

Producción de fitoplancton para la investigación y la docencia en larvicultura de camarones, moluscos y peces, 2008-2013

Phytoplankton Production for Research and Teaching in Larviculture Shrimp, Shellfish and Fish, 2008-2013

Sidey Arias-Valverde
Universidad Nacional
Heredia, Costa Rica
sarias@una.cr

Karen Rodríguez-Núñez
Universidad Nacional
Heredia, Costa Rica
krodrigueznuñez@gmail.com

Silvia Ramírez-Flores
Universidad Nacional
Heredia, Costa Rica
silviaramf@gmail.com

Recibido: 7/10/14 Aceptado: 20/8/15

Resumen: Durante 2008 al 2013 la producción de fitoplancton marino fue una actividad miscelánea que apoyó la docencia, investigación y extensión. Para ello, anualmente se realizaron mejoras en la producción masiva, mantenimiento de cepas e intermedios; considerando los factores de tensión detectados el año anterior; cinco productos fundamentales se reportan: 1- adquisición de 11 especies certificadas, 2- mejoras en protocolos de producción masiva, 3- aislamiento de dos especies endógenas del Golfo de Nicoya, 4- aclimatación y escalamiento a 2 Ton de una especie endógena del Golfo de Nicoya clasificada como sp1 y 5- un incremento del 60 % en la producción de cultivos masivos. Durante este periodo, 10 especies fueron utilizadas como material didáctico en 7 cursos de los niveles III y IV de la Carrera de Biología Marina. Los resultados alcanzados indican que esta actividad ha contribuido al desarrollo de docencia, investigación y extensión que impulsa la Escuela de Ciencias Biológicas. Es importante continuar el trabajo en la obtención de especies endémicas aclimatadas, identificadas y



validadas como fuente de alimento vivo, mediante la caracterización bioquímica del perfil nutricional en las especies aisladas.

Palabras clave: Fitoplancton marino, producción, aislamiento-especies.

Abstract: From 2008 to 2013 production of marine phytoplankton was a miscellaneous activity that supporter teaching, investigation and extension. For this, improvements were made annually in the massive production, maintenance of stock and intermediates; considering the factors of tension detected last year, five fundamental products are reported: 1- acquisition of 11 certified species, 2- improvements in massive production protocols, 3- isolation of two endogenous species to the Gulf of Nicoya, 4- acclimation and scaling to 2 Tons of one species endogenous to the Gulf of Nicoya classifies as spl. And 5- a 60% increment in the production of massive cultures. During this period, 10 species were used as didactic material in 7 courses of levels III and IV of the Marine Biology career. The results accomplished indicate that this activity has contributed to the development of teaching, investigation and extension that promotes the School of Biological Sciences. It is important to continue the task of acquiring endemic, acclimated species that are identified and validated as a source of live food, through the biochemical characterization of the nutritional profile in the isolated species.

Keywords: Marine Phytoplankton, production, species isolation

La investigación y extensión realizada por la Escuela de Ciencias Biológicas –ECB– (en la biología reproductiva a ciclo cerrado del camarón blanco *Litopeneusvannamei*, *L. stylirostris*; el pargo mancha *Lutjanusguttatus*, la corvina aguada- *Cynoscionsquamipinnis*, la corvina reina *C. albus* y el ostión japonés *Crassostrea gigas*) y la docencia llevada a cabo para la formación de profesionales en biología marina han requerido del suministro parcial o sostenido de microalgas plantónicas. Ello obligó a que la producción de fitoplancton marino se implementara como una actividad permanente que apoyara, de forma integral, las actividades académicas desarrolladas en la Estación de Biología Marina durante el 2008 al 2013.

La producción de fitoplancton es una actividad indispensable para quienes trabajan en la generación de conocimiento sobre la biología reproductiva o en la manufactura en la producción de organismos acuáticos; en estos casos la principal aplicación es con fines nutricionales y estabilidad en la calidad de agua que conforma el mesocosmode producción.

Sobre los criterios utilizados para la producción de alimento vivo, destinado al estudio de la biología reproductiva en peces, crustáceos y moluscos, Collos

(2011) indica que la ubicación geográfica de los laboratorios determina las condiciones ambientales, obligando a establecer rutinas propias con el fin de estandarizar la calidad y cantidad de la producción. Cuatro componentes básicos son requeridos para el desarrollo de esta actividad: 1) Salas acondicionadas para la producción de respaldo, cultivos intermedios y cultivos intensivos; 2) Adquisición de especies axénicas-certificadas, utilizadas como fuente de alimento; 3) Personal técnico capacitado y actualizado; 4) Innovación permanente que promueva mejoras tecnológicas en la calidad, biomasa producida y reducción de costos.

A pesar de la interdependencia existente en las diferentes fases del escalamiento, podemos decir que la calidad y capacidad de producción se estandarizan en los cultivos intensivos, fase final donde la cosecha es utilizada como fuente de alimento. Sin embargo, existe un nivel de complejidad fisiológica, sobre la plasticidad de adaptación que la especie experimenta ante variaciones ambientales; las cuales inciden directamente en la cinética molecular y composición nutricional de la especie (Ganguly et al., 2013; Collos, 2011; Vásquez-Suárez, Guevara, González, Lemus, Arredondo-Vega, 2010; Loureiro, 2009; Nieves et al., 2009; Morris, Ramírez, Martín, Borges y Olivares, 2004; Muller-Feuga, 2004 y Fujiki y Taguchi, 2002).

Sobre la importancia de las microalgas en la dieta, Li et al (2014), Ruiz-Guzmán, Jiménez, Gomes, Prieto, (2012), Pettersen, Turchini, Jahangard, Ingram, Sherman (2010), Chacón et al. (2004) y Lemus et al. (2006) reportan que el fitoplancton provee de ácidos grasos poliinsaturados omega 3-PUFAS (ácido docosaheptaenoico-DHA, ácido eicosapentaenoico-EPA); de minerales yodo, hierro, zinc, cobalto, silicio, magnesio, calcio, fósforo, flúor, litio, germanio; vitaminas A, B, D, E y B12; carotenoides que favorecen el sistema inmunológico por sus propiedades antioxidantes; zeaxantina, astaxantina y luteína precursores vitamínicos potenciadores del color en salmónidos, invertebrados y huevos. Además, son vectores de polisacáridos (EPS) que actúan como componente antimicrobiano, anticoagulante, antitumoral y antiviral en organismos de cultivo.

Las especies de uso frecuente con fines nutricionales utilizadas en la producción de crustáceos son: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *T. weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *C. gracilis*, *C. calcitrans*, *C. neogracile*, *Nitzschia closterium*; mientras que *Dunaliella tertiolecta*, *D. salina*, *Tetraselmis chuii*, *T. suecica*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *N. salina*, *Nanochloris atomus*, *Isochrysis galvana*, *I. var. Tahiti*,

Monochrysis lutheri, *Porphyridiuncrumentum* y *Rhodomonas salina* (Priyadarshani et al., 2011; Peterssen et al.; 2010; Loureiro, 2009, Ching-Piao y Liang-Ping, 2001), las cuales son ideales en la nutrición de estadios tempranos de peces, zooplancton, moluscos bivalvos y otros invertebrados.

El objetivo del presente trabajo fue apoyar la docencia, investigación y extensión que la Escuela de Ciencias Biológicas desarrollaba en la Estación de Biología Marina, mediante el suministro de fitoplancton marino.

Metodología

La producción de fitoplancton se realizó en el Laboratorio de Producción de Plancton Marino, Estación de Biología Marina, provincia de Puntarenas, Costa Rica. Durante todo este periodo se trabajó en tres escalas de producción: 1) Mantenimiento de cultivos respaldos, 2) Selección, aclimatación y escalamiento de especies objetivos de cultivo y 3) Producción masiva de cultivos mono-específicos.

Se realizó la compra de 11 especies de microalgas certificadas provenientes de **Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota**(s. f.); los protocolos de producción utilizados fueron suministrados por este mismo centro. Sin embargo, se requirieron ajustes durante la aclimatación de los especímenes cuando se sometieron a las condiciones ambientales de las diferentes salas.

La desinfección en tanquería, mesas de trabajo y pisos del laboratorio se realizó mediante lavados con hipoclorito de sodio al 3%. La cristalería y medio de cultivo para respaldos fue autoclavado en atmósfera húmeda a 121°C durante 10 minutos.

En una habitación temperada a 25°C, se procedió a revisar la condición de cepas y respaldos, con la ayuda de un microscopio de luz binocular Olympus modelo CX31; posteriormente se repicaron en medio líquido (f/2 Guillard); entre 27 a 34 psu de salinidad; el almacenamiento se realizó en una incubadora calibrada a 24 °C ± 1 y un fotoperiodo-luz: oscuridad- 12:12.

Anualmente se coordinó con los académicos usuarios la selección de las especies, biomasa de producción y fechas de entrega. Una vez identificadas las especies y su demanda se procedió a aclimatar los diferentes lotes e iniciar el respectivo escalamiento de producción.

Para atender la docencia, se aclimataron dos replicas / especie, en volúmenes de 10 y 250ml; la investigación y extensión fue atendida realizando 24 réplicas / especie en volúmenes de 0,010 y 0,250 L, equivalentes a los lotes de aclimatación y respaldo; producción de intermedios requirieron 16 réplicas de 1, 2 y 30 L; y los cultivos masivos demandaron 8 replicas de 100 y 2000 L.

La cristalería y medio de cultivo correspondientes a inóculos entre los 10 a 2000 ml fue autoclavada a 121 °C durante 10 minutos. Las variables ambientales en la producción de inóculos fue: salinidad promedio de 33 psu, temperatura promedio 26 °C, iluminancia promedio 2000lux y fotoperiodo 24 horas luz. En todo el proceso el agua fue filtrada con arena de sílice -50 micras tamaño de partícula; bolsa de 5 y 1 micra, irradiación uv a 113 L/ minuto. Para volúmenes ≥ 30 L se suministró 60ppm de hipoclorito de sodio, como último tratamiento al agua de mar; la dechloración se realizó mediante burbujeo constante de aire durante 60 horas.

Los nutrientes utilizados entre los volúmenes de 0.010 a 100 L corresponden al protocolo de F/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975); volúmenes ≥ 500 L se trabajó con MAP (fosfato mono amónico 12% N: 61% P); nitrato de potasio (13,36% N: 45%K); silicatos (7% P: 3% S: 75%). Los silicatos se utilizaron únicamente en el cultivo de diatomeas. El fotoperiodo correspondió: respaldos 12:12; intermedios 12:0 y en masivo se trabajó con los periodos de luz natural, registrados generalmente en 13:11.

La verificación de protocolos de producción en cultivos masivos se realizó mediante bioensayos de escalamiento, con las especies que mayor demanda mostraron: *Isochrysis galvana*- CCMP 1323 y *Chaetoceros muelleri* CCMP 1318. Ambos bioensayos se realizaron por triplicado en tanques de fibra de vidrio de 2000 litros; la densidad de los inóculos para cada especie fue $2,20 \times 10^5$ cel/ml y $7,5 \times 10^4$ cel/ml, respectivamente. Las variables ambientales de temperatura, iluminancia y fotoperiodo correspondieron a los ciclos naturales de la época seca. La cinética del cultivo se determinó cada 8 horas durante cinco días; mediante el conteo de muestras fijadas con lugol al 1%; para ello se requirió de una cámara Neubauer y un microscopio de luz- Olympus modelo CX31.

La incorporación de especies endógenas a la colección se realizó, en marzo del 2011, mediante un muestreo de fitoplancton marino, a los estanques de cultivo de camarón de la finca ISLAMAR, Península de Nicoya. Los parámetros físico-químicos del agua; salinidad, temperatura, profundidad

Secchi, pH y O₂ disuelto se determinaron con un multiparámetro marca Thermo-Orion, modelo 5 Star y la iluminancia se midió con un luxómetro modelo TM-201. Los muestreos se realizaron por triplicado, mediante la filtración de 10 litros de agua a través de una red para colecta de fitoplancton.

Las muestras se trasladaron a la Estación de Biología Marina, en botellas de 500 ml debidamente etiquetas y almacenadas a 25°C. Una vez en el laboratorio de Producción de Plancton Marino, las muestras fueron aclimatadas durante 12 horas en erlenmeyer de 500 ml; cumplido este periodo cada muestra se sometió a tres tratamientos del medio de cultivo F/2 +Si; T1:100 %, T2 50% y T3 25%; 24°C de temperatura y 800 Lux de iluminancia. Diluciones seriadas en placas multipozos y tubos de ensayos se realizaron durante un mes; previa revisión al microscopio de luz se seleccionaron las mejores replicas. Se realizó el escalamiento a 2000 L de la especie endógena, sp 001.

Resultados

Durante en el periodo 2008 a junio del 2013, se adquirieron 11 especies de microalgas certificadas provenientes de Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota. En la figura 1 se muestra la producción de *Isochrysis galbana*, *Chaetocerosmuelleri*, *C. neogracilis*, *C. gracilis*, *Tetraselmissuecica*, *Pavlovalutheri*, *Nannochloropsis oculata*, *N. salina*, *Nannochlorisatomus* y *Rhodomonas salina*, utilizadas como material didáctico en los cursos de III y IV nivel de la carrera de Biología Marina (metabolitos secundarios, técnicas y métodos de muestreo, fisiología de crustáceos, biología de microorganismos, reproducción y alevinaje, biología de crustáceos y flora marina).

En el escalamiento de la producción, para atender la demanda de la investigación y extensión, se reporta que la biomasa promedio en cultivos intermedios registrada en *Pavlovalutheri*, *Nannochloropsisoculata*, *Isochrysis galbana* y *Chaetocerosmuelleri*, fue de 1.5 x10⁶ cel/ml durante todo el periodo. Estas dos áreas académicas, registraron una mayor demanda de *Isochrysis galbana* y *Chaetocerosmuelleri*; mientras que *Dunaliellatertiolecta*, *Tetraselmissuecica*, *Pavlovalutheri* y *Nannochloropsisoculata* fueron especies utilizadas ocasionalmente.

Los cultivos masivos registraron una biomasa de 5x10⁵ cel/ml, durante el 2008 al 2009; sin embargo, a partir del 2010 se lograron mejorar procesos,

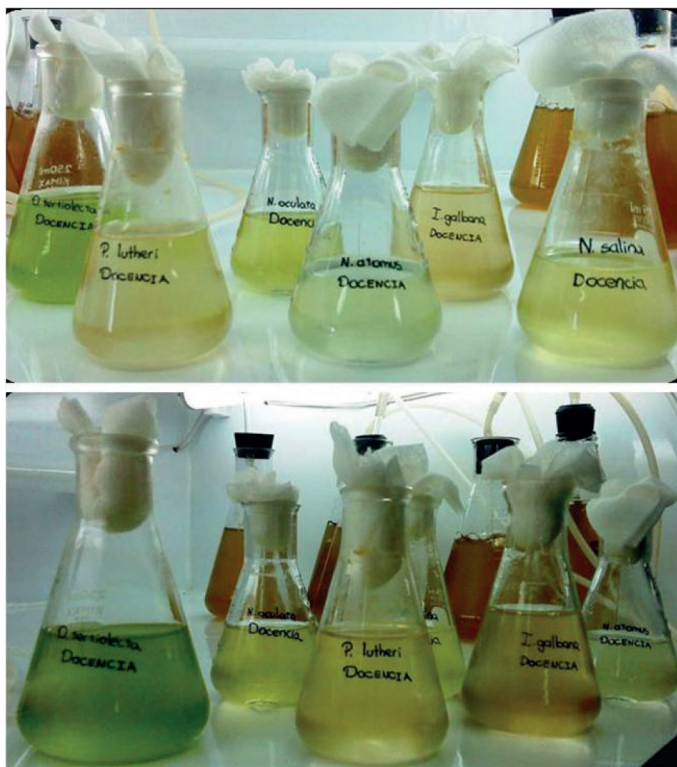


Figura 1. Material biológico-didáctico utilizado en la docencia ECB.

lo cual refleja un incremento en la densidad promedio de hasta 8×10^5 cel/ml. La figura 2 muestra la biomasa producida por año en cultivos masivos. Estos datos corresponden al material biológico utilizado como alimento vivo en la investigación y extensión.

A partir del 2010 se logró incrementar en 3×10^5 cel/ml la producción en los cultivos masivos. Las mejoras que se realizaron en toda la línea de producción –calidad del producto final, rediseños de protocolos para mantenimiento de respaldos, escalamiento de la producción, formulación de nutrientes y fortalecimiento del personal a cargo– permitieron dar respuesta a la dinámica que la investigación, la extensión y la docencia experimentaron durante este periodo.

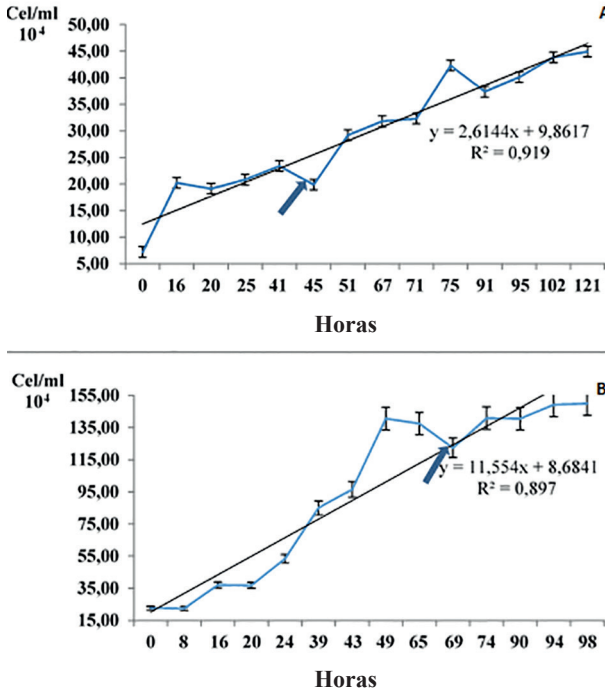
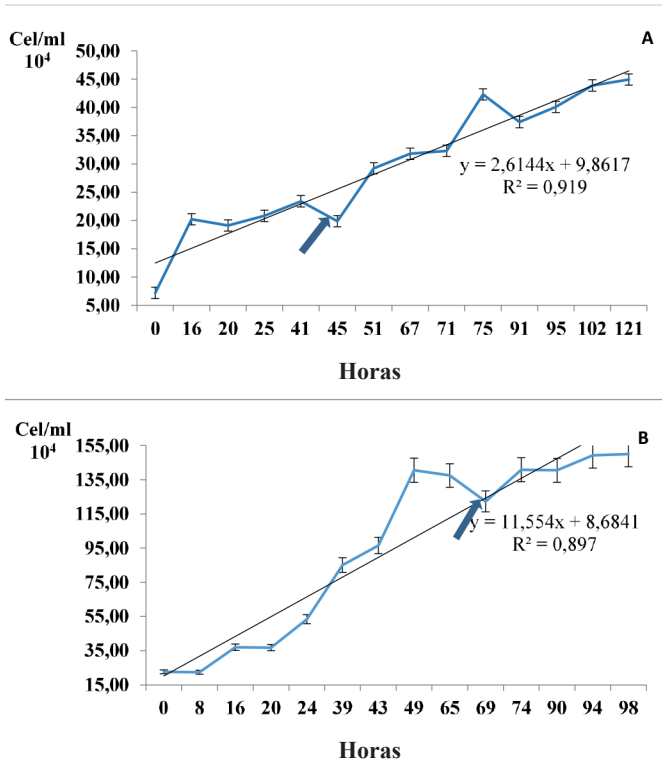


Figura2. Producción de fitoplancton marino registrado entre el 2008-2013.
 Datos normalizaron en Log₂.

Los biensayos realizados con *Isochrysis galbana* CCMP 1323 y *Chaetoceros muelleri* CCMP 1318 –especies referentes por la demanda histórica– permitió realizar ajustes en los procesos técnicos de producción. La figura 3 muestra la curva de crecimiento de ambas especies sometidas a las variables de temperatura (25 a 30°C), iluminancia (0 a 20000lux) y fotoperiodo (13:11), que experimentó la sala de producción masiva durante la época seca del 2010.



*Figura3. Curva de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* (A) *Isochrysis galbana* (B). Febrero 2010.*

Tres lotes de fitoplancton se dejan bajo la custodia del laboratorio Producción de Plancton Marino; el primer lote está conformado por 11 especies certificadas; el segundo corresponde a cuatro especies donadas y el tercero registra dos especímenes endógenos aislados del Golfo de Nicoya. Estas últimas especies se lograron aclimatar con éxito a las condiciones del laboratorio (*Nitzschiasp.* y *Chaetocerossp.*, codificadas como sp001 y sp002 respectivamente), (figuras 4 y 5).

Cepas del Lote-04

Bellerochea sp.
Nannochloris atomus
Nannochloropsis oculata
Phaeodactylum tricornutum
Tetraselmis sp.
Tetraselmis suecica
Thalassiosira pseudonana
Chaetoceros muelleri
Chaetoceros neogracile
Phaeodactylum tricornutum
Isochysis galbana

Cepas del Lote-06

Navicula cf. perminuta
Rhodomonas salina
Dunaliella tertiolecta (2 var)
Nannochloris atomus
Nannochloropsis oculata
Nannochloropsis salina
Phaeodactylum tricornutum
Tetraselmis sp (3 var)
Chaetoceros muelleri
Chaetoceros neogracile
Chaetoceros calcitrans
Phaeodactylum tricornutum (2 var)
Nitzschia brevistriata



Figura 4. Microalgas marinas custodiadas por el Laboratorio Producción de Marino.

La identificación molecular de las especies sp001 y sp002 no se logró realizar en este periodo; sin embargo, se continúa la gestión con el Laboratorio de análisis genómico- *Lagen* de la ECB, fuera de este proyecto; la figura 6 muestra el escalamiento de la especie sp 001.

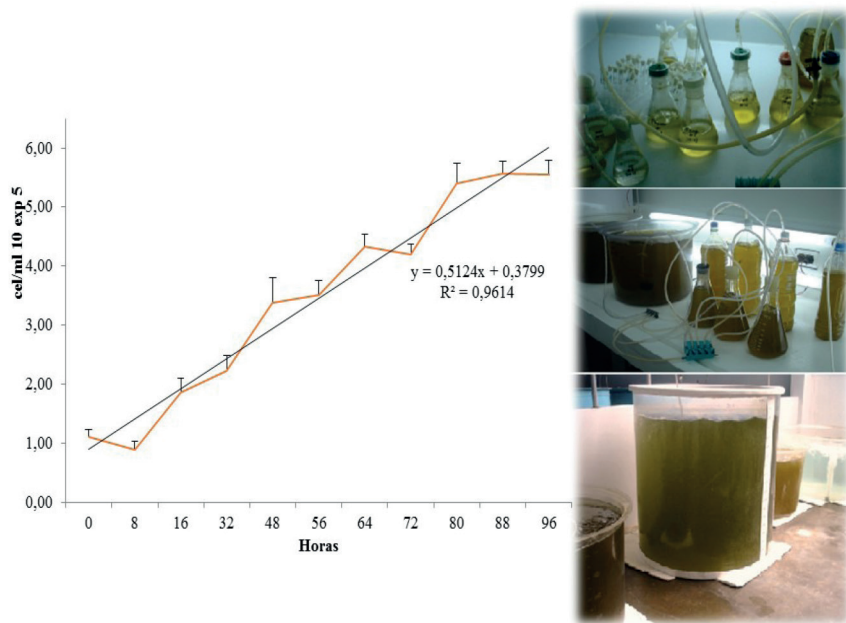


Figura 5. Cinética en el escalamiento de la especie, sp 001 aislada del Golfo de Nicoya.

Discusión

Durante el 2008 al 2013 se contribuyó con la investigación realizada en la biología reproductiva del camarón blanco - *Litopeneusvannamei* y *L. stylirostris*; del pargo mancha- *Lutjanusguttatus*; corvina aguada- *Cynoscionsquamipinnis*, corvina reina- *C. albus* y en la producción de semilla del ostión japonés *Crassostrea gigas*, este último fue un proyecto de extensión dirigido al fomento de la ostricultura como una alternativa a comunidades del Golfo de Nicoya. Todos estos trabajos son productos que reportan un alto grado de avance, no solo en la generación de conocimiento

científico, sino en logros hacia el desarrollo tecnológico de la producción de alevines o semillas obtenidas en condiciones de laboratorio. Se adquirieron 11 especies certificadas, con la finalidad de cumplir las normativas de trazabilidad y calidad que la academia requería, en el suministro de especies de microalgas referentes utilizadas como alimento vivo. Se trabajó en evaluar protocolos de producción durante la época seca, periodo del año donde se registran las variables más adversas de temperatura e iluminancia (figura 3).

A pesar de que no se realizaron los perfiles nutricionales de las microalgas suministradas, se consideraron los criterios técnicos científicos reportados por Ruiz-Guzmán et al. (2012), Priyadarshani et al. (2011), Peterssen et al. (2010) y Lemus et al. (2006), sobre la importancia de las microalgas en la dieta, como proveedora de ácidos grasos polinsaturados omega 3-PUFAS (ácido docosahexaenoico-DHA, ácido eicosapentaenoico-EPA); minerales yodo, hierro, zinc, cobalto, silicio, magnesio, calcio, fósforo, flúor, litio, germanio; vitaminas A, B, D, E y B12; carotenoides que favorecen el sistema inmunológico por sus propiedades antioxidantes; zeaxantina, astaxantina y luteína precursores vitamínicos potenciadores del color en salmónidos, invertebrados y huevos; y son vectores de polisacáridos (EPS) que actúan como componente antimicrobiano, anticoagulante, antitumoral y antiviral en organismos de cultivo.

El fitoplancton es la principal fuente de alimento vivo que conforma las redes tróficas; sin embargo, los patrones reproductivos de las poblaciones naturales son afectados por factores ambientales, biológicos y propios de la industria pesquera; generando incertidumbre en la disponibilidad del recurso mismo o bien alimento vivo y natural para la manufactura en el cultivo de peces, crustáceos y moluscos (Pettersen et al., 2010). Estas condiciones inducen a investigar y estandarizar la reproducción a ciclo cerrado, con las expectativas de incrementar la eficiencia en las tasas de alimentación, crecimiento y sobrevivencia de aquellas especies objetivo de pesca o cultivo.

Sin embargo, otras limitaciones se generan cuando se desea domesticar la producción de especies marinas silvestres bajo condiciones controladas. En grandes rasgos podemos mencionar cuatro fases principales: aclimatación, reproducción, engorde y alimentación.

La alimentación puede ser provista por materia inerte o pelletizados debidamente formulados, carne fresca u organismos vivos; generalmente en cualquier especie que se desea cultivar se requiere suministrar alimento vivo

en los primeros estadios de desarrollo, sean estas herbívoras o carnívoras, siempre se requerirá de fitoplancton como la fuente de alimento primario.

En la acuicultura las microalgas son usadas como el recurso alimenticio primario en todos los estadios de crecimiento de bivalvos filtradores; estadios tempranos de algunos crustáceos; en la producción de zooplancton para larvas de peces y crustáceos. El cultivo de microalgas como alimento vivo es una labor intensiva y costosa; se estima que la producción constante de biomasa microalgal equivale al 30% del total de los costos en la producción de semilla (Rivero-Rodríguez et al., 2007, citado por Pettersen et al., 2010); una razón más, que nos llevó a caracterizar y estandarizar los protocolos de producción, aumentando la eficiencia y eficacia en la calidad y cantidad de la producción de microalgas, dirigida en atender la investigación y extensión. Durante este periodo los cultivos masivos pasaron de 500.000 cel/ml a 800.000 cel/ml; esto equivale a un incremento del 60%.

Priyadarshani et al. (2012) reportan que las microalgas incrementan el oxígeno disuelto y reducen gases tóxicos como amonio, nitrito, sulfuro de hidrógeno, metano y dióxido de carbono, estabilizando la calidad del agua; reducen el canibalismo, estabilizan la temperatura del agua, reducen la población microbiana patógena y otros organismos no deseados al competir con nutrientes en solución; se trabajó en mejorar los protocolos de producción, con el fin de que las microalgas suministradas contaran con la vigorosidad y densidad que los sistemas de producción requerían de tal forma que además de suplir una necesidad alimenticia, las microalgas contribuyeran a reducir el canibalismo, incrementaran la reproducción de zooplancton y estabilizaran la temperatura en los estanques. La figuras 2 y 4 muestran la cinética de la producción de microalgas en fase log; esto obedece a que siempre se suministró la producción de cultivos masivos en la fase log avanzada o tardía; por tanto los cultivos nunca llegaron a la fase estacionaria.

Conclusiones

La producción de fitoplancton marino ha sido una actividad importante que ha contribuido al desarrollo de la investigación y extensión de organismos marinos.

Es importante continuar el trabajo en la obtención de especies endémicas aclimatadas, caracterizadas y validadas como fuente de alimento vivo.

Corresponde iniciar en la caracterización bioquímica nutricional de las especies aisladas.

Referencias

- Chacón C, Andrade C., Cárdenas C., Araujo I., y Morales E. (2004). Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno y fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Volumen 39. N.º 2, p.94-108. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Collos, Y. (2011). A linear model of external interactions during uptake of different forms of inorganic nitrogen by microalga. *Journal of Plankton Research*, 35(3), 461-472.
- Ching-Piao, L. y Liang-Ping, L. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 207-214.
- Fujiki, T. y Taguchi, S. (2002). Variability in chlorophyll *a* specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *Journal of Plankton Research*, 24(9), 859-874.
- Ganguly, D. Robin, R.S., Vardhan K.V., Muduli, P.R., Abhilash, K.R., Patra S., Subramanian, B.R. (2013). Variable response of two tropical phytoplankton species at different salinity and nutrient condition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 440, 244-249. Recuperado de www.elsevier.com/locate/jembe
- Lemus, N., Urbano, T., Arredondo-Vega, B., Guevara, M., Vásquez, A., Carreón-Palau, L., Vallejo, N. (2006). Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos. *Ciencias Marinas*, 32(3), 597-603.
- Li, S., Xu J., Chen J., Chen J., Zhou C., Yan X. (2014). The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. *Aquaculture*, (428-429), 104-110. Recuperado de www.elsevier.com/locate/aqua-online.
- Loureiro, S., Jauzein, C. Garce, E. Collos, Y. Camp J. y Vaque, D. (2009). The significance of organic nutrients in the nutrition of *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Plankton Research* 31 (4), 399-410.

- Morris H., Ramírez, A., Martín, M., Borges, L. y Olivares, G. (2004). Cinética de crecimiento y producción de polisacáridos por la microalga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta, Porphyridiaceae) en condiciones de radiación solar difusa. *Tecnología Química*, 24 (1), 73-78.
- Muller-Feuga, A. (2004). Microalgae for aquaculture. En A. Richmond (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, pp. 352- 364.
- Nieves, M., López, D., Medina, M., Piña, P., Leal, S., López-Eliás, J. (2009). Producción y calidad de *Chaetoceros Muelleri* a diferentes concentraciones de nutrientes y densidades de inóculos. *Rev. Invest. Mar.*, 30(2), 123-133.
- Pettersen, A., Turchini, M. G., Jahangard, S., Ingram, B. A., Sherman, C. D. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, 309, 115–124. Recuperado de: www.elsevier.com/locate/aqua-online
- Priyadarshani, I., Sahu, D., Rath, B. (2012). Algae in Aquaculture. *International Journal of Health Sciences & Research* 108, 2. Recuperado http://www.ijhsr.org/current_PDF2/14.pdf
- Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota. Recuperado de <http://www.bigelow.org/catt/bigelow-center-for-blue-biotechnology/>
- Richmont, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Great Britain. Blackwell Science Asia. 565pp.
- Ruiz-Guzmán, J. A., Jiménez, C. A., Gomes, C., Prieto, M. J. (2012). Cultivo experimental de *Cyclopinasp* con diferentes especies de microalgas. *Revista Colombiana Ciencias Pecurias*, 25, 97-105.
- Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Lemus, N., Arredondo-Vega, B. (2010). Crecimiento y composición bioquímica de *Skeletonemacostatum* (Greville, 1866) Cleve, 1878 (heterokontophyta: bacillariophyceae) en función de la irradiancia y del medio de cultivo. *Saber Universidad de Oriente, Venezuela*, 22(2), 149-159.