential growth ($\mu = 0.72$ day⁻¹), whereas in the f/2 medium, exponential growth occurred from the beginning until the third day ($\mu = 0.53$ day⁻¹). In both media, the slow growth phase lasted from the third to the sixth day, after which cell density decreased (fig. 1). Maximum densities of 9.89×10^5 and 1.05×10^6 cells mL⁻¹ were recorded for the f/2 medium and agricultural fertilizer medium, respectively. Even though the growth phases differ between the Erlenmeyer and Fernbach levels, there were no significant differences ($P = 0.12$) in biomass production between treatments at each level.

At the 18-L level, the cultures initiated with 1.08×10^5 cells mL⁻¹ (fig. 1), and the growth phases in the treatments coincided in time and length; however, the culture using fertilizers presented a lag phase. At the end of the exponential growth

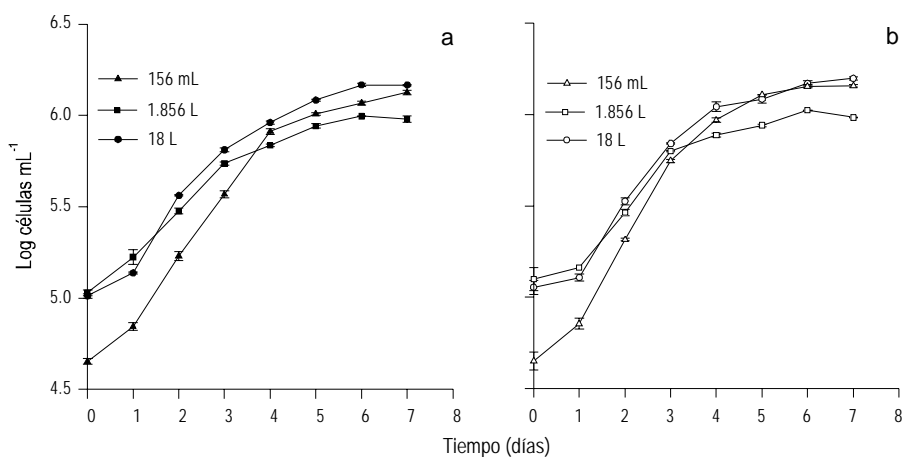


Figura 1. Crecimiento medio de *Rhodomonas* sp. en diferentes volúmenes de cultivo con (a) medio f/2 y (b) fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar ($n = 3$).

Figure 1. Mean growth of *Rhodomonas* sp. in different volumes of culture using (a) f/2 medium and (b) agricultural fertilizers. The vertical bar indicates standard error ($n = 3$).

crecimiento exponencial se produjo desde su inicio hasta el tercer día ($\mu = 0.53 \text{ día}^{-1}$). En ambos medios, la fase de crecimiento lento duró del tercero al sexto día, y a partir de este momento la densidad celular disminuyó (fig. 1). Las densidades máximas obtenidas en medio f/2 y con fertilizante agrícola fueron de 9.89×10^5 y 1.05×10^6 células mL^{-1} respectivamente. Aunque las fases de crecimiento difirieron entre los niveles Erlenmeyer y Fernbach, no hubo diferencias significativas ($P = 0.12$) en la producción de biomasa entre los tratamientos en cada nivel.

En el nivel de 18 L los cultivos iniciaron con 1.08×10^5 células mL^{-1} (fig. 1). En él, las fases de crecimiento coincidieron en tiempo y duración entre tratamientos. Sin embargo, el cultivo con fertilizantes presentó fase de retardo. Al final de la fase exponencial (día 4) la densidad celular en el medio con fertilizantes fue significativamente mayor ($P = 0.04$) respecto a la obtenida en medio f/2. En esta fase, las tasas de crecimiento fueron 0.71 día^{-1} con fertilizante agrícola y 0.63 día^{-1} en medio f/2. Se obtuvieron densidades máximas de 1.49×10^6 y 1.57×10^6 células mL^{-1} en medio f/2 y con fertilizantes agrícolas, respectivamente.

Consumo de fosfato (PO_4^{3-})

En ambos tratamientos se observó un rápido consumo de fosfato durante los primeros cuatro días, el cual se relaciona directamente con el incremento en la densidad celular. Al cuarto día, el consumo acumulado de fosfato en el medio f/2 fue de $38.6 \mu\text{M}$ (91.4%), restando $3.66 \mu\text{M}$ de fosfato residual (8.6%). Asimismo, el consumo acumulado de fosfato en el medio con fertilizantes agrícolas fue de $40 \mu\text{M}$ (98.9%), quedando sólo $0.41 \mu\text{M}$ (1.1%) de fosfato residual. Durante el resto del cultivo (fase de crecimiento lento), debido a la diferencia en la concentración residual del fosfato en el medio entre tratamientos, el consumo resultó ser mayor en el medio f/2 respecto al medio con fertilizantes agrícolas (3.05 vs. $0.21 \mu\text{M}$, respectivamente). La concentración residual final (día 7) de fosfato en los medios de cultivo fue $0.66 \mu\text{M}$ en el medio f/2 y $0.24 \mu\text{M}$ en el medio con fertilizantes agrícolas (fig. 2).

Consumo de nitrato y amonio (NO_3^- y NH_4^+)

En el medio f/2 el nitrato disminuyó conforme transcurrió el tiempo de cultivo (fig. 3a), y para el quinto día sólo quedaba disponible $46.7 \mu\text{M}$, lo que indica que durante el crecimiento exponencial hubo un consumo total de $891.3 \mu\text{M}$ (95%) de nitrato. En los cultivos con fertilizantes agrícolas, el amonio se consumió primero (fig. 3b). Así, mientras el amonio disminuyó durante los primeros tres días de cultivo (fase exponencial), la concentración residual de nitrato permaneció casi constante. Durante este tiempo, el consumo acumulado de amonio fue $418 \mu\text{M}$ (78.8%) y sólo se consumió $37.7 \mu\text{M}$ (7.3%) de nitrato. Una vez que la concentración de amonio en el medio disminuyó a $1.83 \mu\text{M}$, el consumo de nitrato incrementó (fig. 3b). Durante el resto del cultivo, nitrato y amonio fueron

phase (day 4), cell density was significantly greater ($P = 0.04$) in the agricultural fertilizer medium than in the f/2 medium. During this phase, growth rates were 0.71 day^{-1} in the agricultural fertilizer medium and 0.63 day^{-1} in the f/2 medium. Maximum densities of 1.49×10^6 and 1.57×10^6 cells mL^{-1} were recorded for the f/2 medium and agricultural fertilizers, respectively.

Phosphate (PO_4^{3-}) uptake

Rapid uptake of phosphate was observed in both treatments during the first four days, which is directly related to the increase in cell density. On the fourth day, the accumulated phosphate uptake in the f/2 medium was $38.6 \mu\text{M}$ (91.4%), with $3.66 \mu\text{M}$ (8.6%) of residual phosphate, whereas in the agricultural fertilizer medium, the accumulated phosphate uptake was $40 \mu\text{M}$ (98.9%), only $0.41 \mu\text{M}$ (1.1%) remaining. During the slow growth phase, because of the difference in residual phosphate concentration between treatments, uptake was greater in the f/2 medium than in the agricultural fertilizer medium (3.05 vs $0.21 \mu\text{M}$, respectively). The final residual phosphate concentration (day 7) was $0.66 \mu\text{M}$ in f/2 medium and $0.24 \mu\text{M}$ in the agricultural fertilizer medium (fig. 2).

Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) uptake

In the f/2 medium, nitrate decreased during the culture (fig. 3a), only $46.7 \mu\text{M}$ remaining by the fifth day; this indicates that during the exponential growth phase total nitrate uptake was $891.3 \mu\text{M}$ (95%). In the cultures using agricultural fertilizers, ammonium was consumed first (fig. 3b), the residual nitrate concentration remaining almost constant as ammonium decreased during the first three days (exponential growth phase). During this time, accumulated ammonium uptake was $418 \mu\text{M}$ (78.8%), while only $37.7 \mu\text{M}$ (7.3%) of nitrate was consumed. When the concentration of ammonium in the medium decreased to $1.83 \mu\text{M}$, nitrate uptake increased (fig. 3b). During the rest of the culture, nitrate and ammonium were consumed simultaneously and the final residual concentrations were 12.7 and $1.1 \mu\text{M}$, respectively.

In the f/2 medium, total nitrate uptake on the seventh day was $927.7 \mu\text{M}$ (98.9%), whereas in the agricultural fertilizer medium, the microalgal population consumed $1032.9 \mu\text{M}$ (98.7%) of nitrate and ammonium.

Protein content

At the beginning of the experiment, maximum values of 19.1 and $16.9 \text{ pg protein cell}^{-1}$ were recorded for the f/2 medium and agricultural fertilizer medium, respectively. Protein content remained stable during the first 24 h and then decreased (fig. 4a). After 48 h and during the next four days there was no significant variation in protein concentration. On the sixth day, minimum values of 7.6 and 6.5 pg cell^{-1} were recorded in the f/2 medium and agricultural fertilizer medium,

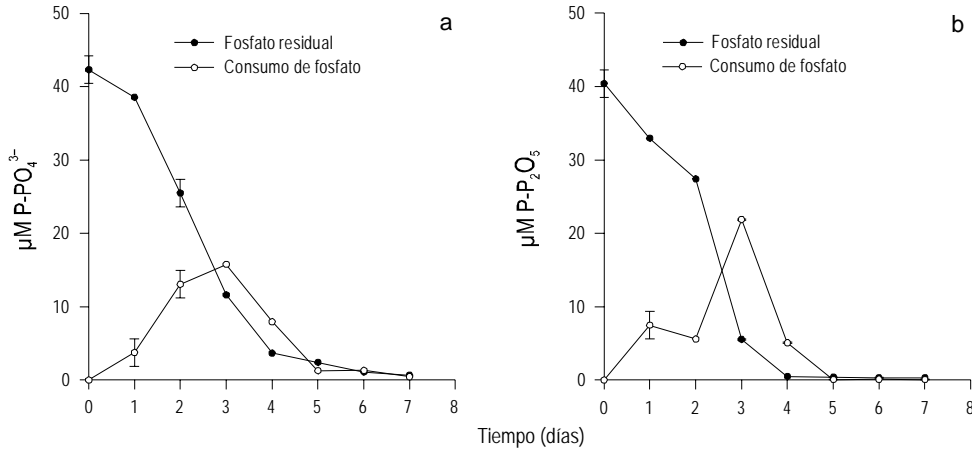


Figura 2. Concentración media de fosfato en el medio, y consumo diario por *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos de 18 L con (a) medio f/2 y (b) fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar ($n = 3$).
Figure 2. Mean concentration of phosphate in the medium and daily uptake by *Rhodomonas* sp. in batch cultures of 18 L using (a) f/2 medium and (b) agricultural fertilizers. The vertical bar indicates standard error ($n = 3$).

consumidos simultáneamente, hasta alcanzar una concentración residual final de 12.7 y 1.1 μM , respectivamente.

En el medio f/2 el consumo total acumulado de nitrato para el séptimo día fue de 927.7 μM (98.9%), mientras que en el medio con fertilizantes agrícolas la población microalgal consumió 1032.9 μM (98.7%) de nitrato de amonio.

Contenido de proteínas

Al inicio del experimento se observaron valores máximos de 19.1 y 16.9 pg célula^{-1} de proteína en el medio f/2 y con fertilizantes, respectivamente. En las primeras 24 h el contenido de proteínas permaneció constante y a partir de este momento su concentración disminuyó (fig. 4a). Después de 48 h y durante los siguientes cuatro días de cultivo no existió una

respectively. Protein content per cell was significantly ($P = 0.04$) higher in the f/2 medium than in the agricultural fertilizer medium.

Carbohydrate content

Carbohydrate content showed a similar tendency in both treatments. During the first 24 h, corresponding to the induction phase, there was a significant increase in carbohydrates (fig. 4b). Carbohydrate content decreased during the exponential growth phase from 38.6 to 10.4 pg cell^{-1} in the f/2 medium and from 34.7 to 9.1 pg cell^{-1} in the agricultural fertilizer medium, increasing again during the slow growth phase in both treatments to values of 28 and 23.3 pg cell^{-1} , respectively. Significant differences ($P = 0.04$) in carbohydrate content were

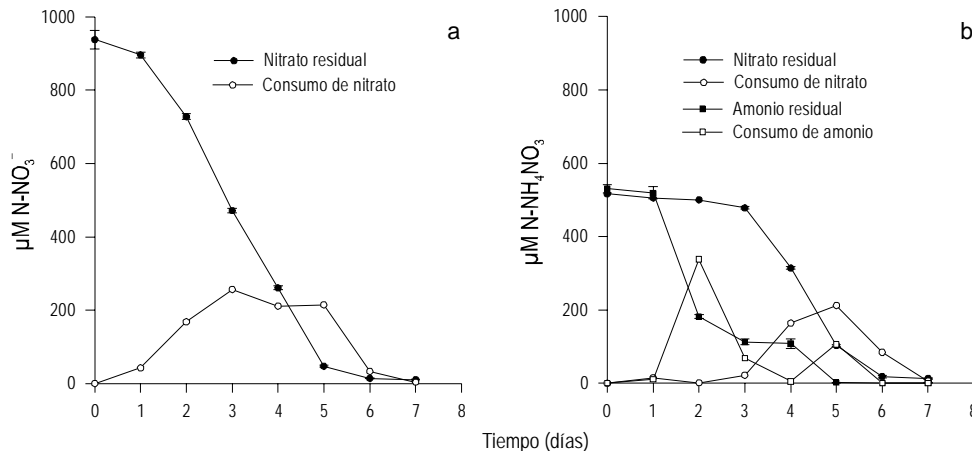


Figura 3. Concentración media de nitrógeno en el medio, y consumo diario por *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos de 18 L con (a) medio f/2 y (b) fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar ($n = 3$).
Figure 3. Mean concentration of nitrogen in the medium and daily uptake by *Rhodomonas* sp. in batch cultures of 18 L using (a) f/2 medium and (b) agricultural fertilizers. The vertical bar indicates standard error ($n = 3$).

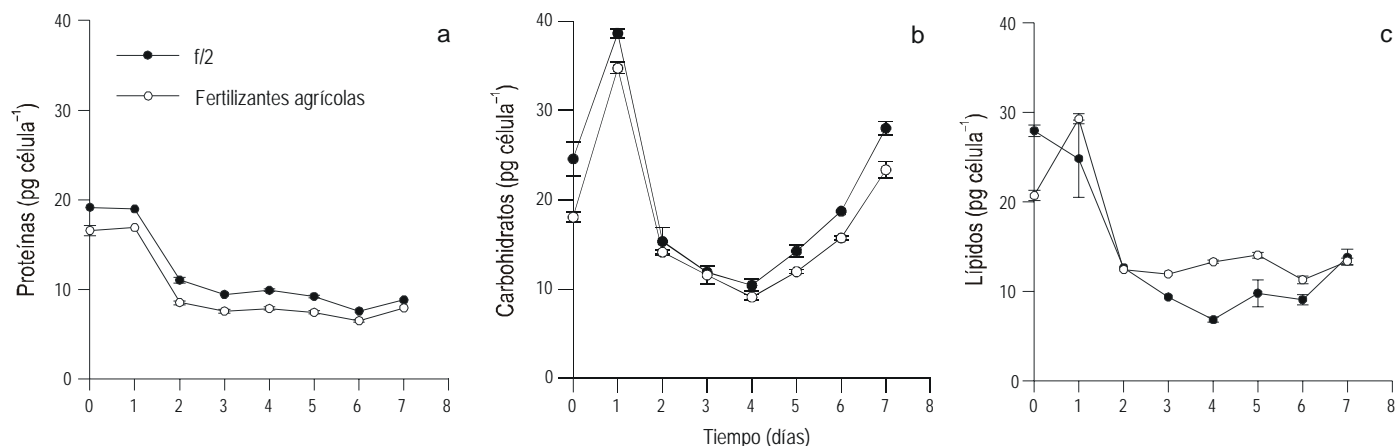


Figura 4. Contenido medio de (a) proteínas, (b) carbohidratos y (c) lípidos por célula en cultivos estáticos de 18 L de *Rhodomonas* sp. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar ($n = 3$).

Figure 4. Mean content of (a) proteins, (b) carbohydrates and (c) lipids per cell in batch 18-L cultures of *Rhodomonas* sp. using f/2 medium and agricultural fertilizers. The vertical bar indicates standard error ($n = 3$).

variación significativa en la concentración de proteína, registrándose valores mínimos de 7.6 y 6.5 pg célula^{-1} para el sexto día de cultivo en el medio f/2 y en el medio con fertilizantes. El contenido de proteínas por célula en el medio f/2 fue significativamente mayor ($P = 0.04$) que el obtenido con fertilizantes agrícolas.

Contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos mostró una tendencia similar entre tratamientos respecto al tiempo de cultivo. Durante las primeras 24 h, que corresponden a la fase de inducción, se observó un incremento significativo de estos constituyentes (fig. 4b). En cambio, durante la fase de crecimiento exponencial, los carbohidratos disminuyeron de 38.6 a 10.4 pg célula^{-1} en el medio f/2 y de 34.7 a 9.1 pg célula^{-1} en el medio con fertilizantes. Sin embargo, durante la fase de crecimiento lento los carbohidratos en ambos tratamientos se incrementaron de nuevo, hasta valores de 28 y 23.3 pg célula^{-1} , respectivamente. Los contenidos de carbohidratos obtenidos en medio f/2 y con fertilizantes agrícolas mostraron diferencias significativas ($P = 0.04$) durante la fase de crecimiento lento (día 4–7), obteniéndose los mejores resultados en medio f/2 (fig. 4b).

Contenido de lípidos

En el cultivo en medio f/2 se observó un alto contenido de lípidos en las células utilizadas como inóculo (27.9 pg célula^{-1} ; fig. 4c). Durante la fase de retardo y el crecimiento exponencial este constituyente había disminuido a 6.8 pg célula^{-1} para el cuarto día. En la fase de crecimiento lento, el contenido de lípidos en células cultivadas con medio f/2 aumentó a 13.7 pg célula^{-1} .

found between both treatments during the slow growth phase (days 4–7), the f/2 medium providing the best results (fig. 4b).

Lipid content

In the f/2 medium, high lipid content was observed in the cells used as inoculum (27.9 pg cell^{-1} ; fig. 4c). During the lag and exponential growth phases, lipid content decreased to 6.8 pg cell^{-1} by day 4; it then increased to 13.7 pg cell^{-1} during the slow growth phase.

In the cultures using agricultural fertilizers (fig. 4c), initial lipid content was 20.6 pg cell^{-1} . The concentration of lipids on the first day of culture was 29.2 pg cell^{-1} . It decreased to 12.4 pg cell^{-1} on the second day and then remained almost constant until reaching a final value of 13.3 pg cell^{-1} . The statistical analysis did not show differences in the lipid content between treatments ($P = 0.12$).

Discussion

Microalgal growth

The growth of *Rhodomonas* sp. obtained in the first two levels of culture (Erlenmeyer and Fernbach) shows that the use of agricultural fertilizers is a viable alternative to maintain strains and obtain inocula for greater production volumes. There were no significant differences in the cell density obtained in both treatments during seven days of culture.

At the 18-L level, the cell density obtained during the exponential growth phase in the agricultural fertilizer medium was significantly higher than in the f/2 medium. This resulted in a higher specific growth rate in the exponential phase, which is related to the rapid ammonium uptake in the treatment using fertilizers (fig. 3b); however, this is a partial effect, because the

En el medio con fertilizantes agrícolas (fig. 4c) el contenido inicial de lípidos fue 20.6 pg célula⁻¹. En el primer día la concentración celular de lípidos fue de 29.2 pg célula⁻¹, disminuyendo posteriormente a 12.4 pg célula⁻¹ en el segundo día de cultivo. A partir de ese momento el contenido de lípidos en las células cultivadas con fertilizantes se mantuvo casi constante, cuyo valor final fue 13.3 pg célula⁻¹. El análisis estadístico no mostró diferencias en el contenido de lípidos entre los tratamientos ($P = 0.12$).

Discusión

Crecimiento microalgal

El crecimiento de *Rhodomonas* sp. obtenido en los dos primeros niveles de cultivo (Erlenmeyer y Fernbach) comprueba que el uso de fertilizantes agrícolas es una alternativa viable para el mantenimiento de cepas y la obtención de inóculos para volúmenes mayores de producción, debido a que la densidad celular obtenida con ambos tratamientos durante siete días de cultivo no presentó diferencias significativas.

En al nivel de 18 L se observó que, durante la fase de crecimiento exponencial, la densidad celular obtenida en medio con fertilizantes agrícolas fue significativamente mayor que con el medio f/2. Esto se tradujo en una tasa de crecimiento específica mayor en fase exponencial, lo cual se relaciona con el rápido consumo de amonio en el cultivo con fertilizantes (fig. 3b). Sin embargo, este efecto es parcial dado que la tasa media de crecimiento y el rendimiento final en biomasa de *Rhodomonas* sp. fue similar entre tratamientos (fig. 1). Este comportamiento en el crecimiento, cuando el nitrógeno está disponible en forma de nitrato de amonio, ha sido observado también en otras especies de microalgas como en *Dunaliella tertiolecta* (Syrett, 1981) y en el clon T-ISO de *Isochrysis* aff. *galbana* (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

Consumo de fosfatos (PO_4^{3-})

El consumo de fosfato por *Rhodomonas* sp. en los primeros cuatro días de cultivo fue similar entre tratamientos. Además, en ese tiempo hubo un consumo superior al 90% del total en los cultivos (fig. 2). Lo anterior indica que esta microalga tiene la capacidad de utilizar indistintamente el fosfato monobásico de sodio (medio f/2) o el pentóxido de fosforo (del fertilizante agrícola) para su crecimiento y reproducción. A partir del cuarto día, cuando el fosfato residual del medio disminuyó a 3.66 μM en el medio f/2 y a 0.45 μM en el medio con fertilizantes, se presentó la fase de crecimiento lento, durante la cual se registraron tasas de crecimiento de 0.16 y 0.11 día⁻¹, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que *Rhodomonas* sp. se encontraba en fase de crecimiento lento y la concentración de fosfato en el medio era baja, la división celular continuó hasta alcanzar su máxima densidad celular al séptimo día (fig. 1). El crecimiento de *Rhodomonas* sp. durante este periodo puede atribuirse a la existencia de fuentes endógenas de fosfato.

mean growth rate and final biomass yield of *Rhodomonas* sp. was similar in both treatments (fig. 1). When nitrogen is available in the form of ammonium nitrate, this growth behaviour has also been observed in other species of microalgae, such as *Dunaliella tertiolecta* (Syrett, 1981) and *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-ISO (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

Phosphate (PO_4^{3-}) uptake

Phosphate uptake by *Rhodomonas* sp. during the first four days of culture was similar between treatments. During this time, uptake was greater than 90% of the total in the cultures (fig. 2). This indicates that this microalga is capable of indifferently using monobasic sodium phosphate (f/2 medium) or phosphorus pentoxide (agricultural fertilizer) for growth and reproduction. By day 4 the residual phosphate had decreased to 3.66 μM in the f/2 medium and to 0.45 μM in the fertilizer medium, and then the slow growth phase began, during which growth rates of 0.16 and 0.11 day⁻¹, respectively, were recorded. Nevertheless, even though *Rhodomonas* sp. was undergoing the slow growth phase and phosphate concentration was low, cell division continued until maximum cell density was obtained on day 7 (fig. 1). Growth of *Rhodomonas* sp. during this period can be attributed to the presence of endogenous sources of phosphate. Darley (1987) and Fogg and Thake (1987) indicate that when the concentration of phosphorus in the culture medium is high, the nutrient is consumed in excess and stored in the cell within cytoplasmic granules in the form of polyphosphates, to be later used by the organism when the concentrations in its environment are limiting.

Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) uptake

During the exponential growth phase, cell density is inversely related to the concentration of nutrients in the medium, and the availability of nitrate per cell therefore decreases with regard to time (fig. 3a). Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) obtained similar results for another species.

In the treatment using agricultural fertilizers, significant nitrate uptake was not observed during the first three days (fig. 3b). Studies on ammonium and nitrate uptake by different microalgae show that when the two sources of nitrogen occur in the same culture medium, ammonium is preferably consumed because of the lower energy expenditure involved in its uptake (Wheeler, 1983; Thompson *et al.*, 1989; Dortch *et al.*, 1991). Evidence also exists that in many microalgae nitrate uptake is limited and even inhibited in the presence of ammonium, because the enzymes required for nitrate reduction are deactivated by the ammonium assimilation process (McCarthy, 1981; Syrett, 1981). The results obtained in this study show that nitrate uptake increases as of day 3, when ammonium concentration in the medium decreases, and then ammonium and nitrate are consumed simultaneously (fig. 3b). Similar results have been obtained by Dortch *et al.* (1991), who indicate that

Darley (1987) y Fogg y Thake (1987) señalan que cuando la concentración de fósforo en el medio de cultivo es alta, existe un consumo en exceso del nutriente, el cual es almacenado en la célula dentro de gránulos citoplasmáticos en forma de polifosfatos y puede ser utilizado posteriormente por el organismo cuando las concentraciones en el medio son limitantes.

Consumo de NO_3^- y NH_4^+

Durante la fase de crecimiento exponencial la densidad celular se relaciona inversamente con la concentración de nutrientes en el medio, lo que ocasiona que la disponibilidad de nitrato por célula disminuya respecto al tiempo (fig. 3a). Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) han obtenido resultados similares para otra especie.

En el cultivo mantenido en medio con fertilizantes agrícolas no se observó un consumo significativo de nitrato durante los primeros tres días (fig. 3b). Estudios sobre el consumo de amonio y nitrato por diferentes microalgas demuestran que cuando estas dos fuentes de nitrógeno están presentes en el mismo medio de cultivo, el amonio es consumido preferentemente debido al menor costo energético que implica su consumo (Wheeler, 1983; Thompson *et al.*, 1989; Dortch *et al.*, 1991). También existe evidencia de que en muchas microalgas el consumo de nitrato es reducido e incluso inhibido en presencia de amonio, debido a que las enzimas requeridas para la reducción del nitrato son desactivadas por el proceso de asimilación del amonio (McCarthy, 1981; Syrett, 1981). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que a partir del tercer día, cuando la concentración de amonio en el medio disminuyó, el consumo de nitrato aumentó. Posteriormente, conforme transcurre el tiempo de cultivo, el amonio y el nitrato son consumidos simultáneamente (fig. 3b). Dortch *et al.* (1991) obtuvieron resultados similares a los de este estudio, e indicaron que a concentraciones menores de $1 \mu\text{M}$ de amonio en el medio se produce la forma activa de la nitrato reductasa y el consumo de nitrato comienza a ser importante.

Al comparar el consumo total de nitrógeno en ambos tratamientos se encontró un mayor consumo en el medio con fertilizantes. Sin embargo, esta diferencia no influyó en la densidad celular final ni en el contenido de proteínas de los cultivos. Debido a lo anterior, la diferencia en el nitrógeno consumido en el medio constituido con fertilizantes podría ser atribuida a la pérdida de amonio al disociarse en función de los cambios de pH en el cultivo (Conn *et al.*, 1996) o a que las células hayan almacenado este nitrógeno en reservorios internos (Dortch *et al.*, 1984), o a ambos.

Composición proximal

Con respecto a la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp., los contenidos de carbohidratos y lípidos fueron más elevados que los de proteínas al inicio del periodo de cultivo con ambos tratamientos. La elevada proporción de productos de reserva se debió a que la población algal usada como inóculo

at lower ammonium concentrations of $1 \mu\text{M}$ in the medium, the active form of nitrate reductase is formed and nitrate uptake becomes important.

The comparison of total nitrogen uptake in both treatments shows that greater consumption occurred when agricultural fertilizers were used; however, this difference did not affect final cell density nor protein content in the cultures. Hence, the difference in nitrogen uptake may be attributed to the loss of ammonium as it dissociates according to pH changes in the culture (Conn *et al.*, 1996) and/or to cells having stored this nitrogen in internal pools (Dortch *et al.*, 1984).

Proximate composition

The biochemical composition of *Rhodomonas* sp. showed higher amounts of carbohydrates and lipids than of proteins at the beginning of the culture period in both treatments. There was a high proportion of reserve products because the algal population used as inoculum came from a culture in declining phase, during which viable cells continue fixing carbon, producing an accumulation of carbohydrates and lipids. Brown *et al.* (1993, 1997) consider these changes related to the harvesting phase and culture conditions. On the first day of culture at the 18-L level, changes in cell density were not observed, probably because the inoculum used (Fernbach) was not in a condition to divide as a result of the culture being in declining phase (fig. 1). Likewise, there were no changes in protein content in both treatments, but carbohydrate content increased and lipid content was higher in the medium using agricultural fertilizers (fig. 4).

In both treatments the exponential growth phase began after 24 h of culture, and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids decreased as a result of cell division in *Rhodomonas* sp. (fig. 4). There were significant differences ($P = 0.04$) in protein content between treatments. The results obtained in this study are comparable to those obtained by Gracida-Valdepeña (1999), Simental-Trinidad *et al.* (2001) and Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), who found no differences in the growth rate and biochemical composition of microalgae cultured in f/2 medium and agricultural fertilizers. Our results confirm the hypothesis that the culture of *Rhodomonas* sp. using agricultural fertilizers produces similar biomass and protein content as when f/2 medium is used. This is based on the nitrogen uptake results that show a similar final residual concentration in both media.

On the other hand, carbohydrates and lipids decreased during the exponential growth phase until the fourth day of culture. In the slow growth phase there was an increase in carbohydrate content, while lipids showed little variation. This occurs because carbohydrates act as intermediary reserve products and the synthesis of lipid reserves is a long-term activated metabolic route. Nevertheless, significant differences ($P = 0.04$) in carbohydrates were found between treatments from the fourth to the seventh day of culture, when the concentration of this component was higher in the cells cultured in f/2

provenía de un cultivo en fase de decaimiento, durante la cual las células viables continúan fijando carbono, produciendo acumulación de carbohidratos y lípidos. Brown *et al.* (1993, 1997) consideran que estos cambios se relacionan con la fase de cosecha y las condiciones de cultivo. En el primer día de cultivo en el nivel de 18 L no se observaron cambios en la densidad celular quizá porque el inóculo usado (Fernbach) no estaba en condiciones para dividirse debido a que el cultivo se encontraba en fase de decaimiento (fig. 1). Tampoco hubo cambios en el contenido de proteínas en ninguno de los tratamientos, pero los contenidos de carbohidratos aumentaron y los de lípidos pidos fueron mayores con los fertilizantes agrícolas (fig. 4).

Después de 24 h de cultivo inició el crecimiento exponencial en ambos medios, y las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos disminuyeron producto de la división celular de *Rhodomonas* sp. (fig. 4). Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.04$) en el contenido de proteínas entre tratamientos. Los resultados de este estudio son comparables con los obtenidos por Gracida-Valdepeña (1999), Simental-Trinidad *et al.* (2001) y Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), quienes no encontraron diferencias entre las tasas de crecimiento y las composiciones bioquímicas de microalgas cultivadas en medio f/2 y en medio con fertilizantes agrícolas. Nuestros resultados confirman la hipótesis de que el cultivo de *Rhodomonas* sp. con fertilizantes agrícolas produce biomasa y contenido de proteínas similares a los obtenidos con medio f/2. Lo anterior se apoya en los resultados de consumo de nitrógeno cuya concentración final residual en el medio f/2 y en el medio con fertilizantes fue similar.

Por otra parte, los carbohidratos y los lípidos disminuyeron durante la fase de crecimiento exponencial hasta el cuarto día de cultivo. En la fase de crecimiento lento se encontró un incremento en el contenido de carbohidratos, mientras que los lípidos presentaron poca variación. Esto se debe a que los carbohidratos actúan como productos intermedios de reserva, mientras que la síntesis de reservas lipídicas es una ruta metabólica que se activa a largo plazo. No obstante, se encontraron diferencias significativas ($P = 0.04$) en el contenido de carbohidratos entre tratamientos del cuarto al séptimo día de cultivo, tiempo en el cual la concentración celular de estos constituyentes fue mayor en las células cultivadas en medio f/2. Además, los resultados indican claramente que la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp. está relacionada con la fase de crecimiento del cultivo o con el medio de cultivo (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). Asimismo, los datos muestran que no existe una relación directa entre el consumo de nutrientes y el contenido de constituyentes bioquímicos, lo cual se atribuye a que la velocidad de incorporación de nutrientes es mayor que la velocidad de síntesis de los componentes bioquímicos. Por lo tanto, el consumo de nitrógeno y fósforo no necesariamente denotan necesidades metabólicas de las microalgas y es por ello que las células tienen reservas internas de nutrientes que son utilizados de acuerdo a sus necesidades fisiológicas. Se

medium. Moreover, the results clearly indicate that the biochemical composition of *Rhodomonas* sp. is related to the growth phase of the culture or the culture medium (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). The data show that nutrient uptake is not directly related to the content of biochemical constituents, probably because nutrient uptake is faster than the synthesis of biochemical components. Hence, nitrogen and phosphorus uptake does not necessarily denote the metabolic needs of microalgae, the cells having internal reserves of nutrients that are used according to their physiological needs. We conclude that the cellular quantity and quality of *Rhodomonas* sp. was similar in both culture media and that, as with other species, agricultural fertilizers can be used to culture this microalga.

English translation by Christine Harris.

concluye que la cantidad y calidad celular de *Rhodomonas* sp. fue similar en ambos medios de cultivo y que, como con otras especies, los fertilizantes agrícolas pueden ser usados para el cultivo de esta microalga.

Referencias

- Aldana-Aranda, D. and Patiño-Suárez, V. (1998). Overview of diets used in larviculture of three Caribbean conchs: Queen conch *Strombus gigas*, milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture*, 167: 163–178.
- Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid and sensitive method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Barrett, S.M. and Le Roi, J.M. (1993). The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyta *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5: 285–296.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315–331.
- Brown, M.R., McCausland, M.A. and Kowalski, K. (1998). The nutritional value of four Australian microalgae strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165: 281–293.
- Conn, E.E., Stumpf, P.K., Bruening, G. and Doi, R.H. (1996). *Bioquímica Fundamental*. Ed. Limusa, México, D.F., 736 pp.
- Darley, W.M. (1987). *Biología de las algas: Enfoque fisiológico*. Ed. Limusa, México, D.F., 236 pp.
- Dortch, Q., Clayton, J.R., Thoresen, S.S. and Ahmed, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.*, 81: 237–250.
- Dortch, Q., Thompson, P.A. and Harrison, P.J. (1991). Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*: Effect of preconditioning, nitrogen source and growth rate. *Mar. Biol.*, 110: 183–193.
- Ferreiro, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., Planas, M. and Fernández-Reiriz, M.J. (1990). Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Mar. Biol.*, 106: 395–401.

- Fogg, G.E. and Thake, B. (1987). Algal cultures and phytoplankton ecology. Univ. Wisconsin Press, 259 pp.
- Gracida-Valdepeña, M.L. (1999). Producción de tres especies de diatomeas utilizando una mezcla de fertilizantes agrícolas. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México, 108 pp.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. (1983). Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, 419 pp.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates. In: J.R. Stein (ed.), Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 289–313.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 29–60.
- Jónasdóttir, S.H. (1994). Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: Laboratory observations. Mar. Biol., 121: 67–81.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust and J.S. Craigie (eds.), Handbook of Physiological and Biochemical Methods, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 96–97.
- López-Elías, J. y Voltolina, D. (1993). Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. Cienc. Mar., 19(2): 169–180.
- López-Ruiz, J.L., García-García, R. and Ferreiro-Almeda, M.S. (1995). Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product Zestec-56 and a commercial fertilizer as a nutrient. Aquacult. Eng., 14(4): 367–372.
- Lourenco, S.O., Barbarno, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K.P. and Aida, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. Phycologia, 41(2): 158–162.
- McCarthy, J.J. (1981). The kinetics of nutrient utilization. In: T. Platt (ed.), Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 211–233.
- McCausland, M.A., Brown, M.R., Barrett, S.M., Diemar, J.A. and Heasman, M.P. (1999). Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 174: 323–342.
- Nieves, M., Voltolina, D., Sapién, M.T., Gerhardus, H., Robles, A.I. and Villa, M.A. (1996). Coltivazione di microalghe con fertilizzanti agricoli. Riv. Ital. Acquacolt., 31: 81–84.
- Nieves, M., Voltolina, D. and Barrera, A. (1998). Un nuovo parametro per paragonare la crescita delle microalghe. Riv. Ital. Acquacolt., 33: 177–184.
- Nieves, M., Voltolina, D., López-Ruiz, J., Cisneros, M.A. y Piña, P. (2000). Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. Hidrobiológica, 10(1): 1–6.
- Pande, S.V., Parvin, R. and Venkatasubramanian, T. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Anal. Biochem., 6: 415–425.
- Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. (1985). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. 1st ed. Pergamon Press, 173 pp.
- Pruder, G.D. and Bolton, E.T. (1978). System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. Ninth Annual Meeting World Mariculture Society, pp. 747–759.
- Raush, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. Hidrobiología, 78: 237–251.
- Rogers-Bennett, L., Fastenau, H.C., Hibbard-Robbins, T., Cain, Z. and Dewees, C.M. (1994). Culturing red sea urchin of experimental outplanting in Northern California. Final Report of Bodega Marine Laboratory, Santa Cruz University, USA.
- Simental-Trinidad, J.A. and Sánchez-Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. Aquacult. Eng., 27: 265–272.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. and Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. J. Shellfish Res., 20(2): 611–617.
- Støttrup, J.G. and McEvoy, L.A. (2003). Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Science, 336 pp.
- Syrett, P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. In: T. Platt (ed.), Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 182–204.
- Thompson, P.A., Levasseur, E.L. and Harrison, P.J. (1989). Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? Limnol. Oceanogr., 34(6): 1014–1024.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. and Núñez-Cabrero, F. (1999). Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult. Eng., 20: 135–147.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. and Núñez-Cabrero, F. (2002). Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult. Eng., 25: 207–216.
- Wheeler, P.A. (1983). Phytoplankton nitrogen metabolism. In: E.J. Carpenter and D.G. Capone (eds.), Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, New York, pp. 309–346.