

Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos.

A. Cid, J. Abalde y C. Herrero*.

Departamento Biología Celular y Molecular.
Facultad de Ciencias. Universidad de la Coruña. 15071 La Coruña

Résumé : *Croissance et composition biochimique de la microalgue Tetraselmis suecica dans des cultures mixotrophiques avec différents sucres et aminoacides.* Trois sucres, fructose, saccharose et manose et trois acides aminés (alanine, lysine et méthionine) ont été testés comme stimulants potentiels de la croissance chez la microalgue *Tetraselmis suecica*. Celle-ci est cultivée en absence de bactéries et a une intensité de lumière de 850 lux. La croissance et la composition biochimique chez *T. suecica* sont affectées par les substrats organiques testés. Le fructose stimule la croissance mais les autres sucres et l'alanine sont sans effet. La lysine et la méthionine réduisent la croissance par rapport aux cultures servant de contrôle. La composition biochimique cellulaire dépend de la nature du substrat organique testé mais elle varie à peine en fonction de la concentration. Les cultures enrichies en sucres présentent les protéines cellulaires les plus abondantes, tandis que pour les cultures enrichies en acides aminés, les lipides sont plus abondants.

Abstract : *Growth and biochemical composition of the marine microalga Tetraselmis suecica in mixotrophic cultures with different sugars and amino acids.* Three sugars (fructose, sucrose and mannose) and three amino acids (alanine, lysine, and methionine) have been tested as potential growth factors for the marine microalgae *Tetraselmis suecica*, in axenic cultures, at 850 lux light intensity. The organic compounds assayed affected the growth and biochemical composition of *T. suecica*. Growth stimulation was achieved only in cultures added with fructose, whereas growth was not affected in the cultures with the remaining sugars and alanine. Growth was inhibited in the cultures added with lysine and methionine. Biochemical cellular composition was affected by the nature of the organic compound added, but not by the concentration used. Proteins were the main cellular constituent in the cultures carried out with sugars, while in those with amino acids the main cellular fraction was lipids.

INTRODUCCION

La microalga marina *Tetraselmis suecica* adquiere gran importancia en la actualidad por ser una de las especies más utilizadas en la acuicultura de moluscos y crustáceos, y por su posible utilización como fuente de SCP, minerales y vitaminas (Fábregas & Herrero, 1985 ; 1986 ; 1990), y en los últimos años se ha despertado un gran interés por su producción a gran escala.

Las microalgas se caracterizan a nivel metabólico por una fotosíntesis oxigénica y la presencia de clorofila. A pesar de ser microorganismos autótrofos, algunas microalgas son capaces de crecer heterotróficamente, utilizando distintos sustratos orgánicos (Flynn &

* Autor al que se ha de enviar la correspondencia.

Syrett, 1986). Diversos estudios han permitido afirmar que las microalgas marinas no son exclusivamente autótrofas (Lewin & Hellebust, 1970) ; Ladha & Kumar, 1975 ; Flynn & Syrett, 1986). En los sistemas de cultivo, la mayor parte del carbono microalgal puede, por tanto, ser proporcionado en forma de solutos orgánicos, como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, peptonas, extracto de levadura, alcoholes, etc. (Ukeles & Rose, 1976 ; Richmond, 1986).

Los azúcares han sido el sustrato más comúnmente utilizado para cultivos mixotróficos de microalgas, habiéndose utilizado distintos azúcares con diferentes resultados (Ukeles & Rose, 1976). Se ha señalado así mismo el efecto potenciador del crecimiento de ciertos aminoácidos en cultivos de microalgas marinas (Fábregas, 1982), así como la utilización éstos en diferentes sistemas de cultivo (Neilson & Larson, 1980 ; Flynn & Syrett, 1986).

La obtención de cultivos mixotróficos de microalgas marinas de interés en acuicultura permitirá obtener mejores rendimientos en biomasa, lo que implicará una reducción en los costes energéticos. En función de esto, en este trabajo estudiamos la posible estimulación del crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica* utilizando en el medio de cultivo diferentes azúcares y aminoácidos.

MATERIALES Y METODOS

Tetraselmis suecica se cultiva axénicamente en agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0,45 μm esterilizada a 120 °C durante 40 minutos, y posteriormente enriquecida con una solución de nutrientes inorgánicos y vitaminas : NaNO_3 , 2 mM ; NaH_2PO_4 , 100 μM ; ZnCl_2 , 1 μM ; MnCl_2 , 1 μM ; Na_2MoO_4 , 1 μM ; CoCl_3 , 0,1 μM ; CuSO_4 , 0,1 μM ; citrato férrico, 20 μM ; tiamina, 35 $\mu\text{g/l}$; biotina, 5 $\mu\text{g/l}$; B_{12} , 3 $\mu\text{g/l}$; EDTA, 26,4 mM ; Tris-HCl, 15 mM ; pH 7,6 ; y una concentración constante de extracto de levadura (1,25 g/l). A este medio base se adicionan distintos sustratos orgánicos, que han sido 3 azúcares : fructosa, sacarosa y manosa, y 3 aminoácidos : alanina, lisina y metionina. Estos sustratos orgánicos se han utilizado a dos concentraciones diferentes : 48 y 96 mg atom. C/l. Asimismo, se incluyó un cultivo al que no se adiciona ningún aminoácido, ni azúcar, que actúa como blanco.

Los cultivos se realizan por triplicado a 18 °C, iluminación 850 lux y régimen luz : oscuridad 12 : 12, partiendo de un inóculo inicial de 2×10^4 células/ml.

El crecimiento se sigue por medidas de densidad óptica (100 - T). Cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria se realiza un recuento de la densidad celular en un contador de células Coulter Counter DN, y se realizan análisis bioquímicos de los cultivos. Las proteínas y los carbohidratos se cuantifican a partir del extracto bruto obtenido después de coleccionar las células microalgales por centrifugación, resuspenderlas en agua destilada y romperlas mediante ultrasonidos. Después de rotas, los extractos se centrifugan de nuevo y se recoge el sobrenadante, en el que se determinan las proteínas, por el método de Bradford (Kochert, 1978 a), y los carbohidratos por el método del fenolsulfúrico (Kochert, 1978 b).

La concentración de lípidos se determina por un método de carbonización cuantitativa (Marsh & Weinstein, 1966).

Las fases estacionarias correspondientes a la máxima producción de biomasa fueron comparadas por un análisis de la varianza (ANOVA) ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los azúcares y aminoácidos utilizados como fuente de carbono afectan al crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Las especies aisladas en hábitats litorales del medio marino, como es el caso de *T. suecica*, son potencialmente capaces de crecer en condiciones de organotrofia (Lewin & Guillard, 1963). En esta zona, la turbidez y la escasa iluminación contribuyen a que la zona eufótica no sea demasiado grande y, por tanto, la capacidad fotoorganotrófica se ve potenciada, y aún cuando se hable de concentraciones muy pequeñas, hay numerosos estudios que documentan la presencia de sustratos orgánicos, preferentemente carbohidratos, en el agua de mar (Provasoli, 1963 ; Sloan & Strickland, 1966).

De los tres azúcares utilizados, la fructosa es el que proporciona mejores crecimientos (Fig. 1), y una densidad celular máxima a las dos concentraciones ensayadas ($1,65 \times 10^6$ y $2,11 \times 10^6$ células/ml). Estos valores son significativamente superiores a los obtenidos en los restantes cultivos, incluidos los cultivos blanco ($0,93 \times 10^6$ células/ml) (Tabla I). Al aumentar la concentración del azúcar utilizado aumenta ligeramente la densidad celular final, pero sin llegar a producirse diferencias significativas entre ambos valores.

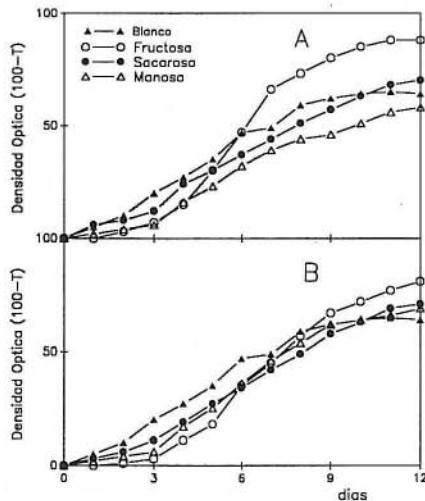


Fig. 1 : Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con extracto de levadura y azúcares ; la concentración de azúcares utilizada fue 48 mg atom. C/l(A) y 96 mg atom. C/l(B).

TABLA I

Densidad celular final (células/ml $\times 10^6$) en cultivos mixotróficos de *Tetraselmis suecica* con extracto de levadura y distintos compuestos orgánicos. Concentración de compuestos orgánicos expresada en mg atom. C/l.

	Concentración del sustrato	
	48	96
Fructosa	1.65	2.11
Sacarosa	0.93	1.04
Manosa	0.71	0.96
Alanina	0.86	0.90
Lisina	0.34	0.23
Metionina	0.33	0.35

A la vista de estos resultados, sólo la fructosa presenta un claro efecto estimulador del crecimiento. Los cultivos con alanina, sacarosa y manosa no son significativamente diferentes de los cultivos blanco. Por el contrario, los cultivos con lisina y metionina son los que presentan menores crecimientos (a ambas concentraciones de aminoácidos), sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente menores que el blanco. Esos cultivos son los que presentan las densidades celulares mínimas, con valores entre un 165 % y un 300 % menores que las alcanzadas en los cultivos blanco (Tabla I) y entre un 371 % y un 817 % con respecto a las alcanzadas con fructosa.

Fábregas *et al.* con cultivos estáticos de *T. suecica*, no axénicos, a diferentes salinidades y concentraciones de nutrientes y una intensidad de luz de 11 000 lux, obtienen una densidad celular máxima en la fase estacionaria de $1,3 \times 10^6$ células/ml, valor que se ha visto superado por los cultivos axénicos mixotróficos con fructosa y una intensidad de luz muy inferior (850 lux) (Tabla I). Este hecho supone un importante ahorro energético, todavía más significativo si tenemos en cuenta que en cultivos no axénicos, el crecimiento de las microalgas se ve favorecido por la producción de sustancias exocelulares por parte de las bacterias (Fábregas, 1982).

Además de incidir en el crecimiento y densidad celular alcanzada en la fase estacionaria, los azúcares y aminoácidos adicionados al medio de cultivo, afectan a la composición bioquímica celular de *Tetraselmis suecica*.

El componente bioquímico celular mayoritario en las células cultivadas con los diferentes azúcares son las proteínas al igual que lo que sucede en el caso de los cultivos blanco (Fig. 3). La excepción la constituyen los cultivos con sacarosa, en los que la concentración de lípidos supera ligeramente a la concentración de proteínas. La fracción celular menos abundante es la de carbohidratos, salvo en el caso de los cultivos con manosa, en los que los lípidos son los componentes menos abundantes.

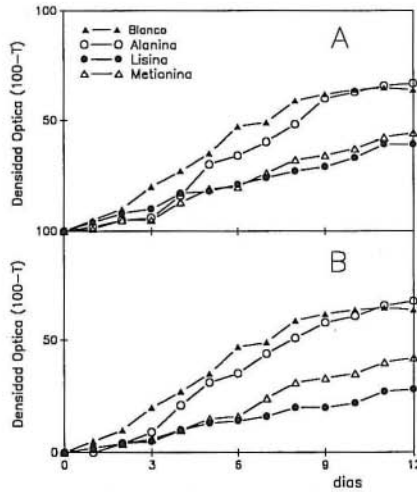


Fig. 2 : Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con extracto de levadura y aminoácidos ; la concentración de aminoácidos utilizada fue 48 mg atom. C/l(A) y 96 mg atom. C/l(B).

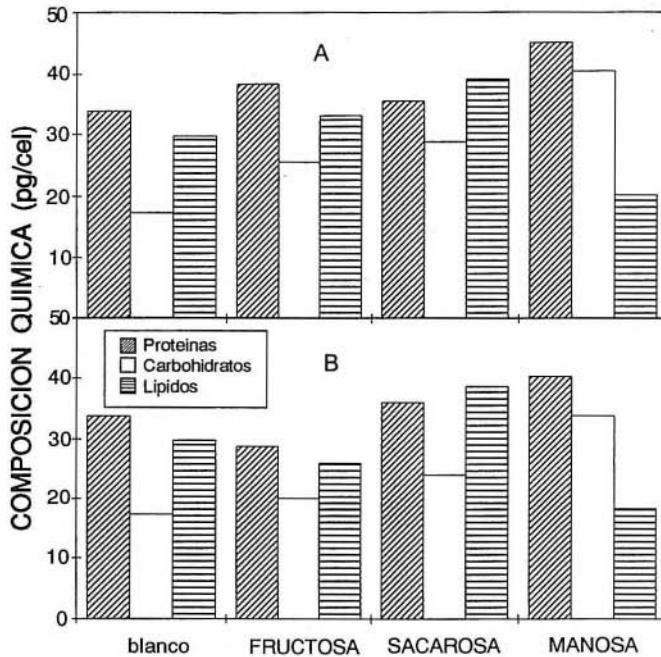


Fig. 3 : Composición bioquímica celular (pg/célula) en la fase estacionaria de cultivos mixotróficos de *Tetraselmis suecica* con extracto de levadura y distintos azúcares ; la concentración de azúcares utilizada fue 48 mg atom. C/l(A) y 96 mg atom. C/l(B).

La fracción celular más abundante en los cultivos con un aminoácido como fuente de carbono, es la lipídica (Fig. 4), a diferencia de lo que sucede en los cultivos blanco y en los cultivos con azúcares en general, en los que las proteínas son el componente celular mayoritario. En estos cultivos con aminoácidos, después de los lípidos, las proteínas son el componente celular más abundante.

Las microalgas producen diferentes cantidades de constituyentes celulares, como son proteínas, carbohidratos y lípidos, cuando se cultivan bajo diferentes condiciones de cultivo (Healey, 1975). Las variaciones en la composición del medio de cultivo provocan cambios en el contenido bioquímico de *T. suecica*, como ya se ha demostrado con anterioridad para ésta y otras especies de microalgas marinas (Myklestad & Haug, 1972 ; Parsons & Takahashi, 1973 ; Shifrim & Chisholm, 1981 ; Fábregas *et al.*, 1985 ; 1986 a ; 1986 b). En nuestras experiencias se observan diferencias notables en la composición bioquímica de *T. suecica* en la fase estacionaria dependiendo de cuál fuese el sustrato orgánico añadido al medio, sin embargo, la composición bioquímica celular no se ve afectada significativamente por la concentración utilizada de dichos sustratos orgánicos.

Los máximos rendimientos en proteínas, carbohidratos y lípidos se obtienen en los cultivos con fructosa, sin que existan diferencias significativas entre los rendimientos alcanzados con las dos concentraciones ensayadas : 5,24 y 5,02 mg l⁻¹ d⁻¹ de proteínas, 3,60 y 3,52 mg l⁻¹ d⁻¹ de carbohidratos, y 4,51 y 4,52 mg l⁻¹ d⁻¹ de lípidos, con concentraciones 48 y

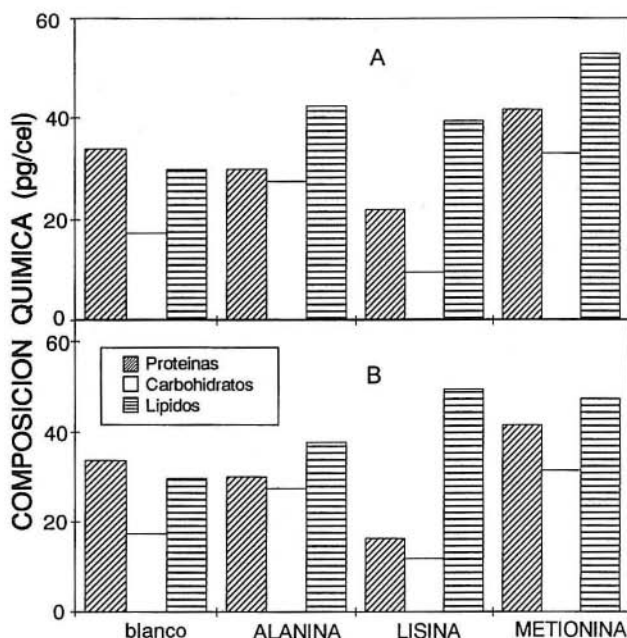


Fig. 4: Composición bioquímica celular (pg/célula) en la fase estacionaria de cultivos mixotróficos de *Tetraselmis suecica* con extracto de levadura y distintos aminoácidos ; la concentración de aminoácidos utilizada fue 48 mg atom. C/l(A) y 96 mg atom. C/l(B).

96 mg.átom.C/l, respectivamente (Tabla II). Estos rendimientos de los cultivos con fructosa son al menos dos veces superiores a los obtenidos en los cultivos blanco : 2,57 mg l⁻¹ d⁻¹ de proteína, 1,31 mg l⁻¹ d⁻¹ de carbohidratos y 2,27 mg l⁻¹ d⁻¹ de lípidos. Los rendimientos en proteínas obtenidos en los cultivos con sacarosa o manosa no difieren, por el contrario, de los obtenidos en los cultivos blanco. Sin embargo, los rendimientos en carbohidratos son mayores en los cultivos con sacarosa y manosa, sin diferencias significativas entre ellos, que los obtenidos en los cultivos blanco.

TABLA II

Rendimientos en biomasa (células ml⁻¹d⁻¹) y en distintos componentes bioquímicos (mg l⁻¹d⁻¹) en la fase estacionaria de cultivos mixotróficos de *Tetraselmis suecica* con extracto de levadura y distintos azúcares.

	RENDIMIENTOS			
	Células/ml	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
Blanco	0.08	2.57	1.31	2.27
Fructosa 48	0.14	5.24	3.50	4.51
Fructosa 96	0.17	5.02	3.52	4.52
Sacarosa 48	0.08	2.71	2.22	2.99
Sacarosa 96	0.09	3.08	2.07	3.30
Manosa 48	0.06	2.63	2.38	1.15
Manosa 96	0.08	3.18	2.70	1.42

Por lo que respecta a los cultivos con aminoácidos, los cultivos con alanina son los que presentan un máximo rendimiento en todos los compuestos bioquímicos celulares analizados (Tabla III), si bien no son significativamente diferentes de los obtenidos en los cultivos blanco. Los cultivos con lisina proporcionan los rendimientos más bajos tanto en proteínas como en materiales de reserva, con mínimos de 0,27 mg l⁻¹ d⁻¹ de proteínas, 0,21 mg l⁻¹ d⁻¹ de carbohidratos y 0,90 mg l⁻¹ d⁻¹ de lípidos.

De estos resultados se desprende que la fructosa es el compuesto que ha proporcionado los mejores rendimientos. Otros autores ya habían encontrado que entre los azúcares estimuladores del crecimiento de microalgas dulceacuícolas, la fructosa resultaba ser uno de los más eficaces (Droop, 1974).

Este proceso mixotrófico puede ser explotado bajo condiciones de baja iluminación, donde la fructosa puede reemplazar la luz como fuente de energía (Folman *et al.*, 1978), con la consiguiente reducción de los costes de producción de la biomasa microalgal. Las cosechas pueden verse incrementadas 2 ó 3 veces mediante el uso de una fuente de carbono orgánico (Soong, 1980). Los excelentes resultados de producción de biomasa en los cultivos mixotróficos, pueden aprovecharse para evitar la escasez de biomasa microalgal en el desarrollo de determinados sistemas que implican la producción de sustancias volúmenes de determinadas especies de microalgas, y en los que dicha escasez constituye un auténtico cuello de botella (Persoone & Clauss, 1980 ; Ukeles, 1980 ; Venkataraman *et al.*, 1980).

TABLA III

Rendimientos en biomasa (células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$) y en distintos componentes bioquímicos ($\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$) en la fase estacionaria de cultivos mixotróficos de *Tetraselmis suecica* con extracto de levadura y distintos aminoácidos.

RENDIMIENTOS				
	Células/ml	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
Blanco	0.08	2.57	1.31	2.27
Alanina 48	0.07	2.09	1.96	2.99
Alanina 96	0.07	2.22	2.06	2.79
Lisina 48	0.03	0.58	0.26	1.07
Lisina 96	0.02	0.27	0.21	0.90
Metionina 48	0.03	1.10	0.89	1.41
Metionina 96	0.03	1.17	0.91	1.34

La luz se mantuvo constante a 850 lux, un nivel por debajo del nivel de saturación, ya que los cultivos mixotróficos no producen una estimulación del crecimiento a elevadas intensidades de luz (Ukeles & Rose, 1976). La luz actúa como un agente modificador de los requerimientos nutritivos de las microalgas, produciendo efectos secundarios sobre la producción primaria, además de su papel principal en la fotosíntesis (Wynne & Rhee, 1986). Los rendimientos en biomasa se incrementan en los cultivos mixotróficos con una fuente de carbono orgánico (Soong, 1980) y a intensidades de luz inferiores a las necesarias para cultivos fotoautotróficos. Este proceso puede ser explotado bajo condiciones de baja iluminación, donde el sustrato orgánico reemplazaría a la luz como fuente de energía (Folman *et al.*, 1978), con el consiguiente abaratamiento de los costes de producción de la biomasa microalgal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con una subvención de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid (Proyecto PB 87-0499).

Resumen : Se han utilizado 3 azúcares (fructosa, sacarosa y manosa) y 3 aminoácidos (alanina, lisina y metionina) como posibles estimuladores del crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*, cultivada axénicamente y con una intensidad luminosa de 850 lux. Los sustratos orgánicos utilizados afectan al crecimiento y composición bioquímica de *T. suecica*. Sólo la fructosa estimula el crecimiento; los demás azúcares y el aminoácido alanina no producen efecto alguno. Lisina y metionina presentan efectos inhibidores del crecimiento frente a los cultivos blanco. La composición bioquímica celular se ve afectada por la naturaleza del sustrato orgánico utilizado, pero apenas varía en función de la concentración de sustrato utilizado. La proteína es, generalmente, el componente celular más abundante en los cultivos con azúcares, mientras que en los cultivos con aminoácidos los componentes mayoritarios son los lípidos.

BIBLIOGRAFIA

- DROOP, M.R., 1974. Heterotrophy of carbon. In : W.D.P. Stewart (ed.) "Algal Physiology and Biochemistry" 1 : 530-559. Blackwell Scientific Publications.
- FABREGAS, J., 1982. *Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina : aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico*. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- FABREGAS, J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS & M. VEIGA, 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42 : 207-245.
- FABREGAS, J. & C. HERRERO, 1985. Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23 : 110-113.
- FABREGAS, J. & C. HERRERO, 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture*, 51 : 237-243.
- FABREGAS, J. & C. HERRERO, 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J. Ind. Microbiol.*, 5 : 259-264.
- FABREGAS, J., C. HERRERO, J. ABALDE, R. LIAÑO & B. CABEZAS, 1986 a. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53 : 187-199.
- FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS & J. ABALDE, 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49 : 231-241.
- FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS & J. ABALDE, 1986 b. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53 : 101-113.
- FLYNN, K.J. & P.J. SYRETT, 1986. Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.*, 90 : 159-163.
- FOLMAN, H., H. MARKL & D. VORTMEYER, 1978. Continous production of microalgae under mixotrophic conditions. *Germ. Chem. Eng.*, 1 : 335-339.
- HEALEY, F.P. 1975. Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. *Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.*, 585. Environment Canada, 30 p.
- KOCHERT, G. 1978 a. Protein determination by dye-binding. In : Hellebust & Craigie (eds.) "Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods". Cambridge University Press.
- KOCHERT, G. 1978 b. Quantitation of macromolecular components of microalgae. In: Hellebust & Craigie (eds.) "Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods". Cambridge University Press.
- LADHA, J.K. & H.D. KUMAR, 1975. Heterocyst division in two blue-green algae. *Arch. Microbiol.*, 102 : 171.
- LEWIN, J. & R.R. GUILLARD, 1963. Diatoms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 17 : 373-414.
- LEWIN, J. & J.A. HELLEBUST, 1970. Heterotrophic nutrition of the marine pennate diatom *Nitzschia angularis* var. *affinis*. *Mar. Biol.*, 36 : 313-320.
- MARSH, J.B. & D.B. WEINSTEIN, 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, 7 : 574-576.
- MYKLESTAD, S. & A. HAUG, 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of concentration of nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 9 : 125-136.
- NEILSON, A.H. & T. LARSON, 1980. The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects. *Physiol. Plant.*, 48 : 1-542.
- PARSONS, T.R. & M. TAKAHASHI, 1973. "Biological Oceanographic Processes". Pergamon Press.
- PERSOONE, G. & C. CLAUS, 1980. Mass culture of algae : a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. In : Shelef & Soeder (eds.) "Algae Biomass. Production and Use". 1 : 265-285. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- PROVASOLI, L. 1963. Organic regulation phytoplankton fertility. In : M.N. Hill (ed.) "The Sea". vol 2 : 169-219. John Wiley (Interscience). New York.
- RICHMOND, A.E. 1986. Cell response to environmental factors. In : Richmond (ed.) "Handbook of Microalgal Mass Culture". 1 : 69-99. CRC Press.
- SHIRIM, N.H. & S.W. CHISHOLM, 1981. Phytoplankton lipids : environmental influences on production & possible commercial applications. In : Shelef & Soeder (eds.) "Algae Biomass. Production and Use". 1 : 627 646. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- SLOAN, P.R. & J.D.H. STRICKLAND, 1966. Heterotrophy of four marine phytoplankters at low substrate concentrations. *J. Phycol.*, 2 : 29.
- SOONG, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In : Shelef & Soeder (eds.) "Algae Biomass. Production and Use". 1 : 97-113. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

- UKELES, R. 1980. American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. In : Shelef & Soeder (eds.) "Algae Biomass. Production and Use". 1 : 287-306. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- UKELES, R. & W.E. ROSE, 1976. Observations on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae. *Mar. Biol.*, 37 : 11-28.
- VENKATARAMAN, L.V., B.P. NIGAM & PK. RAMANATHAN, 1980. Rural oriented freshwater cultivation of algae in India. In : Shelef & Soeder (eds.) "Algae Biomass. Production and Use". 1 : 81-95. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- WYNNE, D. & G.Y. RHEE, 1986. Effects of light intensity and quality on relative N and P requirement of marine planktonic algae. *J. Plank. Res.*, 8 : 91-103.