

**PRODUCCION MASIVA DE *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH.  
(PRASINOPHYCEAE), BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES  
DE NUTRIENTES Y ADICIONES DE DIOXIDO DE CARBONO**

**MASS PRODUCTION OF *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH.  
(PRASINOPHYCEAE), UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS  
OF NUTRIENTS AND ADDITIONS OF CARBON DIOXIDE**

Isaí Pacheco Ruíz  
Enrique Valenzuela Espinoza  
Luis Ernesto Aguilar Rosas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas  
Universidad Autónoma de Baja California  
Apartado Postal 453  
Ensenada, Baja California, México

*Ciencias Marinas* (1991), Vol. 17, No. 1, pp. 1-12.

**RESUMEN**

En condiciones de laboratorio se efectuó una serie de cuatro experimentos con *Tetraselmis suecica*, para conocer el rendimiento de producción en volúmenes de 1,000 litros, con salinidad de 28‰, con ausencia y adición de amortiguador y dióxido de carbono, flujo de aire de 25 l/min y tiempo promedio de adición de dióxido de carbono de dos minutos y medio, a 50 kg/cm<sup>2</sup> de presión para mantener el pH igual o menor de 7.5.

La máxima densidad de 508,000 cel/ml se obtuvo con la relación de 150/10 g/l de NaNO<sub>3</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, con una constante de crecimiento promedio de 0.35 y 0.50 duplicaciones por día. Con un cuarto y la mitad de nutrientes sin amortiguador, se registró una constante de crecimiento promedio mayor, aunque no difirió significativamente al 95% de confianza con respecto al experimento control.

La productividad por unidad de volumen de cultivo de *T. suecica* mostró que al utilizar bajas concentraciones de nutrientes más dióxido de carbono, se obtienen buenos rendimientos poblacionales respecto al control. La productividad no fue afectada por temperatura ya que se mantuvo constante 19 ± 1°C, pero decrece si el suplemento de dióxido de carbono es insuficiente para mantener el pH entre 7.2-7.5.

**ABSTRACT**

A series of four experiments with *Tetraselmis suecica* was carried out under laboratory conditions in order to learn the production yield in volumes of 1,000 litres, with salinity of 28‰, with absence and addition of buffer and carbon dioxide, air flow of 25 l/min and average time of addition of carbon dioxide of two and a half minutes, at a pressure of 50 kg/cm<sup>2</sup> to keep the pH equal to or below 7.5.

A maximum density of 508,000 cells/ml was obtained with a ratio of 150/10 g/l of NaNO<sub>3</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, with an average constant of growth of 0.35 and 0.50 doublings per day. With a quarter and with half of the nutrients without buffer, a higher constant of growth was recorded, although it did not differ significantly at 95% confidence in relation to the control experiment.

Productivity per unit of culture volume of *T. suecica* showed that on using low concentrations of nutrients plus carbon dioxide, good population yields relative to the control are

obtained. Productivity was not affected by temperature since it was kept constant at  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , but it decreases when the supplement of carbon dioxide is insufficient to keep the pH between 7.2-7.5.

## INTRODUCCION

En el cultivo masivo de microalgas, la infraestructura requerida no representa en realidad un problema, sino más bien los problemas son de tipo biológico, en donde es indispensable determinar las condiciones necesarias para obtener los niveles máximos de densidad poblacional, razón de crecimiento, producción y máxima eficiencia en la utilización de luz y nutrientes (Kinne, 1976).

La microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch., es una especie ampliamente usada en acuicultura, es de gran valor alimenticio para larvas, semilla y adultos de bivalvos (Walne, 1970; Helm *et al.*, 1973; Helm, 1977), y también para crustáceos (Griffith *et al.*, 1973). Esta especie responde a un amplio intervalo de concentración de nutrientes y salinidad (Laing y Utting, 1980). Su cultivo se ha dado a través de los métodos tradicionales usados para otras especies de microalgas (Mathiesen y Torner, 1966), y ésta puede ser la razón de no haber obtenido valores óptimos de producción, lo que a su vez repercute en los costos de operación en la producción de alimento artificial.

En las microalgas, el proceso de la fotosíntesis se ve favorecido por concentraciones adecuadas de  $\text{CO}_2$ , siendo ésta inhibida por las altas concentraciones de  $\text{O}_2$  y da inicio a la fotorespiración, lo cual afecta la producción de microalgas (Tolbert, 1974). Basados en este proceso donde el  $\text{CO}_2$  es el factor limitante, cabe la posibilidad de mejorar las densidades de *T. suecica* obtenidas por métodos tradicionales, mediante la variación de las concentraciones de nutrientes y la adición directa de dióxido de carbono en los sistemas de cultivos masivos.

## MATERIALES Y METODOS

*Tetraselmis suecica* se mantuvo en crecimiento unialgal con el medio de Mathiesen y Torner (1966). El filtrado del agua de mar y dulce se realizó como lo mencionan Islas-Olivares *et al.* (1978). La salinidad del agua de mar se mantuvo constante para todos los experimentos (28‰).

## INTRODUCTION

The infrastructure required for the mass culture of microalgae does not really represent a problem. The problems are rather of the biological type, since the necessary conditions for obtaining the maximum levels of population density, growth rate, production and maximum efficiency in the use of light and nutrients must be determined (Kinne, 1976).

The marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. is widely used in aquaculture. It is of great nutritional value for larvae, seeds and adults of bivalves (Walne, 1970; Helm *et al.*, 1973; Helm, 1977), as well as for crustaceans (Griffith *et al.*, 1973). This species responds to a wide range of nutrient and salinity concentrations (Laing and Utting, 1980). It has been cultured with traditional methods used for other species of microalgae (Mathiesen and Torner, 1966) and optimum production values have probably not been obtained for this reason, affecting in turn the operation costs of the production of artificial food.

In microalgae, photosynthesis is favoured by adequate concentrations of  $\text{CO}_2$ , which is inhibited by high concentrations of  $\text{O}_2$  and begins photorespiration, which affects the production of microalgae (Tolbert, 1974). Since  $\text{CO}_2$  is the limiting factor in this process, the densities of *T. suecica* obtained by traditional methods could be increased by varying the concentrations of nutrients and by adding carbon dioxide to the mass culture systems.

## MATERIALS AND METHODS

*Tetraselmis suecica* was kept in unialgal growth with Mathiesen and Torner's (1966) medium. Sea and fresh water were filtered according to Islas *et al.* (1978). The salinity of the sea water was kept constant for all the experiments (28‰).

All the stages of the culture sequence were carried out at  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ . The temperature was controlled by a (Honeywell) air conditioning system with thermostat.

La secuencia del cultivo en todas sus etapas se llevó a cabo en un cuarto a temperatura de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , controlada mediante un aparato de aire acondicionado provisto de termostato (Honeywell).

El cultivo se inició en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de medio de cultivo de 50 ml y se continuó en Fernbach con capacidad de 2,800 ml, con volumen de cultivo de 1,500 ml.

El medio de cultivo se preparó con agua de mar a 28‰, soluciones de nutrientes y metales traza, más amortiguador (Tris) (Mathiesen y Torner, 1966). Estos medios se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  y  $15 \text{ lb/pulg}^2$  de presión durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron las vitaminas.

Cada matraz se inoculó con 10 ml de cepa de *T. suecica*, para posteriormente inocular los Fernbach con el contenido de dos matraces Erlenmeyer bajo una atmósfera aséptica generada con dos mecheros Bunsen. Los matraces fueron expuestos a condiciones de iluminación constante ( $4.23 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con el uso de lámparas fluorescentes de luz fría (Silvania de 40 W).

A los 10 días se realizó la transferencia del cultivo logrado a recipientes de 20 litros (carboy); previamente se desinfectaron mediante el método descrito por Pruder y Bolton (1978). Después, se agregaron nutrientes y vitaminas esterilizadas, inoculando cada carboy con dos Fernbach en atmósfera aséptica. A partir de esta etapa, se suministró a los cultivos un flujo de aire de 7.5 l/min (flujo métr Gilmont), mediante un compresor de aire seco (Conde 12), con el fin de mantener las microalgas en suspensión y proporcionarles el dióxido de carbono necesario para la fotosíntesis.

Al obtener la máxima concentración de microalgas en carboy (10-12 días), se transfirió el cultivo a tanques de fibra de vidrio de 1,200 litros. En este nivel se dio iluminación con lámparas Osram de 500 W. La luz incidente ( $I_0$ ) en la superficie fue de  $1,330 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Biospherical Instrument Inc. Mod. QSL-100); se suministró un flujo de aire de 25 l/min.

En los tanques antes mencionados, se experimentó con diferentes concentraciones de nutrientes y adiciones diarias de dióxido de carbono, hasta obtener un pH entre 7.2-7.5. El tiempo promedio de inyección de

The culture was initiated in 250 ml Erlenmeyer flasks with a culture medium volume of 50 ml. It was continued in Fernbach with capacity of 2,800 ml and culture volume of 1,500 ml.

The culture medium was prepared with sea water at 28‰, solutions of nutrients and trace metals, and buffered with Tris (Mathiesen and Torner, 1966). These media were sterilized by autoclaving at  $120^\circ\text{C}$  and pressure of  $15 \text{ lb/in}^2$  for 15 minutes. The vitamins were subsequently added.

Each flask was inoculated with 10 ml of *T. suecica* stock. The Fernbach were later inoculated with the contents of two Erlenmeyer flasks in an aseptic environment generated with two Bunsen burners. The flasks were exposed to continuous illumination ( $4.23 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) provided by cool-white fluorescent lamps (Silvania of 40 W).

After ten days, the cultures were transferred to 20 litre recipients (carboy), which had previously been disinfected using the method described by Pruder and Bolton (1978). Later, sterilized vitamins and nutrients were added, inoculating each carboy with two Fernbach in aseptic environment. As of this stage, the cultures were supplied with an air flow of 7.5 l/min (Gilmont flowmeter), by means of a dry air compressor (Conde 12), in order to maintain the microalgae in suspension and provide them with the carbon dioxide necessary for photosynthesis.

On obtaining the maximum concentration of microalgae in carboy (10-12 days), the cultures were transferred to 1,200 litre fibreglass tanks. During this stage, illumination was provided by 500 W Osram lamps. The incident light ( $I_0$ ) on the surface was  $1,330 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Biospherical Instrument Inc. Mod. QSL-100). An air flow of 25 l/min was supplied.

In the tanks, experiments were carried out with different nutrient concentrations and daily additions of carbon dioxide, until a pH between 7.2-7.5 was obtained. The average injection time of  $\text{CO}_2$  was 2:30 minutes at a pressure of  $50 \text{ kg/cm}^2$ .

All the experiments were compared with the control, in which Mathiesen and Torner's (1966) medium, additions of carbon dioxide and buffer were used.

The experimental media of mass level (1,000 litres) were done in duplicate under the

CO<sub>2</sub> fue de 2:30 minutos a una presión de 50 kg/cm<sup>2</sup>.

Todos los experimentos se compararon con el control, en el que se utilizó el medio de Mathiesen y Torner (1966), adiciones de dióxido de carbono, más amortiguador.

Los medios experimentales de nivel masivo (1,000 litros) se realizaron por duplicado, bajo las siguientes características: la primera concentración utilizada fue agregando la mitad de macronutrientes, mitad metales traza, mitad vitaminas y la mitad de amortiguador; la siguiente con la mitad de macronutrientes, mitad metales traza, mitad vitaminas, adiciones directas de dióxido de carbono y sin amortiguador; y la última con un cuarto de macronutrientes, un cuarto de metales traza, un cuarto de vitaminas más dióxido de carbono y sin amortiguador.

La reproducción de células se estimó diariamente para todos los niveles en los cultivos con un espectrofotómetro Hatch (Modelo DR/2), a una longitud de onda óptima de 680 nm. El tiempo que transcurrió en cada uno de los niveles fue de siete días, tiempo en el cual los cultivos alcanzan las óptimas condiciones de crecimiento (Acuacop, 1983).

## RESULTADOS

Se experimentó el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en volúmenes de 1,000 litros. Los cultivos con la mitad de nutrientes registraron un pH inicial de 7.9 y final de 9.3. A los cultivos que se les suministró dióxido de carbono, se encontró que a pH entre 8.2-8.7 el tiempo de adición fue de 2:30 minutos a una presión de 50 kg/cm<sup>2</sup> para situar el pH en 7.2-7.5.

La prueba "t" de Student aplicada a las densidades poblacionales, no fue significativa ( $P < 0.05$ ) entre el original y la réplica, ni entre experimentos. Debido a que los cultivos no iniciaron con la misma concentración, se realizó un análisis de correlación polinomial para conocer si el factor densidad influyó en la concentración final de cada cultivo. La prueba polinomial ( $P < 0.05$ ) mostró que no existe correlación entre la concentración inicial y final de los cultivos.

La curva de crecimiento que resultó en el experimento con la mitad de nutrientes y sin adición de dióxido de carbono se muestra en la Figura 1. La densidad inicial fue de 6,500 cel/ml, con fase de retardo de un día. Se

following conditions: the first concentration used contained a half of macronutrients, half trace metals, half vitamins and a half of buffer; the next contained a half of macronutrients, half trace metals, half vitamins, direct additions of carbon dioxide and no buffer; and the last contained a quarter of macronutrients, a quarter of trace metals, a quarter of vitamins, plus carbon dioxide and no buffer.

Cell production was estimated daily for all the levels in the culture with a Hatch spectrophotometer (model DR/2), at an optimum wavelength of 680 nm. The time that lapsed in each of the levels was seven days, time in which the cultures reach optimum growth conditions (Acuacop, 1983).

## RESULTS

The growth of *Tetraselmis suecica* was tested in volumes of 1,000 litres. An initial pH of 7.9 and final pH of 9.3 were recorded for the cultures with half of nutrients. In the cultures that were supplied with carbon dioxide, it was found that at a pH between 8.2-8.7 the addition time was 2:30 minutes at a pressure of 50 kg/cm<sup>2</sup> to obtain a pH between 7.2-7.5.

The Student "t" test applied to the population densities was not significant ( $P < 0.05$ ), either between the original and replica or between experiments. Since the cultures did not begin with the same concentration, a polynomial correlation analysis was done to find out whether or not the density factor influenced the final concentration of each culture. The polynomial test ( $P < 0.05$ ) indicated that there was no correlation between the initial and final concentrations of the cultures.

The growth curve obtained in the experiment with half of nutrients and without addition of carbon dioxide is shown in Figure 1. The initial density was 6,500 cells/ml, with a delayed phase of one day. A concentration of 327,000 cells/ml was obtained on the seventh day. The population values are given in Table 1. The exponential growth phase occurred on days 1-2, with a growth constant of 2.29 and duplication time of 0.30 days. Maximum daily production (PD) was reached on the third day.

The growth curve obtained in the experiment with half of nutrients and additions of carbon dioxide is shown in Figure 2. The

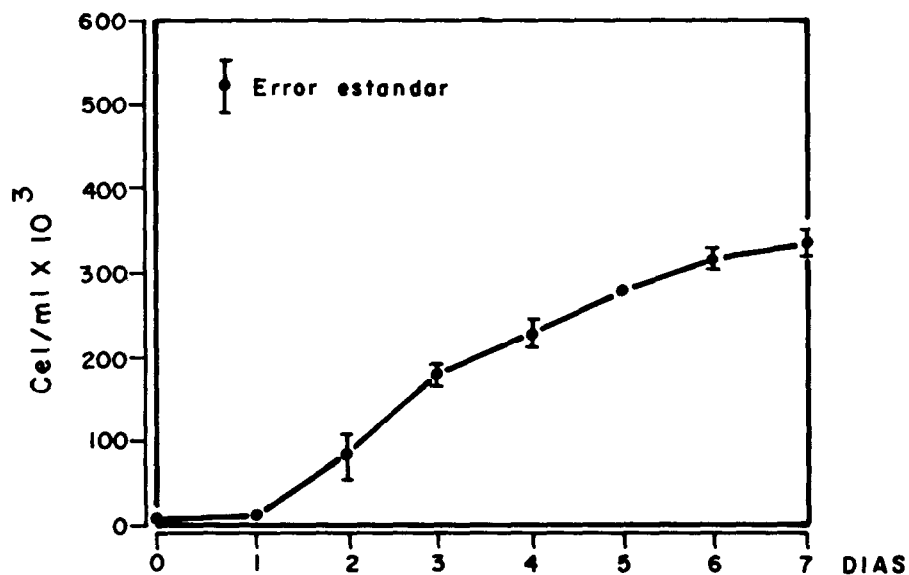


Figura 1. Crecimiento de *Tetraselmis suecica*, cultivada en medio químico con la mitad de macronutrientes, mitad de metales traza, mitad de vitaminas y la mitad de amortiguador.

Figure 1. Growth of *Tetraselmis suecica*, cultured in a chemical medium with a half of macronutrients, half of trace metals, half of vitamins and a half of buffer.

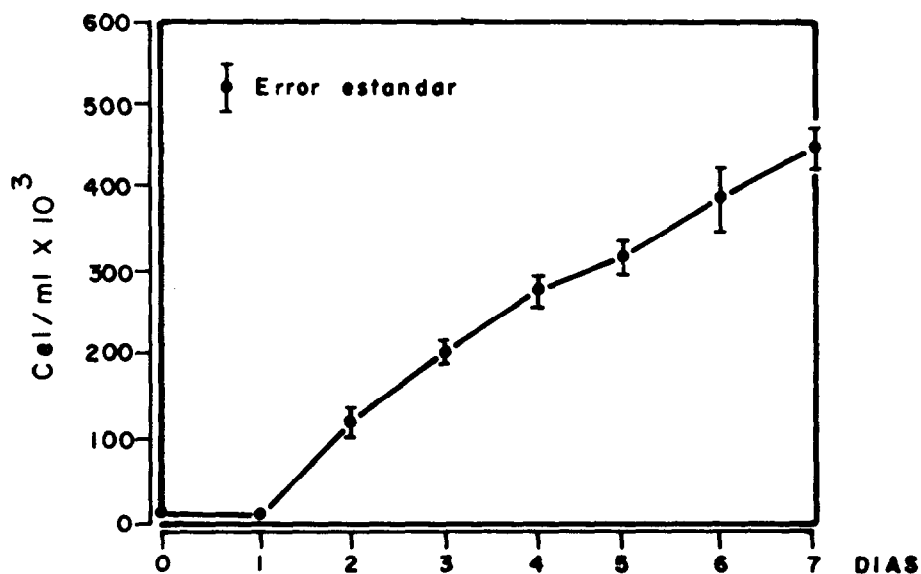


Figura 2. Crecimiento de *Tetraselmis suecica*, cultivada en medio químico con la mitad de macronutrientes, mitad de metales traza, mitad de vitaminas, adiciones directas de dióxido de carbono y sin amortiguador.

Figure 2. Growth of *Tetraselmis suecica*, cultured in a chemical medium with a half of macronutrients, half of trace metals, half of vitamins, direct additions of carbon dioxide and with no buffer.

alcanzó una concentración de 327,000 cel/ml al séptimo día. Los valores poblacionales se presentan en la Tabla 1. La fase de crecimiento exponencial ocurrió en los días 1-2, con una constante de crecimiento de 2.29 y tiempo de duplicación de 0.30 días. La máxima producción diaria (PD) se alcanzó al tercer día.

Al utilizar la mitad de nutrientes y adiciones de dióxido de carbono resultó una curva de crecimiento que se muestra en la Figura 2, donde la densidad inicial fue de 5,500 cel/ml, con fase de retardo de un día alcanzando una concentración de 450,750 cel/ml al séptimo día. Los valores poblacionales se presentan en la Tabla 2. La fase de crecimiento exponencial se produjo en los días 1-2, con una constante de crecimiento de 2.73 y tiempo de duplicación de 0.25 días. La máxima producción diaria (PD) se presentó al segundo día.

La curva de crecimiento que resultó en el experimento con un cuarto de nutrientes y adiciones de dióxido de carbono se muestra en la Figura 3; la densidad inicial fue de 5,000 cel/ml y presentó fase de retardo de un día. La densidad máxima en el cultivo fue de 431,500 cel/ml. Los valores poblacionales se presentaron en la Tabla 3. La fase de crecimiento exponencial se produjo en los días 1-3 con un valor de crecimiento de 0.65, un tiempo de duplicación de 1.06 días y máxima producción diaria al segundo día.

En el experimento control, no se observó fase de retardo, la densidad inicial fue de 41,000 cel/ml y la densidad máxima en el cultivo fue de 508,500 cel/ml (Fig. 4). Los valores poblacionales se indican en la Tabla 4. En este ensayo la fase de crecimiento exponencial ocurrió en el tercer día, con una constante de crecimiento de 0.88 y tiempo de duplicación de 0.80 días. Presentó su máxima producción al tercer día.

## DISCUSSION

Las concentraciones alcanzadas de 327,000 a 508,500 cel/ml con una intensidad luminosa de  $1,330 \mu E m^{-2} s^{-1}$  (Tablas 1, 4), fueron mayores a las reportadas por Griffith *et al.* (1973), con 275,000 a 450,000 cel/ml en volúmenes de 340 litros, con intensidad de luz de  $645 \mu E m^{-2} s^{-1}$ . Estas diferencias se atribuyen al efecto de la baja irradiancia en los cultivos de *T. suecica* (Maddux y Jones, 1964).

initial density was 5,500 cells/ml, with a delayed phase of one day, reaching a concentration of 450,750 cells/ml on the seventh day. The population values are given in Table 2. The exponential growth phase occurred on days 1-2, with a growth constant of 2.73 and duplication time of 0.25 days. Maximum daily production (PD) occurred on the second day.

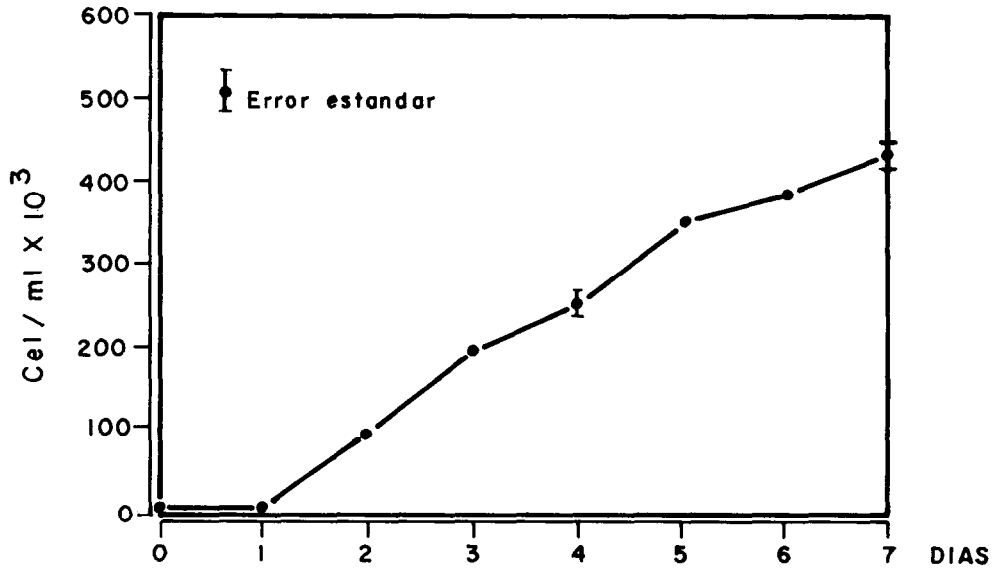
The growth curve obtained in the experiment with a quarter of nutrients and additions of carbon dioxide is shown in Figure 3. The initial density was 5,000 cells/ml and there was a delayed phase of one day. Maximum density in the culture was 431,500 cells/ml. The population values are given in Table 3. The exponential growth phase occurred on days 1-3 with a growth value of 0.65, a duplication time of 1.06 days and maximum daily production on the second day.

In the control experiment, a delayed phase was not observed. The initial density was 41,000 cells/ml and maximum density in the culture was 508,500 cells/ml (Fig. 4). The population values are given in Table 4. In this test, the exponential growth phase occurred on the third day, with a constant of growth of 0.88 and duplication time of 0.80 days. Maximum production occurred on the third day.

## DISCUSSION

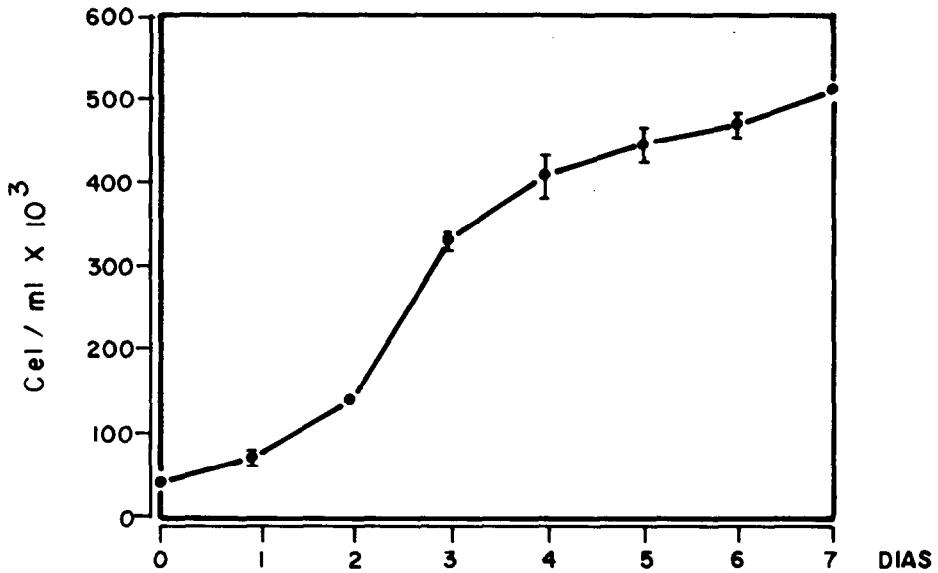
The concentrations of 327,000 to 508,500 cells/ml reached with a luminous intensity of  $1,330 \mu E m^{-2} s^{-1}$  (Tables 1, 4) were higher than those reported by Griffith *et al.* (1973), namely 275,000 to 450,000 cells/ml in volumes of 340 litres, with light intensity of  $645 \mu E m^{-2} s^{-1}$ . These differences are attributed to the effect of low irradiance on the cultures of *T. suecica* (Maddux and Jones, 1964).

Even though the Student "t" test did not indicate significant differences between the experiments, the population densities increased when carbon dioxide was added. The final concentrations (Tables 1-4) show that the cultures that were supplied daily with carbon dioxide had higher concentrations of cells, regardless of whether the concentration of nutrients was reduced to a quarter in the culture medium (Fig. 3; Table 3). This has also been observed by Fabregas *et al.* (1984), who show that carbon dioxide is a limiting factor and that an increase in the concentration of nutrients does not produce an increase



**Figura 3.** Crecimiento de *Tetraselmis suecica*, cultivada en medio químico con un cuarto de macronutrientes, un cuarto de metales traza, un cuarto de vitaminas, adiciones directas de dióxido de carbono y sin amortiguador.

**Figure 3.** Growth of *Tetraselmis suecica*, cultured in a chemical medium with a quarter of macronutrients, a quarter of trace metals, a quarter of vitamins, direct additions of carbon dioxide and with no buffer.



**Figura 4.** Crecimiento de *Tetraselmis suecica*, cultivada en medio químico con todos los nutrientes, con amortiguador y adiciones directas de dióxido de carbono (experimento control).

**Figure 4.** Growth of *Tetraselmis suecica*, cultured in a chemical medium with all the nutrients, with buffer and direct additions of carbon dioxide (control experiment).

**Tabla 1.** Valores poblacionales promedio de *Tetraselmis suecica*, utilizando la mitad de macronutrientes, mitad de metales traza, mitad de vitaminas y la mitad de amortiguador.

**Table 1.** Average population values of *Tetraselmis suecica*, using a half of macronutrients, half of trace metals, half of vitamins and a half of buffer.

Tiempo (días)	Concentración (cel/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cel/ml)
0	6,500				
1	8,000	0.20	3.33	0.29	1,500
2	79,500	2.29	0.30	3.03	71,500
3	178,500	0.80	0.86	1.15	99,000
4	225,250	0.23	2.98	0.33	46,750
5	272,000	0.18	3.68	0.25	46,750
6	313,250	0.14	4.91	0.20	41,250
7	327,000	0.04	16.14	0.05	13,750
		$\bar{\kappa} = 0.55$	$\bar{\tau D} = 4.6$	$\bar{D} = 0.80$	

**Tabla 2.** Valores poblacionales promedio de *Tetraselmis suecica*, utilizando la mitad de macronutrientes, mitad de metales traza, mitad de vitaminas, adiciones directas de dióxido de carbono y sin amortiguador.

**Table 2.** Average population values of *Tetraselmis suecica*, using a half of macronutrients, half of trace metals, half of vitamins, direct additions of carbon dioxide and no buffer.

Tiempo (días)	Concentración (cel/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cel/ml)
0	5,000				
1	8,000	0.47	1.47	0.68	3,000
2	123,500	2.73	0.25	3.93	115,500
3	206,000	0.51	1.35	0.74	82,500
4	274,750	0.28	2.41	0.40	68,750
5	316,000	0.13	4.96	0.19	41,250
6	387,500	0.20	3.40	0.29	71,500
7	450,750	0.15	4.58	0.22	63,250
		$\bar{\kappa} = 0.63$	$\bar{\tau D} = 2.63$	$\bar{D} = 0.92$	



A pesar de que la prueba "t" de Student no indicó diferencias significativas entre los distintos experimentos, las densidades poblacionales se incrementaron cuando se les adicionó dióxido de carbono. Las concentraciones finales (Tablas 1, 4), muestran que los cultivos que tuvieron un suministro diario de dióxido de carbono registraron mayores concentraciones de células, independientemente de que se reduzca la concentración de nutrientes hasta un cuarto en el medio de cultivo (Fig. 3; Tabla 3). Lo anterior también ha sido observado por Fabregas *et al.* (1984), quienes muestran que el dióxido de carbono es un factor limitante y que un incremento en la concentración de nutrientes, no produce un incremento en la biomasa final. Por otro lado, al adicionar dióxido de carbono, éste equilibra el sistema "tampón" del bicarbonato, que controla de manera más estable las variaciones del pH en el cultivo y permite, además, un mejor aprovechamiento de nutrientes, dando como resultado una mejor respuesta en el incremento de la densidad poblacional (Fabregas *et al.*, 1985).

En todos los medios experimentales se obtuvo un desarrollo adecuado de *T. suecica*, por lo que cualquiera de éstos puede ser utilizado para el cultivo de esta especie, dependiendo sólo de los requerimientos de producción.

Cuando no se adicionó dióxido de carbono (Fig. 1; Tabla 1), se obtuvo baja concentración de células y baja tasa de división por día. Esto se debió a que las condiciones del cultivo generaron una fuerte alcalinidad (9.3), lo cual posiblemente provocó la precipitación de metales traza, como el hierro y manganeso, los que son esenciales para la síntesis del protoplasma celular, por ser los constituyentes de varias enzimas y transportadores que operan en el mecanismo de la respiración celular.

El experimento control presentó concentraciones más elevadas. Sin embargo, su constante de crecimiento y división por día resultaron ser más bajas en comparación con los experimentos donde se adicionó dióxido de carbono con la mitad y un cuarto de los nutrientes (Tablas 1, 2), los cuales registraron idénticas constantes de crecimiento, división por día promedio y rendimientos similares en producción (88.64% y 84.85% respectivamente). Estos parámetros poblacionales nos indican que los cultivos estuvieron en óptimas

en la final biomasa. On the other hand, when carbon dioxide is added, it balances the "tampon" system of the bicarbonate that controls in a more stable way the pH variations in the culture and also enables a better use of the nutrients. This results in a better response to the increase of the population density (Fabregas *et al.*, 1985).

An adequate development of *T. suecica* was obtained for all the experimental media. Therefore, any of them can be used for the culture of this species, depending only on the production requirements.

When carbon dioxide was not added (Fig. 1; Table 1), a low concentration of cells and low rate of division per day were obtained. This is because the conditions of the culture produced a strong alkalinity (9.3), which probably provoked the precipitation of trace metals, such as iron and manganese. These are essential for the synthesis of the cellular protoplasm since they are constituents of several enzymes and transporters that operate in the mechanism of cellular respiration.

The control experiment presented higher concentrations. However, the constant of growth and division per day were lower in comparison to the experiments where carbon dioxide was added with half and a quarter of the nutrients (Tables 1, 2), which registered identical constants of growth, average division per day and similar production yields (88.64% and 84.85%, respectively). These population parameters indicate that the cultures were in optimum ecological conditions, since the requirements of nutritive salts for the seventh day did not present significant effects on the rate of growth. According to Droop's (1975) concept, the growth rate decreases when the concentration of nutrients is low for the metabolic needs of the algal population, entering a stationary phase of the growth cycle. In the present study this did not occur since the culture time was relatively short (seven days) and thus, the concentration of nutrients was not limiting for the development of the microalgae.

The use of carbon dioxide in Mathiesen and Torner's (1966) method for the large-scale production of *T. suecica* is an alternative for reducing production costs. The traditional method used (control) represents a cost in nutrients of 7.12 dollars for each 1,000 litres of production. However, when half of the nutri-

**Tabla 3.** Valores poblacionales promedio de *Tetraselmis suecica*, utilizando un cuarto de macronutrientes, un cuarto de metales traza, un cuarto de vitaminas, adiciones directas de dióxido de carbono y sin amortiguador.

**Table 3.** Average population values of *Tetraselmis suecica*, using a quarter of macronutrients, a quarter of trace metals, a quarter of vitamins, direct additions of carbon dioxide and no buffer.

Tiempo (días)	Concentración (cel/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cel/ml)
0	5,000				
1	6,750	0.30	2.31	0.43	1,750
2	101,500	2.71	0.25	4.00	94,750
3	195,000	0.65	1.06	0.94	93,500
4	255,500	0.27	2.56	0.39	60,500
5	346,250	0.30	2.28	0.43	90,750
6	384,750	0.10	6.57	0.14	38,500
7	431,500	0.11	6.04	0.16	46,750
		$k = 0.63$	$TD = 3.01$	$D = 0.92$	

**Tabla 4.** Valores poblacionales promedio de *Tetraselmis suecica*, utilizando todos los nutrientes, con amortiguador y adiciones directas de dióxido de carbono (experimento control).

**Table 4.** Average population values of *Tetraselmis suecica*, using all the nutrients, with buffer and direct additions of carbon dioxide (control experiment).

Tiempo (días)	Concentración (cel/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cel/ml)
0	41,000				
1	71,250	0.55	1.25	0.79	30,250
2	140,000	0.67	1.03	0.97	68,750
3	332,500	0.86	0.80	1.24	192,500
4	409,500	0.20	3.33	0.28	77,000
5	448,000	0.08	7.71	0.11	38,500
6	470,000	0.04	14.45	0.06	22,000
7	508,500	0.07	8.80	0.10	38,500
		$k = 0.35$	$TD = 5.34$	$D = 0.50$	

condiciones ecológicas, ya que los requerimientos de sales nutritivas para el séptimo día no presentaron efectos significativos en la razón de crecimiento. De acuerdo al concepto de Droop (1975), la razón de crecimiento disminuye cuando la concentración de nutrientes es baja para las necesidades metabólicas de la población algal, entrando en una fase estacionaria del ciclo de crecimiento. En el presente estudio, esto no ocurrió debido a que el tiempo de cultivo fue relativamente corto (siete días), lo cual favoreció que la concentración de nutrientes no sea limitante para el desarrollo de las microalgas.

El uso del dióxido de carbono en el método de Mathiesen y Torner (1966) para producción a gran escala de *T. suecica*, es una alternativa para reducir los costos de producción. El método tradicional utilizado (control) representa un costo en nutrientes de 7.12 dólares por cada 1,000 litros de producción, mientras que al utilizar la mitad de los nutrientes del control más dióxido de carbono, el costo se redujo a 3.56 dólares, y con el uso de un cuarto de nutrientes más dióxido de carbono el costo es de 1.78 dólares.

Se concluye que la variación de las concentraciones y adiciones de CO<sub>2</sub> son una alternativa para el cultivo en producción masiva de *T. suecica*. Lo anterior es de gran importancia por los bajos costos de operación que genera, igualando las producciones de técnicas tradicionales, dándole a esta biotecnología gran perspectiva en la acuicultura.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por el apoyo, a José A. Zertuche González y Elizabeth Orellana C. por sus sugerencias, y a Ramón Moreno por la realización de las figuras.

#### LITERATURA CITADA

Acuacop (1983). Algal food culture at the Center Oceanologique du Pacifique. In: J. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, pp. 3-14.

Droop, M.R. (1975). The nutrient status of alga cells in batch culture. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 55: 541-555.

ents of the control plus carbon dioxide are used, the cost is reduced to 3.56 dollars, and with the use of a quarter of the nutrients plus carbon dioxide, the cost is 1.78 dollars.

We conclude that the variation of the concentrations and additions of CO<sub>2</sub> are an alternative for the mass production of *T. suecica*. This is important because of the low costs of operation involved, equalling the production of traditional techniques, giving this method great perspective in aquaculture.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Instituto de Investigaciones Oceanológicas for its support, José A. Zertuche González and Elizabeth Orellana C. for their suggestions, and Ramón Moreno for drawing the figures.

English translation by Christine Harris.

- 
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Viega, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture, 42: 207-215.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Abalde, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch.) with high nutrient concentration. Aquaculture, 49: 231-244.
- Griffith, G.W., Murphy Kenslow, M.A. and Ross, L.A. (1973). A mass culture method for *Tetraselmis* sp., a promising food for larval crustaceans. Proc. of the Fourth Annual Workshop World Mariculture Society, pp. 289-294.
- Helm, M.M. (1977). Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 57: 1019-1029.
- Helm, M.M., Holland, D.L. and Stephenson, R.R. (1973). The effects of supplementary algal feeding on a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 53: 673-684.

- Islas Olivares, R., Gendrop Funes, V. y Miranda Aguilar, M. (1978). Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y ostión europeo (*Ostrea edulis*) en Baja California. *Ciencias Marinas*, 5(2): 73-86.
- Kinne, O. (1976). *Marine Ecology*, 3(1). Wiley-Interscience, London, 578 pp.
- Laing, I. and Utting, S.D. (1980). The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture*, 21: 79-86.
- Maddux, W.S. and Jones, R.F. (1964). Some interactions of temperature, light intensity, and nutrient concentration during the continuous culture of *Nitzschia closterium* and *Tetraselmis* sp. *Limnol. Oceanogr.*, 9(1): 79-86.
- Mathiesen, G.C. and Torner, R.C. (1966). Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. *Mar. Res. Found. Mass.*, IV + 138.
- Pruder, G.D. and Bolton, E.T. (1978). System configuration and performance: bivalve molluscan mariculture. *Proc. of the Ninth Annual Meeting World Mariculture Society*, pp. 747-759.
- Tolbert, N.E. (1974). Photorespiration. In: W.D.P. Stewart (ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, pp. 474-504.
- Walne, P.R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Lond.*, Ser. 2, 26(5), 62 pp.