

CULTIVOS SEMICONTINUOS DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON UN MEDIO NO CONVENCIONAL

SEMICONTINUOUS CULTURES OF FOUR MICROALGAE WITH A NONCONVENTIONAL MEDIUM

José Antonio López-Eliás¹
Domenico Voltolina²

¹ Centro de Investigación Científica y
Tecnológica de la Universidad de Sonora
Niños Héroes y Rosales S/N
Apartado postal 1819
Hermosillo, Son., México

² Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada
Departamento de Acuicultura
Apartado postal 2732
Ensenada, B.C., México

Recibido en mayo de 1992; aceptado en diciembre de 1992

RESUMEN

Se mantuvieron en cultivo semicontinuo cuatro microalgas, *Chaetoceros* sp., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Tetraselmis* sp. y *Pavlova lutheri* (Droop) Hibberd, con tasas de dilución entre 75 y 15%, dependiendo de la especie y medio de cultivo, con la finalidad de comparar la cantidad y calidad de la biomasa producida con un medio convencional y con otro no convencional. La calidad de la biomasa es independiente del medio, pero la producción diaria de *Tetraselmis* y de *Pavlova* es inferior con el medio no convencional. La mayor producción diaria de *Chaetoceros*, *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* y *Pavlova* se logró con las diluciones de 50, 60 y 40% para el medio convencional, y 25, 70, 40 y 30% para el no convencional. Dependiendo del grado de los reactivos y de la especie, los ahorros en costos de preparación del medio varían entre 97 y 70%.

ABSTRACT

Four microalgae, *Chaetoceros* sp., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Tetraselmis* sp. and *Pavlova lutheri* (Droop) Hibberd, were kept in semicontinuous cultures at dilution rates between 75 and 15%, depending on species and medium. The quantity and quality of the biomass produced using a nonconventional culture medium were compared to that obtained with a traditional formulation. The biomass produced did not differ qualitatively as a result of medium or dilution rates, but the daily yield of *Tetraselmis* sp. and of *Pavlova lutheri* was significantly lower with the nonconventional medium. The best yields of *Chaetoceros*, *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* and *Pavlova* were with dilution rates of 50, 60 and 40% for the conventional medium and 25, 70, 40 and 30% for the nonconventional formulation. The savings, in terms of cost of chemicals, range between 97 and 70%, depending on the grade of the chemicals and on the species in culture.

INTRODUCCION

El éxito de los laboratorios que producen juveniles de organismos acuáticos depende en gran parte de la disponibilidad de grandes cantidades de microalgas, cuyo cultivo es una de las tareas más importantes y costosas en el proceso de producción, y muy a menudo constituye un límite a la capacidad productiva del laboratorio.

Por ello, existe una amplia literatura en este campo sobre descripción de técnicas (Ukeles, 1973; Taub, 1980; Fogg y Thake, 1987), empleo de medios de cultivo no convencionales (Dunstan y Tenore, 1972; De la Cruz y Alfonso, 1975; Goldman, 1976; González-Rodríguez y Maestrini, 1984; Voltolina *et al.*, 1989), diseño de sistemas (Canzonier y Brunetti, 1975; Harrison y Davis, 1979; AQUACOP, 1983; Blais *et al.*, 1984), calidad dietética de la biomasa producida (Epifanio, 1979; Becker, 1986), su composición bioquímica (Giddings, 1977; Chu *et al.*, 1982) y la posibilidad de modificarla (Flaak y Epifanio, 1978; Gallager y Mann, 1982; Fabregas *et al.*, 1987).

En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos con cuatro especies de microalgas mantenidas en cultivo semicontinuo con diferentes tasas de dilución en un medio no convencional, con la finalidad de comparar la efectividad de éste respecto al medio f de Guillard y Ryther (1962), y definir la tasa de dilución en términos de cantidad y calidad celular para cada especie.

MATERIALES Y METODOS

Las microalgas empleadas forman parte de la colección del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y son todas aislamientos clonales. Dos de ellas son ampliamente utilizadas como dietas en acuicultura, las otras dos fueron aisladas localmente y se está estudiando su potencial para la misma finalidad. A continuación se da el nombre científico y la clave de las cepas estudiadas. Mayor información sobre ellas está contenida en Voltolina *et al.* (1991).

Chaetoceros sp.: aislada localmente. Referencia CICESE: CH-X-1.

INTRODUCTION

The success of laboratories that produce juveniles of aquatic organisms depends to a great extent on the availability of large quantities of microalgae, whose culture is one of the most important and costly tasks in the process of production and often proves to be a limitation to the productive capability of the laboratory.

Consequently, this field is extensively covered in the literature, from the description of techniques (Ukeles, 1973; Taub, 1980; Fogg and Thake, 1987), the use of nonconventional culture media (Dunstan and Tenore, 1972; De la Cruz and Alfonso, 1975; Goldman, 1976; González-Rodríguez and Maestrini, 1984; Voltolina *et al.*, 1989) and the design of systems (Canzonier and Brunetti, 1975; Harrison and Davis, 1979; AQUACOP, 1983; Blais *et al.*, 1984), to the dietetic quality of the biomass produced (Epifanio, 1979; Becker, 1986), its biochemical composition (Giddings, 1977; Chu *et al.*, 1982) and the possibility of modifying it (Flaak and Epifanio, 1978; Gallager and Mann, 1982; Fabregas *et al.*, 1987).

The results obtained with four species of microalgae kept in semicontinuous culture at different dilution rates using a nonconventional medium are presented in this study, in order to compare the effectiveness of this medium relative to medium f of Guillard and Ryther (1962) and define the rate of dilution in terms of cellular quantity and quality for each species.

MATERIALS AND METHODS

The microalgae used in this study are from the collection of the Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) and are all clonal isolates. Two of them are widely used as diets in aquaculture, while the other two were isolated locally and their potential use as diets is being investigated. The scientific names and keys of the strains used are given below. Further information on them is found in Voltolina *et al.* (1991).

Chaetoceros sp.: isolated locally. CICESE reference: CH-X-1.

Pavlova lutheri (Droop) Hibberd: aislamiento clonal secundario de la cepa MONO. Referencia CICESE: PA-L-1.

Phaeodactylum tricornutum Bohlin: aislamiento clonal secundario de la cepa PHAEO. Referencia CICESE: PH-T-1.

Tetraselmis sp.: aislada localmente. Referencia CICESE: TE-X-1

Los cultivos se realizaron con la técnica semicontinua en garrafrones de 18 l con 10 l de medio, y se iniciaron con un litro de cultivo ya acondicionado, por un mínimo de diez generaciones, al respectivo medio experimental. Las tasas de dilución fueron diferentes según la cepa y el medio, y fueron predeterminadas para que cayeran dentro de valores comprendidos entre el 40 y el 25% de la tasa máxima de división celular de cada especie, obtenida con ensayos de cultivos estáticos con varios medios convencionales y no convencionales (Voltolina *et al.*, 1991).

Las condiciones de cultivo fueron: temperatura entre 20 y 22°C, salinidad entre 30 y 33‰, agitación por aeración e iluminación continua con dos tubos fluorescentes "luz de día" y dos "blanco frío" de 40 W por cada cuatro garrafrones, que en total suministraban $1.2 \cdot 10^{16}$ quanta $s^{-1} cm^{-2}$. El pH se mantuvo entre 7.2 y 8.0 inyectando CO₂ al sistema de aeración con un flujo que se determinó experimentalmente para cada especie. La cantidad de CO₂ inyectada no se pudo medir por falta de un adecuado medidor de flujo, pero fue inferior al 1% del volumen de aire utilizado para la agitación de los cultivos. Se empleó como control el medio f de Guillard y Ryther (1962), y el medio no convencional se basó en el fertilizante *Tag Line-Citrus and Avocado Food*, cuya composición se da en la tabla 1, junto con la concentración final de los nutrientes en el medio. Para las diatomeas ambos medios se enriquecieron con la cantidad de silicatos indicada en la misma tabla 1. También fue necesario agregar FeEDTA para todas las cepas, con excepción de *Chaetoceros* sp., y vitaminas para *Pavlova lutheri*. En ambos casos las concentraciones fueron las mismas empleadas para el medio de control.

Para los análisis proximales se emplearon los siguientes métodos:

Pavlova lutheri (Droop) Hibberd: secondary clonal isolate of the MONO strain. CICESE reference: PA-L-1.

Phaeodactylum tricornutum Bohlin: secondary clonal isolate of the PHAEO strain. CICESE reference: PH-T-1.

Tetraselmis sp.: isolated locally. CICESE reference: TE-X-1.

The cultures were carried out using the semicontinuous technique in 18-l carboys with 10 l of medium. They were initiated with 1 l of culture already conditioned for a minimum of ten generations at the respective experimental medium. The dilution rates were different, depending on the species and medium, and were predetermined so as to fall within the values comprised between 40 and 25% of the maximum rate of cellular division of each species, obtained in static culture trials with several conventional and nonconventional media (Voltolina *et al.*, 1991).

Culture conditions were: temperature between 20 and 22°C, salinity between 30 and 33‰, stirring by aeration and continuous illumination with two "daylight" and two "cool white" fluorescent tubes of 40 W for every four bottles, which in total supplied $1.2 \cdot 10^{16}$ quanta $s^{-1} cm^{-2}$. pH was maintained between 7.2 and 8.0, injecting CO₂ into the aeration system with a flow that was determined experimentally for each species. The amount of CO₂ injected could not be measured due to the lack of a suitable flowmeter, but it was less than 1% of the volume of air used to stir the cultures. The medium f of Guillard and Ryther (1962) was used as control, and the nonconventional medium was based on the Tag Line-Citrus and Avocado Food fertilizer. The composition of the latter and the final concentration of the nutrients in the medium are given in table 1. For diatoms, both media were enriched with the amount of silicates indicated in table 1. It was also necessary to add FeEDTA to all the stocks, except *Chaetoceros* sp., and vitamins for *Pavlova lutheri*. In both cases the concentrations were the same as those used in the control medium.

The methods used for the proximate analyses are described below.

Peso seco total y materia orgánica: según Sorokin (1973).

Proteínas: Para cada especie se determinaron experimentalmente las mejores condiciones de extracción en NaOH caliente de varias normalidades. El mejor resultado se obtuvo con NaOH 0.1 N a 80°C de temperatura para *Pavlova lutheri* y 100°C para las otras con tiempo de tratamiento de 20 minutos para *P. tricomutum* y de 10 minutos para las demás. En todos los casos se procedió a una doble extracción antes de determinar la concentración de proteínas con el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Malara y Charra (1972a).

Carbohidratos: La extracción fue según Whyte (1987). Para la determinación, se empleó la modificación de Malara y Charra (1972b) del método de Dubois *et al.* (1956).

Lípidos: Se determinaron colorimétricamente con la técnica de Pande *et al.* (1963), después de su extracción con la modificación de Chiaverini (1972) del método de Bligh y Dyer (1959).

Todos los cultivos se estabilizaron de tres a cinco días a las diluciones previstas antes de iniciar el programa de muestreo. La estabilización antes del experimento y durante él se determinó mediante lecturas diarias de fluorescencia *in vivo*, y se comprobó que la pendiente de la regresión entre el Log₂ de las

Total dry weight and organic matter: according to Sorokin (1973).

Proteins: the best conditions for extraction in hot NaOH of several normalities were determined experimentally for each species. The best result was obtained with NaOH 0.1 N at a temperature of 80°C for *Pavlova lutheri* and 100°C for the others, with a time of treatment of 20 minutes for *P. tricomutum* and 10 minutes for the rest. In all cases, a double extraction was made before determining the concentration of proteins with the method of Lowry *et al.* (1951) modified by Malara and Charra (1972a).

Carbohydrates: the extraction was according to Whyte (1987), and the method of Dubois *et al.* (1956) modified by Malara and Charra (1972b) was used for the determination.

Lipids: were determined colorimetrically with the technique of Pande *et al.* (1963), after extraction with the method of Bligh and Dyer (1959) modified by Chiaverini (1972).

All cultures were stabilized during three to five days at dilutions determined prior to the sampling program. Stabilization before and after the experiment was determined by means of daily readings of *in vivo* fluorescence, confirming that the slope of the regression between Log₂ of the fluorescence units (indirect measurement of the biomass) and time was not significantly different from 0 (test

Tabla 1. Formulación del fertilizante para cítricos *Tag Line-Citrus and Avocado Food*.
Table 1. Formulation of the Tag Line-Citrus and Avocado Food fertilizer.

Constituyente	Porcentaje	Composición del medio (mg-at l ⁻¹)
Nitrógeno total	10	1.00
Fósforo disponible (como P ₂ O ₅)	8	0.15
Silicio		0.05
Potasio soluble	6	0.22
Azufre	6	0.26
Calcio	3	0.11
Hierro	1	0.02
Cantidad para preparar 1000 l	140 g	

unidades de fluorescencia (medida indirecta de la biomasa) y el tiempo no fuera significativamente diferente de 0 (prueba de coeficiente β ; Sokal y Rohlf, 1969). Los efectos de los medios de cultivo y las tasas de dilución se determinaron con un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$) y con la prueba *a posteriori* de Student-Neuman-Keuls. Los valores de producción media por unidad productiva se contrastaron con la prueba *t* de Student.

La evaluación de costos para cada caso está basada solamente en los costos de los nutrientes de grado reactivo e industrial (en dólares de 1989 y sin considerar gastos de importación) empleados para preparar la cantidad de medio necesaria para la producción de 1 kg de materia orgánica seca, empleando en cada caso la tasa de dilución más productiva y sin considerar gastos de mano de obra y energía.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los cultivos se mantuvieron estables durante un periodo mínimo de veinte días, con la excepción de *Phaeodactylum tricomutum*, que en el mejor de los casos, duró en ese estado siete u ocho días.

Las características de las biomásas producidas se dan en la tabla 2. Aunque al hacer comparaciones entre medios y tasa de dilución se encontraron algunas diferencias significativas en la composición proximal de las células, éstas fueron esporádicas y poco consistentes dado que muy raramente una diferencia en una de las fracciones era reflejada por diferencias en las demás. Lo que destaca al examinar esta tabla es la alta variabilidad de la composición celular evidenciada por los altos valores de las desviaciones estándar, que son sólo parcialmente atribuibles a problemas metodológicos (menos del 20% según los datos recabados en éste y en otros trabajos similares llevados a cabo en el mismo laboratorio).

Por otro lado, hay que considerar que en general la literatura (Fabregas *et al.*, 1987; Fogg y Thake, 1987; Fernández-Reirz *et al.*, 1989) indica que se encuentran diferencias en la composición de las microalgas cuando se contrastan cultivos en diferentes fases de crecimiento. En este caso todos los cultivos se mantuvieron en diferentes puntos de la fase de lento crecimiento, dado que se emplearon tasas de dilución entre el 25 y 40% de los valores de la μ máxima de cada cepa, por lo cual no cabe

of coefficient β ; Sokal and Rohlf, 1969). The effects of the culture media and dilution rates were determined with a two-way analysis of variance ($\alpha = 0.05$) and with the Student-Newman-Keuls *a posteriori* test. The values of mean production per productive unit were compared with Student's *t* test.

The evaluation of costs made for each case was based only on the cost of the reactive and industrial grade nutrients (in 1989 dollars, without considering importation costs) used to prepare the necessary amount of medium for the production of 1 kg of dry organic matter. The most productive dilution rate was used in each case, and labour and energy costs were not considered.

RESULTS AND DISCUSSION

Cultures remained stable for a minimum period of 20 days, except *Phaeodactylum tricomutum* which in the best of cases remained seven or eight days in this state.

The characteristics of the biomass produced are given in table 2. Although some significant differences in the proximate composition of the cells were found on comparing media and dilution rates, these were sporadic and not very consistent since very rarely was a difference in one of the fractions reflected by differences in the others. Table 2 shows the high variability of the cellular composition, indicated by the high standard deviation values which can only be partially attributed to methodological problems (less than 20% according to data obtained in this and other similar studies conducted in the same laboratory).

On the other hand, differences in the composition of the microalgae are generally found when cultures in different phases of growth are compared (Fabregas *et al.*, 1987; Fogg and Thake, 1987; Fernández-Reirz *et al.*, 1989). In this case, all cultures were kept in different periods of the slow growth phase, since dilution rates between 25 and 40% of the maximum μ values of each stock were used and therefore important differences in the various cellular fractions are not to be expected.

The data presented in table 2 were used to calculate the average daily production for one productive unit of each species for each culture medium and dilution rate (Fig. 1).

Since there were no important differences in the biochemical fractions, the discus-

Tabla 2. Biomasa (como No. de células/ml y $\mu\text{g}/10^6$ células) y constituyentes celulares (en porcentaje de peso seco) de las cuatro especies estudiadas en el medio control (f) y alternativo (a). En paréntesis se indica la desviación estándar. A la izquierda de cada columna una línea entre dos o más valores indican que no existe diferencia significativa entre diluciones con el mismo medio. Los valores promedio del medio f seguidos por un asterisco resultaron diferentes ($P < 0.05$) de la dilución análoga con el medio alternativo.

Table 2. Biomass (in No. of cells/ml and $\mu\text{g}/10^6$ cells) and cellular constituents (in percentage of dry weight) of the four species studied with the control medium (f) and alternative medium (a). Standard deviation is indicated in parentheses. To the left of each column, a line between two or more values indicates that there is no significant difference between dilutions with the same medium. The average values of medium f followed by an asterisk proved to be different ($P < 0.05$) than the analogous dilution with the alternative medium.

Especie	Medio	Dil	Biomasa		Constituyentes (%)			
			No. cel. 10^6	$\mu\text{g}/10^6$ células	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas
<i>Chaetoceros</i>	f	50	4.27 (0.89)	31.0 (5.5)	35.9 (10.0)	9.5* (1.2)	14.1 (6.3)	18.6* (3.2)
<i>Chaetoceros</i>	f	33	4.18* (0.48)	30.0 (3.9)	29.4* (11.8)	9.9 (2.8)	17.4 (3.4)	19.5 (4.0)
<i>Chaetoceros</i>	f	25	3.69* (0.57)	61.0* (4.0)	26.5 (1.3)	7.7 (1.8)	10.1 (3.5)	28.8 (7.0)
<i>Chaetoceros</i>	a	50	3.93 (0.48)	31.0 (4.2)	46.7 (10.0)	18.0 (3.7)	19.0 (1.0)	24.2 (2.3)
<i>Chaetoceros</i>	a	33	4.71 (0.25)	33.0 (1.8)	54.9 (5.5)	11.4 (0.9)	19.8 (0.3)	17.9 (4.1)
<i>Chaetoceros</i>	a	25	5.88 (0.25)	42.0 (10.1)	36.3 (6.8)	10.6 (1.8)	15.8 (3.6)	23.4 (14.1)
<i>Tetraselmis</i>	f	40	.78 (0.09)	276.7* (12.7)	53.8 (6.9)	11.3 (1.4)	12.0 (2.5)	17.8 (1.7)
<i>Tetraselmis</i>	f	30	1.09* (0.08)	235.5 (16.0)	47.1 (7.1)	9.6* (1.3)	11.7 (4.7)	17.1 (3.0)
<i>Tetraselmis</i>	f	25	1.47* (0.04)	217.2 (10.1)	41.9 (8.8)	9.9 (1.9)	6.9* (1.7)	17.3 (1.9)
<i>Tetraselmis</i>	a	40	.67 (0.08)	231.7 (24.6)	44.8 (9.0)	12.3 (1.1)	11.5 (1.2)	18.9 (8.0)
<i>Tetraselmis</i>	a	30	0.85 (0.05)	237.0 (23.1)	40.0 (3.7)	13.6 (1.9)	10.3 (0.7)	16.1 (2.1)
<i>Tetraselmis</i>	a	25	0.98 (0.11)	231.2 (38.8)	40.4 (5.4)	11.1 (0.7)	11.1 (0.5)	19.6 (5.6)

Tabla 2 (Cont.)
Table 2 (Cont.)

Especie	Medio	Dil	Biomasa		Constituyentes (%)							
			No. cel. 10 ⁶	µg/10 ⁶ células	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas				
<i>Phaeodactylum</i>	f	75	2.91 (0.74)	20.6 (5.4)	42.7 (5.7)	12.1 (0.6)	17.5 (4.7)	16.8 (7.2)				
<i>Phaeodactylum</i>	f	60	6.45 (3.01)	18.1 (7.0)	49.8 (10.3)	13.0 (2.1)	18.4 (4.9)	10.6 (7.8)				
<i>Phaeodactylum</i>	f	50	6.86 (1.67)	17.8 (3.1)	48.8 (5.8)	11.8 (1.3)	16.7 (4.5)	13.3 (5.0)				
<i>Phaeodactylum</i>	a	70	5.18 (1.13)	20.9 (3.4)	46.1 (4.6)	12.1 (1.2)	20.8 (6.0)	9.2 (0.8)				
<i>Phaeodactylum</i>	a	60	5.75 (1.34)	19.2 (2.4)	50.8 (3.6)	11.7 (0.9)	21.0 (3.3)	9.8 (0.6)				
<i>Phaeodactylum</i>	a	50	5.78 (1.37)	19.9 (3.9)	52.3 (6.8)	11.5 (0.4)	21.5 (1.3)	10.1 (2.6)				
<i>Pavlova</i>	f	40	7.19 (0.98)	14.6 (2.9)	30.6 (3.9)	13.5 (2.2)	24.3 (6.6)	8.8 (4.3)				
<i>Pavlova</i>	f	30	8.62* (1.21)	11.3* (1.8)	30.5* (2.3)	13.6 (1.1)	28.9* (4.9)	4.9 (4.5)				
<i>Pavlova</i>	f	25	10.57* (1.35)	13.1 (1.0)	35.2 (3.6)	14.8* (1.0)	25.3 (5.2)	4.8 (3.3)				
<i>Pavlova</i>	a	30	6.26 (0.50)	16.0 (2.2)	38.4 (4.3)	13.8 (1.4)	23.3 (3.0)	13.4 (3.4)				
<i>Pavlova</i>	a	25	7.15 (2.14)	15.6 (2.4)	36.8 (2.7)	12.6 (1.7)	23.4 (6.1)	12.4 (1.0)				
<i>Pavlova</i>	a	15	7.34 (1.49)	17.7 (3.5)	33.1 (5.8)	11.1 (3.2)	20.2 (4.1)	12.1 (5.3)				

esperar la existencia de diferencias importantes en las varias fracciones celulares.

Los datos reproducidos en la tabla 2 se emplearon para calcular la producción diaria que se obtuvo en promedio por una unidad productiva de cada especie, con cada medio de cultivo y tasa de dilución (Fig. 1).

Debido a lo comentado anteriormente sobre la falta de diferencias importantes en las fracciones bioquímicas, la discusión está centrada sobre la cantidad de biomasa producida diariamente y sobre el costo de producción.

Para *Chaetoceros* sp. las mayores producciones de peso seco total y orgánico se

basan en la cantidad de biomasa producida diariamente y en el costo de producción.

For *Chaetoceros* sp., the highest total dry weight and organic productions were obtained at dilutions of 50% with medium f and 25% with the alternative medium. In both cases, a 10-l culture may produce approximately 0.65 g of total dry weight and 0.52 g of organic matter per day. The cost of the medium necessary to produce 1 kg of organic matter was calculated at 1.40 dollars for the fertilizer and at 16.20 and 42.00 dollars for medium f, using technical and analytical grade reagents, respectively.

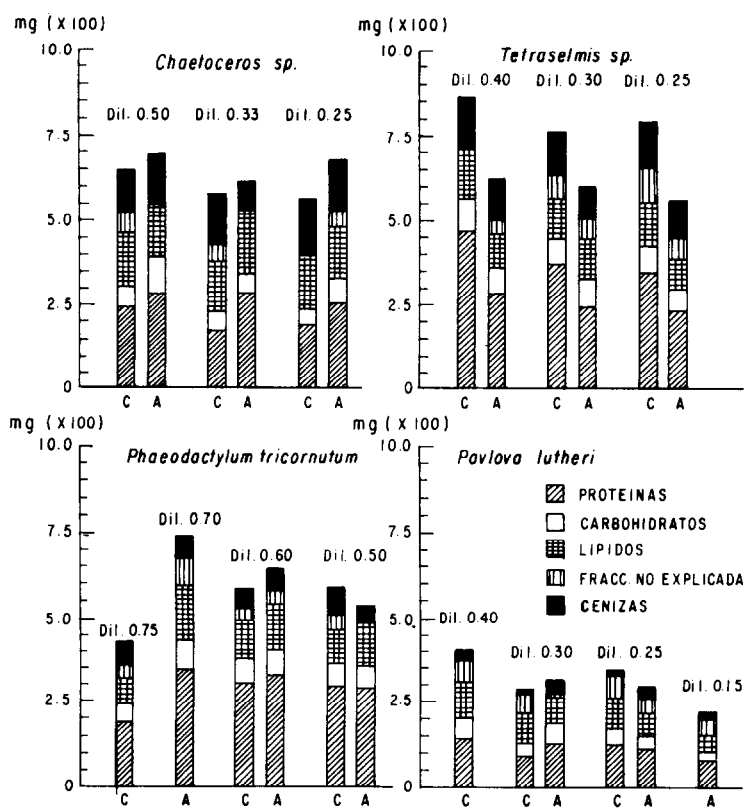


Figura 1. Cosecha diaria en mg de peso seco, por unidad productiva de 10 l, con las diluciones indicadas. C: medio control; A: medio alternativo. La fracción no explicada se refiere a la diferencia entre el peso seco orgánico, determinado gravimétricamente y las concentraciones de las diferentes fracciones celulares medidas con los métodos analíticos correspondientes.

Figure 1. Daily harvest in milligrams of dry weight, for a productive unit of 10 l, at the dilutions indicated. C: control medium, A: alternative medium. The unexplained fraction refers to the difference between the organic dry weight, determined gravimetrically, and the concentrations of the different cellular fractions measured with the corresponding analytical methods.

obtuvieron con las diluciones del 50% con el medio f y del 25% con el medio alternativo. En ambos casos, un garrafón con 10 l de cultivo podría producir aproximadamente 0.65 g de peso seco total y 0.52 g de materia orgánica por día. Los costos del medio necesario para la producción de 1 kg de materia orgánica se calcularon en 1.40 dólares, para el fertilizante, y en 16.20 y 42.00 dólares, para el medio f, empleando reactivos del grado técnico y analítico, respectivamente.

En el caso de *Tetraselmis* sp., tanto la tabla 2 como la Fig. 1 indican que el medio f resultó superior al medio alternativo en términos de producción de biomasa, sin que esto se reflejara en la calidad de la biomasa producida. Con diluciones inferiores (25 y 30%) hubo diferencias significativas en concentración celular, mientras que con 40% de dilución el mayor peso de cada célula, que indica mayor fracción de células en proceso de división, dio por resultado una biomasa superior a todas las diluciones del medio alternativo y fraccionalmente, aunque no significativamente, a las otras dos con el medio f.

Como la calidad de la biomasa no depende del medio empleado, las diferencias en los costos del medio necesario para producir 1 kg de materia orgánica (2.60, 8.90 y 16.00 dólares para medio alternativo, f industrial y reactivo f, respectivamente) no son importantes como en el caso anterior. La decisión sobre el uso de uno u otro medio deberá basarse únicamente en consideraciones de otro tipo, como son las necesidades diarias de producción, la disponibilidad de espacio, unidades productivas y demás costos asociados.

Phaeodactylum tricomutum se mantuvo con diluciones de 75, 60 y 50% para el medio de control. La producción de biomasa fue notablemente inferior con la dilución de 75% (tabla 2). El medio alternativo se ensayó con una dilución ligeramente inferior (70%) dejando sin variar las otras dos. Se notó que cuando esta cepa se reproduce rápidamente, inicia una segunda división celular antes de que se complete la anterior. El resultado es la formación de largas cadenas de células unidas lateralmente, que tienden a precipitarse causando en breve tiempo el decaimiento del cultivo. Con base a esto, los cultivos sólo se mantuvieron estables durante siete u ocho días. Por lo que se refiere a calidad de la biomasa, no hubo diferencias significativas entre diluciones y medios. Se encontró, con la

In the case of *Tetraselmis* sp., both table 2 and Fig. 1 indicate that medium f was better than the alternative medium in terms of biomass production, without this being reflected in the quality of the biomass produced. At lower dilutions (25 and 30%), there were significant differences in cellular concentration, whereas at 40% the greater weight of each cell, which indicates a higher fraction of cells in the process of division, results in higher biomass than with all the dilutions of the alternative medium, and fractionally though not significantly higher than with the other two of medium f.

Since the quality of the biomass does not depend on the medium used, the differences in cost of the medium necessary to produce 1 kg of organic matter (2.60, 8.90 and 16.00 dollars for the alternative, industrial f and reactive f media, respectively) are not important, as they are in the previous case. The choice of which medium to use should be based solely on other considerations, such as the daily production requirements, availability of space, productive units and other associated costs.

Phaeodactylum tricomutum was kept at dilutions of 75, 60 and 50% for the control medium. Biomass production was noticeably lower with the 75% dilution (table 2). The alternative medium was tested at a slightly lower dilution (70%) leaving the other two unchanged. It was noted that when this strain reproduces rapidly, a second cellular division begins before the previous one is completed. This results in the formation of long chains of laterally joined cells that tend to precipitate causing, in a short time, the decline of the culture. Consequently, the cultures only remained stable for seven or eight days. Regarding the quality of the biomass, there were no significant differences between dilutions and media. Except in the case of the high dilution of the control medium, the biomass harvested tended to increase with the higher dilutions, although the difference was only significant for the alternative medium. Even though there were no significant differences between the 50 and 60% dilutions of the control medium, the latter was chosen to calculate the cost of producing 1 kg of organic matter, which was 4.40, 15.90 and 41.60 dollars for the alternative, industrial f and reactive f media, respectively.

Pavlova lutheri was difficult to maintain. This is mainly attributed to its low rate

excepción de la alta dilución en el medio de control, que la biomasa cosechada tendía a aumentar para mayores diluciones aunque la diferencia fue significativa sólo para el medio alternativo. A pesar de que no hubo diferencia significativa entre las diluciones de 50 y 60% del medio de control, se escogió esta última para calcular los costos de producción de 1 kg de materia orgánica que resultaron de 4.40, 15.90 y 41.60 dólares para los medios alternativo, f industrial y f reactivo, respectivamente.

Pavlova lutheri fue difícil de mantener, lo cual atribuimos sobre todo a su baja tasa de duplicación, que permitió diluciones máximas del 40 y 30% para los medios de control y alternativo. Para esta especie el medio alternativo es poco adecuado, sobre todo en vista del elevado contenido de cenizas que se encontró en todas las diluciones de este medio, lo cual probablemente indica la presencia de vacuolas mayores en número o dimensiones de lo que cabría esperar en células que se reproducen de forma normal. Cabe también resaltar los altos contenidos lipídicos (entre 20 y 29%) y los bajos porcentajes de proteínas (entre 30 y 38%) encontrados en todos los cultivos. Estos parecen indicar que ambos medios limitaron de alguna forma el crecimiento de esta cepa, cuyas características bioquímicas y de rápido crecimiento están ampliamente documentadas en la literatura (Parson *et al.*, 1961; Droop, 1975; Emdadi y Berland, 1989). Los costos de producción de 1 kg de materia orgánica se calcularon en 4.60, 16.80 y 32.00 dólares para los tres tipos de medios considerados anteriormente pero no se tomó en cuenta, como para *Tetraselmis* sp., la necesidad de un aumento de los gastos de energía, espacio y volumen de los sistemas necesarios para lograr la misma producción diaria, si se decidiera emplear el medio alternativo.

CONCLUSIONES

El medio no convencional dio resultados comparables con los obtenidos con el medio de control. La calidad de la biomasa sólo se vio consistentemente afectada en términos de contenido de cenizas en el caso de *P. lutheri* sin que esto modificara la composición proximal de la fracción orgánica.

En términos de producción diaria de biomasa orgánica, ésta fue igual o mejor con el

of duplication, which allowed maximum dilutions of 40 and 30% for the control and alternative media, respectively. For this species, the alternative medium is not very suitable, in particular because of the high ash content found in all the dilutions of this medium which probably indicates the presence of vacuoles greater in number or dimensions than would be expected in cells that reproduce normally. The high contents of lipids (between 20 and 29%) and the low percentages of protein (between 30 and 38%) found in all the cultures should also be noted. They seem to indicate that both media in some way limited the growth of this stock, whose biochemical characteristics and rapid growth are widely documented in the literature (Parsons *et al.*, 1961; Droop, 1975; Emdadi and Berland, 1989). The cost of producing 1 kg of organic matter was calculated at 4.60, 16.80 and 32.00 dollars for the three previously mentioned types of media. However, the necessary increase in the cost of energy, space and volume of the systems to achieve the same daily production if the alternative medium is used, is not considered as for *Tetraselmis* sp.

CONCLUSIONS

The results obtained with the nonconventional medium were comparable to those obtained with the control medium. The quality of the biomass was only consistently affected in terms of ash content in the case of *P. lutheri*, without modifying the proximate composition of the organic fraction.

The daily production of organic biomass was the same or better with the nonconventional medium in the case of *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*, and 25 and 30% lower for *Tetraselmis* sp. and *Pavlova lutheri*, respectively.

The culture medium prepared with the fertilizer gave better results than those reported by González-Rodríguez and Maestrini (1984) and Fabregas *et al.* (1987). This is attributed to its better N:P ratio, which was 3:1 or lower for the media used by the above authors.

It is also evident that on formulating one of these culture media, the requirements of the microalgae to be cultured must be considered. The medium used in this experiment required different enrichments, such as chelates and vitamins, so that it could be favourably compared with the control medium

medio no convencional en el caso de *Chaetoceros* sp. y de *Phaeodactylum tricomutum*, e inferior en un 25 y 30% para *Tetraselmis* sp. y *Pavlova lutheri*, respectivamente.

El medio de cultivo preparado con el fertilizante para cítricos dio resultados mejores que los empleados por González-Rodríguez y Maestrini (1984) y Fabregas *et al.* (1987), lo cual atribuimos a su mejor razón N:P, que en los trabajos mencionados fue de 3:1 o inferior.

También resulta evidente que al formular uno de estos medios de cultivo hay que considerar los requerimientos de las microalgas que se quiera cultivar. El medio empleado en este experimento necesitó de hecho enriquecimientos diferentes, como quelante y vitaminas, para que se pudiera comparar favorablemente con el medio de control, para tres de las cuatro especies ensayadas. Para una de ellas, el medio de control resultó aparentemente limitante.

REFERENCIAS

- AQUACOP (1983). Algal food cultures at the Centre Oceanologique du Pacifique. In: J.P. McVey (ed.), **Handbook of mariculture**. Vol. I. Crustacean aquaculture. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida, 442 pp.
- Becker, C.W. (1986). Nutritional properties of microalgae, potentials and constraints. In: A. Richmond (ed.), **Handbook of microalgal mass cultures**. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida, 528 pp.
- Blais, C., Fournier, R. and Marsot, P. (1984). Continuous microalgal culture using swine manure dialysate as a nutrient source. **Aquacultural Engineering**, 3: 275-287.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37: 911-917.
- Canzonier, W.J. and Brunetti, R. (1975). Low-cost continuous algal culture system. **10th European Symposium of Marine Biology**, Ostend, Belgium, Sep. 17-23, I: 27-31.
- Chiaverini, J. (1972). Techniques d'extraction et analyse des lipides. **Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer**. Notes de travail, No. 12, 12 pp.
- for three of the four species tested. The control medium was apparently limiting for one of them.
- English translation by Christine Harris.
-
- Chu, F.L.E., Webb, K.L., Hepworth, D. and Roberts, M. (1982). The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of *Crassostrea virginica*. **J. Shellfish Res.**, 2: 29-34.
- De la Cruz, S.A. y Alfonso, E. (1975). Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. **Ciencias**, serie 8: 1-25.
- Droop, M.R. (1975). The chemostat in mariculture. **10th European Symposium of Marine Biology**, Ostend, Belgium, Sep. 17-23, I: 71-93.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). A colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28: 350-356.
- Dunstan, W.M. and Tenore, K.R. (1972). Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. **Aquaculture**, 1: 181-192.
- Emdadi, D. and Berland, B.R. (1989). Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, 26: 215-225.
- Epifanio, C.E. (1979). Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). **Aquaculture**, 18: 1-12.
- Fabregas, J., Toribio, L., Abalde, J., Cabezas, B. and Herrero, C. (1987). Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. **Aquacultural Engineering**, 6: 141-150.
- Fernández-Reirz, M.J. Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J. and Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the

- biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, 83: 17-37.
- Flaak, A.R. and Epifanio, C.E. (1978). Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Biol.**, 15: 157-163.
- Fogg, G.E. and Thake, B. (1987). **Algal cultures and phytoplankton ecology**. Univ. Wisconsin Press, 269 pp.
- Gallager, S.M. and Mann, R. (1982). The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter *Thalassiosira pseudonana* (3H) on its food value to the bivalve *Tapes japonica*. **Aquaculture**, 26: 95-105.
- Giddings, J.M. (1977). Chemical composition and productivity of *Scenedesmus abundans* in nitrogen limited chemostat cultures. **Limnol. Oceanogr.**, 22: 911-917.
- Goldman, J.C. (1976). Phytoplankton response to waste-water nutrient enrichment in continuous culture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 23: 31-43.
- González-Rodríguez, E. and Maestrini, S.Y. (1984). The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. **Aquaculture**, 42: 245-256.
- Guillard, R.L.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. **Can. J. Microbiol.**, 8: 229-239.
- Harrison, P.J. and Davis, C.O. (1979). The use of outdoor phytoplankton continuous cultures to analyse factors influencing species selection. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 41: 9-23.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.
- Malara, G. et Charra, R. (1972a). Dosage des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. **Université de Paris**, Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer. Notes de travail, No. 5, 11 pp.
- Malara, G. et Charra, R. (1972b). Dosage des glucides particulaires de phytoplankton selon la méthode de Dubois. **Université de Paris**, Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer. Notes de travail, No. 6, 12 pp.
- Pande, S.V., Khan, R.P. and Venkitasubra, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. **Analyt. Biochem.**, 6: 415-423.
- Parsons, T.R., Stephens, K. and Strickland, D.H. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. **J. Fish. Res. Bd. Canada**, 18: 1001-1016.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1969). **Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica**. H. Blume Ediciones, Barcelona, 832 pp.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density, pp. 321-343. In: J.R. Stein (ed.), **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 448 pp.
- Taub, F. (1980). Use of continuous culture techniques to control nutritional quality, pp. 707-721. In: G. Shelef and C.J. Soeder (eds.), **Algae biomass: production and use**. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 697 pp.
- Ukeles, R. (1973). Continuous culture, a method for the production of unicellular algal food, pp. 233-245. In: J.R. Stein (ed.), **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. Cambridge Univ. Press, 448 pp.
- Voltolina, D., Bückle-Ramírez, L.F. y Morales-Guerrero, E.R. (1989). **Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas**. 2a. Ed., CICESE, Ensenada, B.C., 67 pp.
- Voltolina, D., Trujillo-Valle, M. de L. y González-Leonardo, M.I. (1991). **La colección de cepas de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE**. Comunicaciones académicas, Serie Acuicultura, CTACT-9101, CICESE, Ensenada, B.C., 50 pp.
- Whyte, J.N.C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture**, 60: 231-241.